
ALMA MATER STUDIORUM- UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

DISPOSITIVI DI ULTIMA GENERAZIONE
PER L'IMMUNORIVELAZIONE DI
MARCATORI PROTEICI IN FASE SOLIDA

Elaborato in

Fondamenti di Chimica e Biochimica

Relatore:

Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Cristian Trovato

Correlatore:

Dott. Alice Pasini

Sessione II

Anno Accademico 2012/2013

*A Danilo, Giulia e Alessio
Anche nel più arido dei deserti
Possiate trovare sempre
L'acqua del Sapere.*

INDICE

<i>Compendio</i>	7
INTRODUZIONE	9
<i>Cenni Storici</i>	9
<i>Il Western Blotting nella pratica moderna</i>	9
PREMESSE TEORICHE	10
<i>La struttura delle Proteine</i>	10
<i>Definizioni delle principali grandezze chimico-fisiche</i>	11
OPERAZIONI PRELIMINARI	12
<i>La coltura cellulare</i>	12
<i>La purificazione e il dosaggio</i>	14
1° CAPITOLO ELETTROFORESI E QUANTIFICAZIONE.	17
1.1 Il Metodo classico.	17
1.1.1 <i>SDS-PAGE</i>	17
1.1.2 <i>Colorazione con Coomassie Brilliant Blue</i>	20
1.1.3 <i>La rivelazione del segnale</i>	21
1.2 Criterion Stain Free System.	22
1.3 Visualizzazione e paragone dei risultati.	24
2° CAPITOLO BLOTTING E INCUBAZIONE CON IMMUNOGLOBULINE.	29
2.1 Il Sistema Classico.	29
2.1.1 <i>Tank/Wet Blot</i>	29
2.1.2 <i>Incubazione con anticorpi</i>	30
2.1.3 <i>Specifiche tecniche</i>	32
2.2 Trans-Blot Turbo.	32
2.3. iBlot: Dry Blot.	34
2.4 SNAP.	37
3° CAPITOLO IMMUNORIVELAZIONE DEL SEGNALE.	39
3.1 La natura del segnale.	39
3.2 Il Problema della rivelazione del segnale.	43
3.3 Sistemi analogici.	46
3.4 Sistemi digitali.	47
3.4.1 <i>ChemiDoc MP</i>	47
3.4.2 <i>ImageQuant LAS 4000</i>	51
3.4.3 <i>G:Box XR5</i>	53
4° CAPITOLO DENSITOMETRIA E QUANTIFICAZIONE.	55
4.1 Densitometria: cenni teorici.	55

4.2 Principi e problematiche della quantificazione.....	56
4.3 ImageLab.....	62
CONCLUSIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA	67
SITOGRAFIA.....	68
RINGRAZIAMENTI.....	69

Compendio

Oggetto della presente tesi di Laurea è lo studio delle nuove tecnologie disponibili per l'immunorivelazione di marcatori proteici in fase solida.

Particolare attenzione è stata rivolta alle problematiche e alle esigenze tecniche nella quantificazione del complesso proteico in esame a seguito della rivelazione di un segnale, testimone proporzionale della grandezza biologica in esame. In altre parole l'identificazione e la quantificazione di proteine di interesse avviene a valle di un processo, chiamato "western blotting", che genera un segnale (colore, luce, fluorescenza) al quale riferire la sostanza molecolare della misura. L'accuratezza della quantificazione, a seguito degli errori sperimentali dovuti alla tecnologia, rappresenta un problema complesso nella pratica biochimica e nello studio dei fenomeni di variazione dell'espressione genica, ovvero del fenotipo, in un organismo.

Il riconoscimento avviene attraverso una serie di procedimenti, che verranno esaminati nel dettaglio di seguito. Il primo capitolo si apre con la descrizione del processo di discriminazione delle proteine in base al loro rapporto carica/massa molecolare tramite elettroforesi su gel. Il capitolo prosegue con la disamina della tecnologia di ultima generazione per la visualizzazione delle proteine risolte e la loro eventuale quantificazione, paragonandone le prestazioni rispetto ai sistemi di visualizzazione e quantificazione classici. Argomenti del secondo capitolo sono lo studio delle prestazioni delle nuove tecnologie per l'esecuzione del "blotting" su supporto solido e per l'incubazione delle proteine con immunoglobuline. Seguono, rispettivamente nei capitoli terzo e quarto, l'analisi delle tecnologie analogiche e digitali per la rivelazione del segnale e la quantificazione tramite opportuni software.

INTRODUZIONE

*“When you ask a carpenter to do something,
the tool he’s always going to use is a hammer”.*

*“My tools were SDS-polyacrylamide gels
and immunoassays.”*

[W. Neal Burnette]

Cenni Storici

Ideato nel 1979 da W. Neal Burnette, biochimico e ufficiale americano, l’immunoblot ebbe un’immediata diffusione presso la comunità scientifica, tanto da spingere la rivista “Analytical Biochemistry”, che aveva inizialmente rifiutato il lavoro di Burnette, a rivedere le proprie posizioni in merito, pubblicandone gli studi nel 1981.

Il nome deriva da un simpatico gioco di parole. Nel 1975 la procedura che permette, infatti, il riconoscimento di sequenze specifiche di DNA, il DNA blotting, è stata battezzata “Southern blotting” dal nome suo inventore, Edwin Southern presso l’Università di Oxford. Qualche anno dopo, nel 1977, l’RNA blotting, è stato quindi chiamato “northern blotting” da James Alwine, David Kemp e George Stark presso la Stanford University. Burnette e i suoi colleghi utilizzarono così il nome “western blotting”, anche perché il loro laboratorio era situato sulla costa occidentale degli USA.

Il Western Blotting nella pratica moderna

Il western blotting permette di valutare l’espressione e alcune modifiche covalenti di un elemento proteico di interesse, utili per la determinazione del fenotipo cellulare in corso di studio.

Di seguito, una sintetica descrizione delle principali proprietà delle proteine e delle grandezze in gioco nella loro analisi.

PREMESSE TEORICHE

La struttura delle Proteine

Le proteine sono delle macromolecole costituite da un agglomerato di unità monomeriche chiamati amminoacidi, unite covalentemente in caratteristiche sequenze lineari.

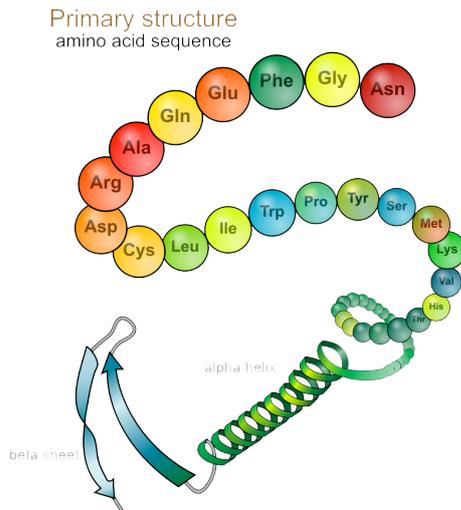


Figura 1. Struttura Primaria di una proteina

La sequenza degli amminoacidi nella catena polipeptidica costituisce la **struttura primaria**.

Il legame peptidico si genera nel momento in cui, tramite un processo di condensazione (ovvero l'unione di due strutture molecolari con la perdita di una molecola di H₂O), la parte basica di un amminoacido (il gruppo funzionale amminico -NH₂) si unisce con quella acida di un amminoacido diverso (il gruppo carbossilico -COOH). Quando ciò avviene, un idrogeno (H⁺) si separa dall'azoto e si unisce al gruppo OH- legato

al carbonio formando una molecola d'acqua e permettendo a C e ad N di unirsi con un legame detto appunto peptidico. L'idrogeno e l'ossigeno sono sempre in posizione trans rispetto al legame peptidico che è molto forte e impedisce la rotazione su di esso.

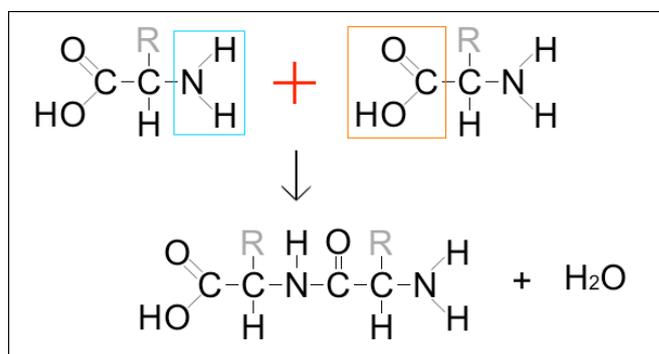


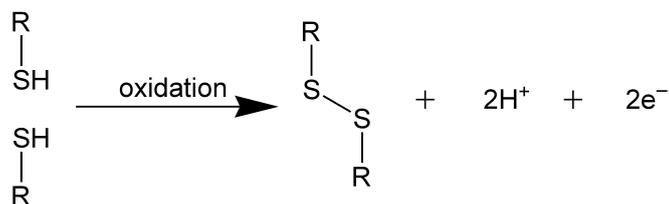
Figura 2. Legame Peptidico

Il termine **struttura secondaria** si riferisce a un segmento polipeptidico della proteina e descrive l'organizzazione spaziale della catena principale, senza tener conto della conformazione delle catene laterali o delle relazioni con altri segmenti della proteina.

La disposizione nello spazio di tutti gli atomi di una proteina viene definita come **struttura terziaria**.

In condizioni fisiologiche la struttura tridimensionale che si ottiene è detta **nativa** e ad essa è associata una funzione biologica. Le interazioni tra i residui di amminoacidi, determinanti per ottenere il processo di avvolgimento (ripiegamento proteico), sono dette a lunga distanza perché avvengono generalmente tra residui situati molto lontani nella struttura primaria. Le principali interazioni chimiche che possono contribuire al mantenimento della struttura terziaria (così come della struttura secondaria) sono il legame idrogeno, le interazioni ioniche, le interazioni dipolo-dipolo.

Alcune proteine contengono due o più catene polipeptidiche distinte, che possono



essere identiche o diverse. La disposizione di queste subunità in complessi tridimensionali prende il nome di **struttura quaternaria**.

Figura 3. Ponte Disolfuro

Definizioni delle principali grandezze chimico-fisiche

Limite di rilevabilità (LoD): è la più bassa quantità di substrato che può essere rilevato con uno specificato intervallo di confidenza, definito da due parametri: il tasso di falsi positivi e il tasso di falsi negativi.

Indica la minima concentrazione alla quale è possibile condurre un'analisi qualitativa volta alla determinazione o meno della presenza di un determinato analita. La percentuale di falsi positivi è determinata rispetto al rumore nel sistema, che può essere definito misurando la media e la deviazione standard di un bianco. Nel caso di un gel colorato, il bianco è una corsia caricata solo con il buffer di carico e nessuna proteina.

Limite di quantificazione (LOQ): è la quantità che può essere coerentemente misurata con una specificata precisione. In genere, il LOQ è impostato con una soglia di dieci deviazioni standard sopra la media del rumore. È più alto del limite di rilevabilità.

Risoluzione: in **ottica** è la minima distanza distinguibile tra due punti di un'immagine, utilizzando una qualsiasi tecnica di visualizzazione di immagini, sia essa la visione a occhio nudo, la microscopia o altro. È di due tipi: **assiale**, cioè riferita al discernimento di distanze su un piano parallelo alla distanza oggetto-osservatore, e laterale o spaziale, ossia riferita a distanze su un piano ortogonale alla distanza oggetto osservatore.

Nella **grafica** la risoluzione indica la densità dei punti dot elementari, che formano l'immagine rapportata a una dimensione lineare (ad esempio punti/cm o punti/pollice).

La risoluzione, quindi, essendo una misura della densità dei punti di immagine rappresentati su un supporto (carta o monitor), si misura in punti per unità di lunghezza, dove quest'ultima di solito è il pollice (**dpi**, dot per inch). Per **pixel** invece si intende più propriamente l'aspetto software del punto d'immagine, del dot. Si tratta in altri termini del contenuto informativo del dot che può avere diverse modalità di composizione: RGB a 24 bit, CMYK a 32 bit, RGB 32 bit con 1 canale trasparenza, RGB a 48 bit, ecc. Questo definisce la profondità colore ed il metodo di composizione dei dati del pixel.

Intervallo dinamico: (o range dinamico, dall'inglese dynamic range) è il rapporto tra il valore massimo possibile e quello minimo di una grandezza variabile.

Coefficiente di variazione: o deviazione standard relativa, indicato con σ^* , è un indice di dispersione che permette di confrontare misure di fenomeni riferite a unità di misura differenti, in quanto si tratta di un numero puro (ovvero non riferito ad alcuna unità di misura). È un indice della precisione di una misura.

Viene definito, per un dato campione, come il rapporto tra la sua deviazione standard (σ) e il valore assoluto della sua media aritmetica (μ):

OPERAZIONI PRELIMINARI

La coltura cellulare

Uno dei primi aspetti da affrontare nell'esecuzione di un esperimento biologico riguarda la definizione del modello da utilizzare. Una coltura di cellule in linea continua rappresenta una soluzione relativamente semplice ed economica. Le cellule provengono di norma da un tessuto disgregato per via meccanica ed enzimatica, e possono essere propagate per un numero elevato di generazioni se vengono opportunamente immortalizzate attraverso procedure specifiche, o se questo accade spontaneamente.

Per la propagazione della linea cellulare, le cellule sono poste in coltura aderente all'interno di contenitori chiamati piastre di Petri, in terreno di coltura contenente molecole indispensabili, quali amminoacidi, sali e glucosio.

Uno dei terreni maggiormente impiegati è il DMEM, completato con 10% di siero, 1% di L – Glutamina e 1% di antibiotici (penicillina, streptomina).

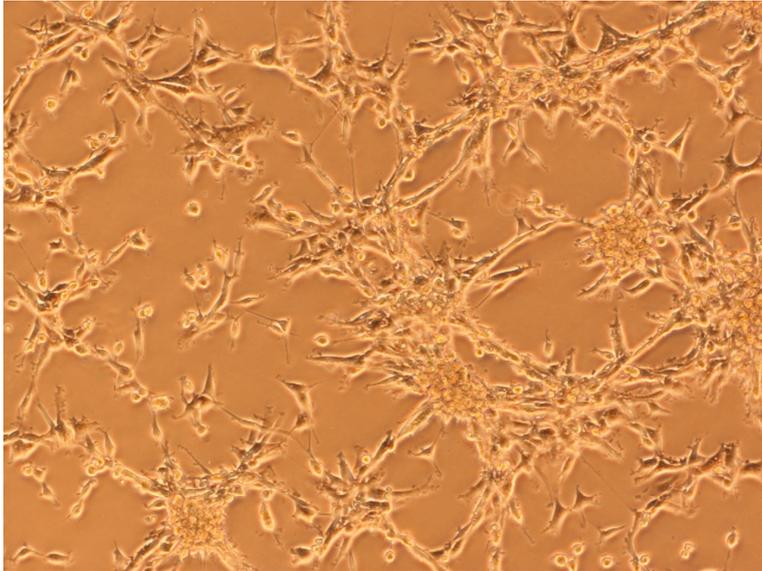


Figura 4 . Linea cellulare U87. Immagine in contrasto di fase

Le cellule, incubate a 37°, per tre/quattro giorni, esauriscono il terreno dei nutrienti e lo caricano di scorie metaboliche, oltre a esaurire lo spazio disponibile mentre proliferano. Serve quindi procedere al loro distacco dalla superficie di coltura, mediante tripsinizzazione (vedi “Appendice”). La tripsinizzazione è una digestione enzimatica a

base di tripsina, un enzima proteolitico che distrugge le proteine di adesione delle cellule alla Petri. Una volta staccate, le cellule vengono aspirate, centrifugate, lavate, diluite secondo il rapporto desiderato e rimesse in coltura in un terreno fresco in nuove piastre. È importante tenere il conto delle del numero delle divisioni cellulari della linea. Dopo un numero variabile (30-35) di tripsinizzazioni le cellule tendono ad andare in senescenza e non rappresentare più un modello di studio attendibile.

Per il benessere delle cellule il valore di pH del terreno deve approssimare 7.4. Per mantenere il pH nel terreno è presente NaHCO_3 e la fase gassosa dell'incubatore contiene il 5% di CO_2 . Inoltre ai terreni viene aggiunto rosso fenolo, un indicatore che ha un colore rosso-arancio a 7.3 pH, vira al giallo-arancio a pH acido e al rosso-viola a pH alcalino.

Dopo il trattamento, le cellule vengono raccolte meccanicamente (e non tramite un enzima, come nel caso della tripsinizzazione) dalla Petri mediante una spatola (scraper) monouso e centrifugate separate dal terreno mediante centrifugazione a 4° C a bassa velocità (~100 g). Una volta eliminato il sovrnatante, il sedimento cellulare viene riportato in sospensione in circa 200 μl di PBS (Phosphate Buffered Saline, soluzione salina che dilava i residui di terreno di coltura. Dopo un nuovo ciclo in centrifuga, il sedimento cellulare può essere utilizzato per procedere con gli esperimenti, oppure essere congelato a -80° C.

Il lavoro con le cellule richiede numerose accortezze. E' necessario lavorare in condizioni di assoluta sterilità, onde evitare un inquinamento della linea cellulare da parte di batteri, funghi e lieviti. Per questo si utilizzano:

- La cappa a flusso laminare che, dotata di opportuni filtri, previene contaminazioni dovute ad agenti presenti nell'aria. La cappa, e tutto ciò che vi viene introdotto, deve essere a sua volta disinfettato con alcol etilico - prima e dopo il suo utilizzo.
 - Strumenti quali pipette, puntali e conetti, autoclavati e monouso, che devono entrare in contatto solo con le superfici e le sostanze previste dai protocolli.
 - Un'appropriata quantità di antibiotici, che viene somministrata ai terreni di coltura.
- Altra accortezza è quella di lavorare con le cellule in ghiaccio, onde evitare che le cellule si danneggino, essendo comunque in una condizione di forte stress.

La purificazione e il dosaggio

Conclusa la raccolta delle cellule, si passa a lavorare con le proteine. Le cellule vanno quindi distrutte, mediante lisi cellulare, in modo da liberarne il contenuto proteico. Strutture complesse, membrane, organelli e residui cellulari, sono materiale di scarto da eliminare.

La lisi cellulare avviene attraverso procedimenti enzimatici e meccanici. Inizialmente il sedimento cellulare viene disgregato con dei semplici colpetti al conetto che lo contiene. Successivamente esso viene risospeso in sodio dodecilfosfato (SDS) al 4%. L'SDS è un detergente molto aggressivo, che disgrega la membrana cellulare. Il lisato ottenuto, molto viscoso e difficilmente maneggiabile, viene dunque trasferito in appositi conetti, chiamati QIAshredder, dotati di una membrana che filtra il lisato eliminando le molecole più grosse. Per velocizzare il processo di sedimentazione, il conetto viene centrifugato (14000 rpm) per pochi minuti. Viene così ottenuto un lisato contenente proteine purificate, delle quali è necessario quantificare la concentrazione.

Il dosaggio delle proteine è un procedimento relativamente semplice che permette di valutare la concentrazione delle proteine totali in una soluzione. Innanzitutto bisogna procedere con la realizzazione di campioni contenenti concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA), in replicati, e acido bicinconinico (BCA) un reagente che legandosi alle proteine assume una colorazione violetta e permette di dosarle mediante lettura in spettrofotometro. Il principio di funzionamento si basa sulla legge di Lambert-Beer, secondo la quale *“la frazione di luce incidente che viene assorbita da una soluzione a una data lunghezza d'onda è proporzionale allo spessore della soluzione e alla concentrazione della specie chimica che assorbe la luce”*.

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\varepsilon_{\lambda} Ml$$

Il complesso BCA/proteine assorbe a 562nm. Misurandone l'assorbanza in contenitori con cammino ottico standard (cuvette), si riesce dunque a determinare il quantitativo di proteine contenuto nella soluzione. Per tener conto delle altre sostanze presenti nel campione che interferiscono con il fascio di luce dello spettrofotometro, viene ovviamente definito un offset, tramite misura dell'assorbanza di un campione contenente tutti i reagenti del test, ma non la mix proteica.

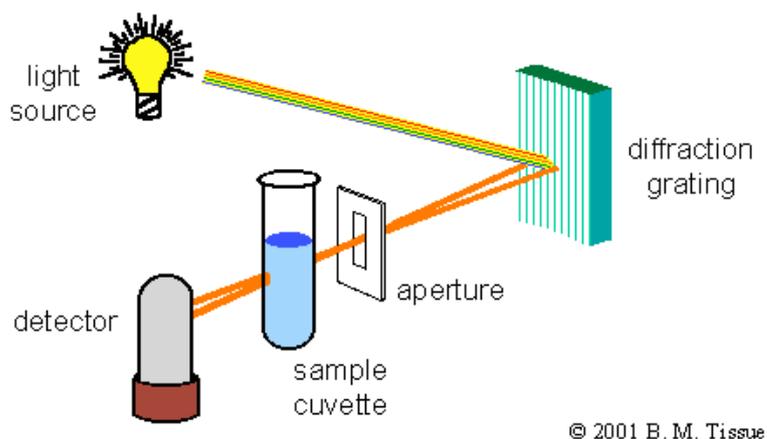


Figura 5. Schema di funzionamento di uno Spettrofotometro.

Tracciata la retta di calibrazione dell'albumina, si preparano le cuvette contenenti la mix di BCA e i campioni dalla concentrazione ignota. Dopo incubazione per 30 minuti a 37°, per agevolare il legame tra il BCA e le proteine, si procede con la misura. I valori dell'assorbanza ricavati tramite lo spettrofotometro, vengono dunque riportati sulla retta di calibrazione, determinando quindi la concentrazione della componente proteica del campione.

Individuate la concentrazione proteica dei singoli campioni, si procede alla preparazione delle mix per la corsa elettroforetica, una procedura che discrimina le proteine in base al loro peso molecolare.

Tutte le mix dovranno contenere:

- la stessa concentrazione di proteine,
- il “loading buffer”, che è utilizzato per facilitare il caricamento dei campioni e renderne possibile la visualizzazione a occhio nudo. Esistono vari tipi di loading buffer disponibili commercialmente. La composizione base è comunque TBE con 10-20% di Glicerolo (per facilitare il caricamento) e 4% di blu di bromofenolo (o altro colorante a basso peso molecolare). Alcuni prodotti commerciali contengono due coloranti, che si separano durante la corsa elettroforetica.

· SDS al 4%, che si lega alle proteine, conferendo loro una carica netta negativa e rendendo insignificante la loro carica intrinseca.

A questo punto le mix vengono bollite, in modo da denaturare le proteine, spezzandone i ponti disolfuro intra e inter-catena tramite l'utilizzo di b-mercaptoetanolo, e lasciarne intatta solo la struttura primaria. Le proteine sono pronte per la corsa elettroforetica (o per essere congelate per utilizzo differito).

1° CAPITOLO

ELETTROFORESI E QUANTIFICAZIONE.

1.1 Il Metodo classico.

1.1.1 SDS-PAGE

L'elettroforesi su gel è una tecnica di risoluzione delle proteine di una miscela complessa, sulla base del rapporto tra la loro carica/massa molecolare, tramite l'utilizzo di un campo elettrico. Per questa procedura la mix proteica è caricata in un gel di poliacrilammide, un polimero che forma numerosi legami crociati, agendo come un setaccio molecolare che rallenta le proteine. La mobilità delle proteine nel gel varia secondo alcuni parametri: le dimensioni delle molecole, la loro carica, la natura e concentrazione del mezzo elettroforetico, la conformazione delle molecole, la tensione applicata. La mobilità elettroforetica di una molecola μ è il rapporto tra la velocità (V) della particella e il potenziale elettrico (E) ovvero il rapporto tra la carica netta della molecola (Z) e il coefficiente frizionale (f):

$$\mu_e = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

Nella preparazione del gel, bisogna prestare attenzione poiché la poliacrilammide è una sostanza potenzialmente neurotossica. Pertanto la preparazione deve avvenire rigorosamente sotto cappa chimica, indossando guanti e camice da lavoro. La polimerizzazione ne abbatte la tossicità.

Il gel di poliacrilammide è più fitto di quello di agarosio, utilizzato per analizzare e separare gli acidi nucleici. Del resto le masse molecolari degli amminoacidi e dei nucleotidi sono molto diverse:

- Amminoacido medio = 110 Da
- Paio di nucleotidi medio = 649 Da
- 1 kilobase di DNA = 650 kDa
- 1 kilobase di DNA codifica 333 amminoacidi = 36 kDa

L'elettroforesi (SDS-PAGE) viene realizzata sovrapponendo due tipi di gel:

- **Lo stacking gel** (in alto): meno concentrato, presenta una struttura reticolare meno fitta del sottostante running, e permette anche il passaggio delle proteine più grandi. Ciò consente l'allineamento delle proteine, prima della corsa vera e propria, eliminando le conseguenze di una diversa concentrazione proteica nei campioni.

STACKING GEL con catalizzatori doppi per minigel da 1.5 mm (3 ml/gel)		
	1 GEL	2 GEL
	5%	5%
Acqua	1.5 ml	3 ml
Running gel Buffer pH 8.8	900 µl	1.8 ml
Acrilammie/bisacrillammide (sol 30%)	528 µl	1.05 ml
SDS 10%	30 µl	30 µl
APS 10%	60 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl

- **Il running gel** (in basso): più concentrato, è il vero mezzo attraverso il quale le proteine vengono risolte.

RUNNING GEL con catalizzatori doppi minigel da 1.5 mm (8 ml/gel)						
	1 GEL			2 GEL		
	7.5%	10%	12,5%	7.5%	10%	12,5%
Acqua	4 ml	3.2 ml	2.5 ml	8 ml	6.4 ml	5 ml
Running gel Buffer pH 8.8	2 ml	2 ml	2 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Acrilammie/bisacrillammide (sol 30%)	2 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5.4 ml	6.6 ml
SDS 10%	80 µl	80 µl	80 µl	160 µl	160 µl	160 µl
APS 10%	49 µl	49 µl	49 µl	98 µl	98 µl	98 µl
TEMED	7.9 µl	7.9 µl	15.8 µl	15.8µl	15.8µl	15.8 µl

La percentuale di acrilammide determina la risoluzione della corsa. Quantitativi maggiori discriminano maggiormente le proteine a basso peso molecolare, essendo il reticolo delle fibre di acrilammide più fitto. Al contrario percentuali minori, discriminano maggiormente proteine con un peso molecolare maggiore.

Una volta preparato, il gel viene fissato all'interno di una camera per elettroforesi, riempita a dovere del tampone di corsa (“running buffer”), la cui composizione è indicata in figura.

SDS-PAGE Buffers

Running buffer, 1x	25 mM tris
	192 mM glycine
	0.1 SDS
	DO NOT ADJUST pH
Sample buffer	62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8
	2% SDS
	25% glycerol
	0.01% Bromophenol Blue
	5% 2-mercaptoethanol or 350 mM DTT (added fresh)

A questo punto si passa al caricamento dei pozzetti, opportunamente lavati per eliminare eventuali filamenti di poliacrilammide, che potrebbero compromettere la corsa. Un'altra accortezza è quella di caricare i campioni in maniera bilanciata, evitando di farli correre da un solo lato del gel. Insieme ai campioni da esaminare viene caricato anche un marcatore di peso molecolare (MWM; molecular weight marker), una miscela di proteine dalla massa nota, che si differenziano per i colori. In particolare in laboratorio si è utilizzato il “Protein Sharpmass High”.

Conclusa la fase di caricamento si avvia la corsa, prima a basso voltaggio, per permettere un adeguato allineamento dei campioni nello stacking, e successivamente a pieno voltaggio.

A corsa terminata, la camera viene svuotata, recuperando il tampone di corsa tramite opportuna filtrazione, e smontata. Il gel è estratto dal supporto in vetro, ritagliato se necessario, e marcato con un segno che ne permette di identificare il verso di lettura. A questo punto esso può essere conservato in frigorifero, immerso in “blotting buffer”, può essere subito trasferito su supporto solido, tramite blotting, oppure può essere colorato per l'immediata rivelazione del segnale.

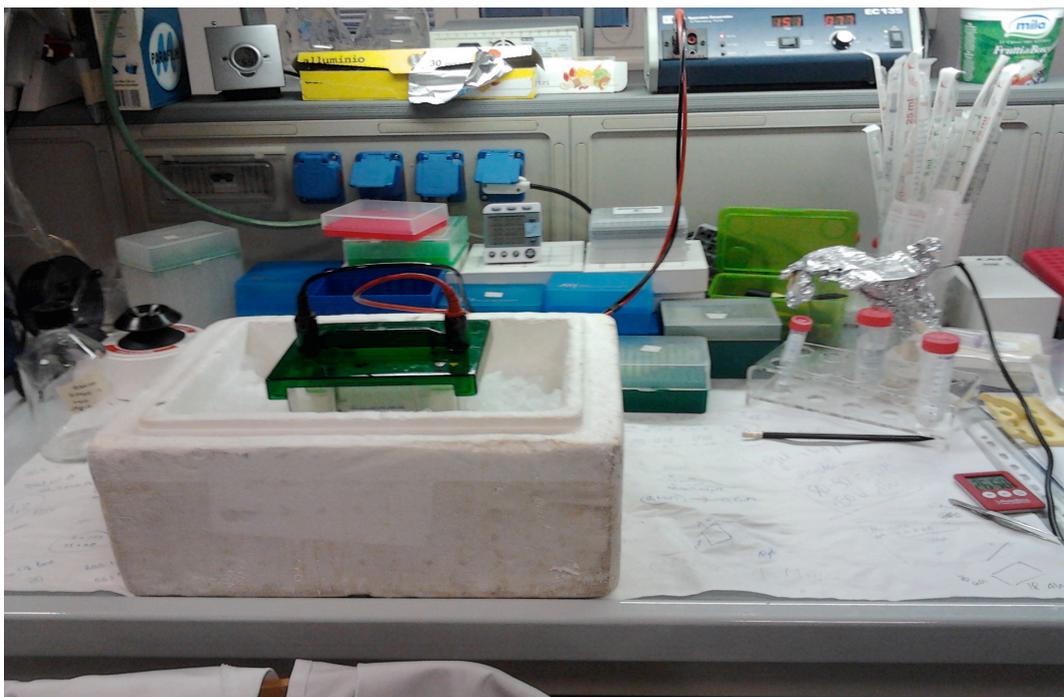


Figura 6. Apparecchiature per SDS-PAGE, immerse in ghiaccio a causa del notevole sviluppo di calore, deleterio per la buona riuscita della corsa elettroforetica.

1.1.2 Colorazione con Coomassie Brilliant Blue

Uno dei principali coloranti in uso per la colorazione delle proteine è il “Coomassie Brilliant Blue”, un colorante blu a base di trifenilmetano, sviluppato in origine per l'industria tessile.

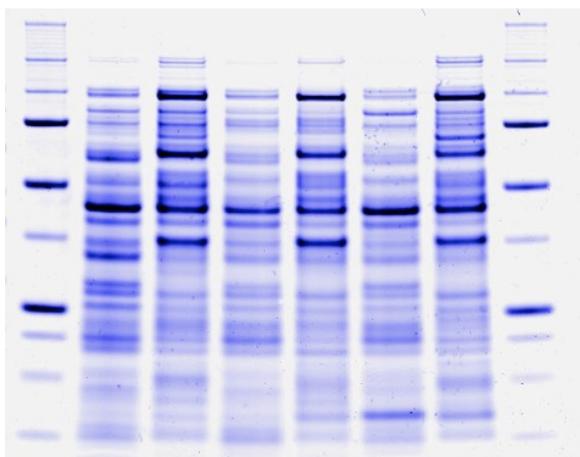


Figura 7. Gel colorato con Coomassie Brilliant Blue blu le proteine.

Il gel, dopo l' SDS-PAGE e gli opportuni lavaggi con acqua deionizzata, viene immerso in una soluzione a base del colorante, con l'aggiunta di metanolo e acido acetico per la fissazione delle bande. Dopo circa 30' in lenta oscillazione a temperatura ambiente, il gel viene trasferito nella soluzione di decolorazione che rimuove l'eccesso di colorante rendendo visibili come bande

Il meccanismo con il quale il Blu di Coomassie rende visualizzabili le proteine dipende dal forte legame del colorante con proteine ricche degli amminoacidi arginina,

istidina e lisina (mentre le glicoproteine, che rappresentano più della metà delle proteine esistenti, legano poco il Coomassie).

1.1.3 La rivelazione del segnale

Per la rivelazione del segnale si è preso in considerazione il densitometro GS-900, anch'esso prodotto e commercializzato dalla Bio-Rad.

Lo strumento, prima di procedere con la scansione del gel colorato, esegue un'auto-calibrazione, grazie alla presenza al suo interno di un target con diverse densità ottiche, che viene scannerizzato e usato per la calibrazione prima di ogni applicazione. Per un'ulteriore calibrazione, l'azienda Bio-Rad fornisce un kit preposto, che utilizza un apposito target tracciabile esterno, secondo gli standard definiti dal "National Institute of Standards and Technology" (NIST), che garantisce la corretta calibrazione dello strumento.

Per la rivelazione dell'immagine il sistema si avvale di un sistema a LED e di una camera CDD ("Charge-Couple Device")¹ a tre colori (rosso, verde e blu), in grado di garantire un'alta accuratezza e riproducibilità dell'immagine con un'ampia gamma di coloranti. Si riportano in tabelle le principali caratteristiche tecniche dello strumento.

Calibration frequency	Automatic calibration before every scan
21 CFR Part 11	Yes (optional software package)
Acquisition software	ImageLab™ software ≥5.0
Light source	LED
Wavelength	400–750 nm
Absorbance range	0.0 to 3.4 OD Transmissive 0.0 to 2.7 OD RD reflective
Transmissive scan area	29 × 33 cm
Reflective scan area	29 × 33 cm
Bit depth	16-bit grayscale
Minimum pixel size	36.3 μm (700 dpi)
Image Lab™ software OS compatibility	Windows XP, 7
Connection type	USB 2.0
Imager dimensions (W x L x H)	62.7 × 37.6 × 18.5 cm
Imager weight	16.1 kg
Applications	Densitometry Calibrated colorimetric gel and blot quantitation

¹ Dispositivo ad accoppiamento di carica (DAC), costituito da un circuito integrato formato da una griglia di semiconduttori in grado di accumulare e trasferire carica elettrica proporzionale all'intensità della radiazione elettromagnetica che li colpisce.

1.2 Criterion Stain Free System.

Il Sistema di visualizzazione “Criterion Stain Free”, brevettato dalla multinazionale “Bio-Rad”, è un’alternativa di nuova generazione alla colorazione con Coomassie per la visualizzazione delle proteine dopo l’SDS-PAGE. Il sistema è composto da 3 elementi:

1. Il gel “Criterion Stain Free”.
2. Il sistema di rivelazione “Criterion Stain Free”.
3. Il Software “Image Lab”, per il quale si rimanda al quarto capitolo della presente opera.



Figura 8. Il Sistema Criterion Stain Free dell'azienda Bio Rad

Il sistema si basa sull’induzione a raggi UV di modifiche ai residui di triptofano, un amminoacido con catene laterali aromatiche, relativamente non polare (idrofobico), contenuti nelle proteine.

Dopo l’elettroforesi, il gel è rimosso dalla cassetta e posto sul rivelatore CSF, dove le proteine separate sono attivate tramite raggi UV, producendo un segnale in fluorescenza. Quest’ultimo è individuato e catturato da una camera CCD. In un intervallo compreso tra i 2,5’-5’, il rivelatore fornisce un’immagine dei marcatori proteici e, usando la linea del marcatore dei pesi molecolari, stima automaticamente il peso molecolare e la quantità di ogni banda proteica individuata.

Dopo l’attivazione, il gel rimane utilizzabile per successive applicazioni, quali l’immunoblot o la colorazione con Coomassie o in argento (“Silver Staining”).

Il gel è di poliacrilammide e presenta una composizione basata sul 4-20% di tris-HCl (Tris-idrossimetilamminometano cloridrato), un sale solubile in acqua, costituito da acido cloridrico e da un amminoalcol. Le specifiche tecniche sono riassunte in tabella.

Gel Specifications

Gel material	Polyacrylamide
Gel dimensions	8.7 x 13.3 cm
Gel thickness	1.0 mm
Resolving gel height	6.5 cm
Cassette dimensions	10.6 x 15.0 cm
Cassette material	Styrene copolymer
Comb material	Polycarbonate
Storage tray material	PET
Upper running buffer volume	60 ml
Lower running buffer volume	800 ml
Storage conditions	Store flat at 4°C; DO NOT FREEZE

Il gel C.S.F. utilizza una tecnologia piuttosto versatile permettendo l'elettroforesi delle proteine sia in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) sia in condizioni native (native-PAGE), senza compromettere le strutture secondaria e la carica intrinseca della proteina. Tale versatilità è dovuta all'assenza nella composizione del buffer dell'SDS, permettendo alla composizione del buffer di caricamento e del buffer di corsa di determinare il meccanismo di separazione.

I Laboratori Bio-Rad hanno, infatti, evidenziato come sia sufficiente inserire SDS solo nel loading buffer (2%) e nel running buffer (0,1%) per saturare le proteine, senza inserirlo nella composizione dei gel.

Il sistema di rivelazione è invece costituito da una camera CCD, un trans-illuminatore a raggi UV, un supporto per i campioni rimuovibile e un'interfaccia USB per il collegamento al calcolatore. Di seguito la scheda tecnica dello strumento:

Table 2. Technical Specifications

Hardware Specifications	
Image Area	13.9 x 9.4 cm
Excitation Source	Trans UV 302
Detector	CCD
Image Resolution (Horizontal x Vertical)	1392 x 940 pixels
Image Pixel Size (in Microns)	100 x 100 um
Dynamic Range	3.0 Orders
Pixel Density (gray levels)	4096
Flat Fielding	Yes
Instrument Size	43 x 28 x 38 cm
Instrument Weight	7.3 kg
Software Specifications	
Operating System Compatibility	Windows XP SP2 or higher or Windows Vista Mac OS 10.5 or higher
Image File Size (MB)	Approximately 2.5 MB
Computer Interface	USB 2.0
Operating Ranges	
Operating Voltage	110/115/230/240 VAC Nominal
Operating Temperature	10-28°C (21°C recommended)
Operating Humidity	< 70% non-condensing

Table 3. Equipment Ratings

Input voltage range	100-240 VAC
Input frequency range	50-60 Hz.
Power	40 W
The Criterion Stain Free Imager is for indoor laboratory use only.	

1.3 Visualizzazione e paragone dei risultati.

Un paragone tra il sistema classico e il “Criterion Stain Free System” mostra una riduzione del 70% del tempo dell’esperimento. Colorazione e decolorazione sono fasi del processo eliminate completamente, mentre il tempo di rivelazione e di analisi dopo l’elettroforesi sono ridotti a 2.5’. L’analisi con il sistema “Criterion Stain Free” è, quindi, quasi 50 volte più veloce del sistema classico.

La quantificazione delle bande tramite Coomassie Brilliant Blue è influenzata dai seguenti fattori:

1. Quantità di colorante usato.
2. Tempo di agitazione.
3. Volumi utilizzati.

4. Cambiamenti in soluzione.
5. Temperatura.

Tutti questi fattori limitano la riproducibilità degli esperimenti, portando a un considerevole aumento della variabilità della quantificazione e, quasi certamente, a una sua sovrastima.

Il sistema “Criterion Stain Free”, invece, non subendo le procedure di colorazione/decolorazione, ha un basso e uniforme background che rende più costanti e riproducibili i risultati.

Nello studio del sistema sono stati considerati i dati, pubblicati dalla stessa Bio-Rad, in merito alla corsa di 3 gel caricati con 13 differenti diluzioni dello stesso standard proteico, con valori compresi tra i 500 e i 0,12 ng per banda.

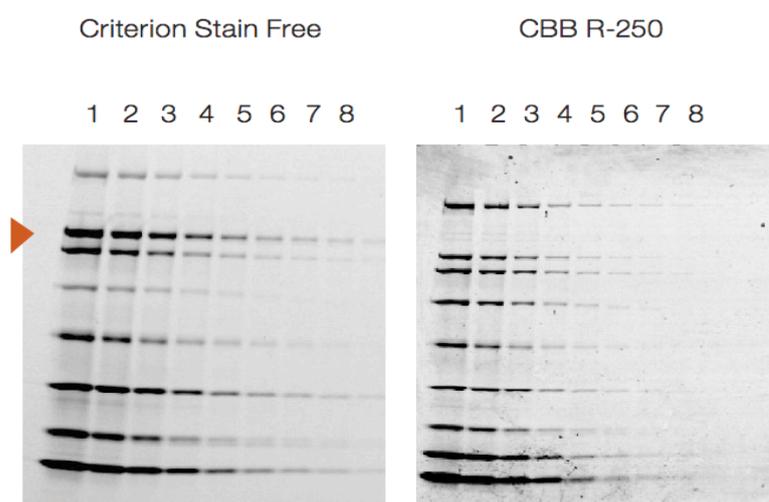


Figura 9. A sinistra visualizzazione della separazione di uno standard proteico, diluito serialmente 1:2 (diluzione complessiva 1:40), rilevato con Stain Free System. A Destra lo stesso gel, colorato con Coomassie Brilliant Blue 250 e rilevato tramite densitometro. La freccia rossa indica la banda relativa al beta-galattosio.

La quantificazione del beta-galattosio è avvenuta prima tramite colorazione con Coomassie Brilliant Blue, utilizzando sia il G-250 sia l’R-250, e successivamente con il rilevatore Criterion Stain Free. In figura è mostrata una maggiore variabilità nella quantificazione che utilizza proprio il Coomassie. **La media percentuale del coefficiente di variazione per tutte le concentrazioni è stata del 4,85% con CSF e del 24% con CBB R-250.**

Risultati simili, affermano ancora i laboratori Bio-Rad, si sono osservati anche con il colorante CBB G-250. **Nella fattispecie la quantificazione del beta-galattosio mostra una % del coefficiente di variazione del 19,7 per il CBB G-250 e del 7,8 con il CSF.**

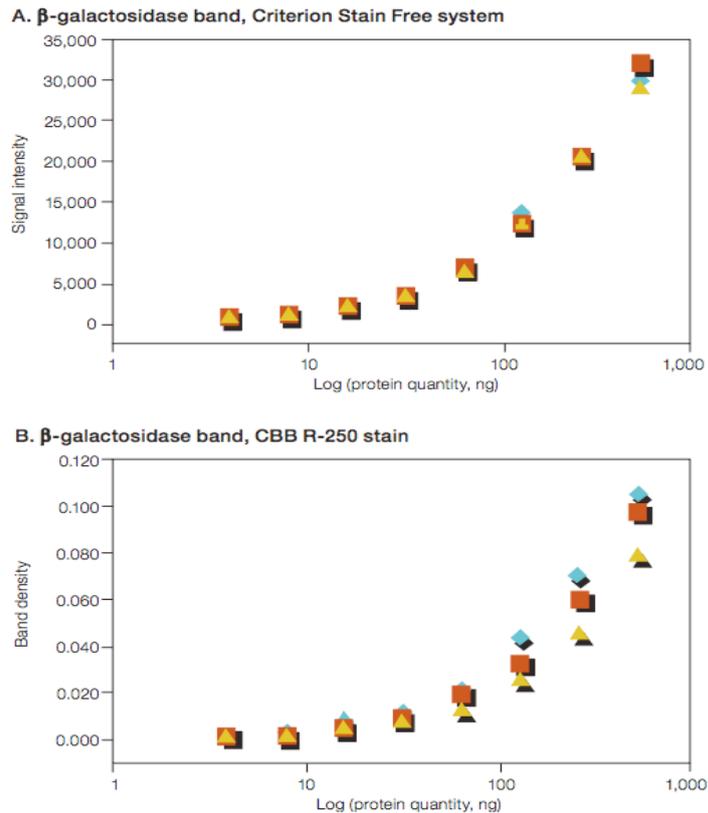


Figura 10. Confronto della variabilità tra la quantificazione del beta-galattosio con sistema Stain Free (sopra) e colorazione con Coomassie (sotto).

La variabilità del sistema CSF rimane, dunque, sicuramente al di sotto della soglia del 20%, presentata dalla colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

Non tutte le proteine però reagiscono con entrambi i sistemi. Per esempio, miosina e la BSA (Bovine Serum Albumin), sono più sensibili alla colorazione con Coomassie, mentre **l'aprotinina non è stata rilevata dal sistema CSF, non presentando i residui di triptofano necessari alla rivelazione.**

Paragonando i risultati sulla sensibilità con i valori di triptofano contenuti è evidente la correlazione tra più alti livelli di triptofano e migliori limiti di rivelazione individuazione usando il CSF.

Tuttavia nella maggior parte degli organismi, le proteine prive di triptofano rappresentano meno del 10% delle proteine comprese tra i 10 e i 260 kDa, range di separazione per la maggior parte dei PAGE.

Gli esami dei predetti proteomi per comuni organismi mostrano che le proteine prive di triptofano sono soprattutto a basso peso molecolare. Se si escludono, dunque, le proteine sotto i 10 kDa, la percentuale di esse prive di triptofano scende a meno del 9% per gli organismi più comuni.

Species	Total Number of Proteins	Number of Proteins Lacking Tryptophan	% of Proteins Lacking Tryptophan	Number of Proteins >10 kD	Number of Proteins >10 kD Lacking Tryptophan	% of Proteins >10 kD Lacking Tryptophan
<i>Homo sapiens</i>	40,827	4,209	10.31	37,548	2,754	7.33
<i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC	4,865	458	9.41	4,754	408	8.58
<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	4,181	456	10.91	3,879	325	8.38
<i>Escherichia coli</i> O6:K15:H31	4,604	562	12.21	4,147	365	8.80
<i>Rattus norvegicus</i>	12,022	1,081	8.99	11,421	745	6.52
<i>Mus musculus</i>	35,344	3,435	9.72	33,262	2,480	7.46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,815	648	11.14	5,563	491	8.83

Figura 11. Dati Bio-Rad in merito all'analisi dei proteomi di alcuni organismi.

2° CAPITOLO

BLOTTING E INCUBAZIONE CON IMMUNOGLOBULINE.

2.1 Il Sistema Classico.

2.1.1 Tank/Wet Blot

Per procedere con l'immunorivelazione delle proteine separate elettroforeticamente, occorre risolvere due problemi di natura meramente tecnica:

1. La fragilità del gel di poliacrilammide.
2. L'impossibilità di raggiungere le proteine, intrappolate all'interno del gel.

Occorre, dunque, procedere al trasferimento delle proteine, tramite blotting.

Il *blotting* si basa sullo stesso principio fisico dell'elettroforesi. Le proteine, in questo caso, devono migrare dal gel a un supporto più resistente, quale una membrana di nitrocellulosa o di PVDF, comunque attraverso l'azione di un potenziale elettrico, diretto ortogonalmente alla direzione del piano in cui è avvenuta la prima corsa elettroforetica. Poiché va mantenuta la stessa risoluzione delle molecole secondo massa/carica realizzata nel gel, particolare attenzione è da prestare alla preparazione del "sandwich", costituito dalla serie "spugna-carta-gel-nitrocellulosa-carta-spugna" come mostrato in figura, onde evitare:

- Un disallineamento tra il gel e la nitro, che potrebbe disperdere le proteine nel blotting buffer, compromettendo l'esperimento.
- La formazione di bolle d'aria, che renderebbero non omogeneo il campo elettrico tra il gel e la membrana, compromettendone la risoluzione.

Un'altra importante accortezza è segnare anche la nitro, in modo da individuarne non solo il verso di lettura, ma anche la superficie sulla quale sono presenti le proteine e dove devono operare gli anticorpi.

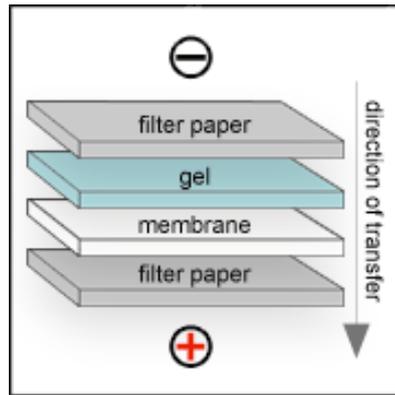


Figura 12. Schema di realizzazione del sandwich per Wet blotting.

Preparato il sandwich nell'apposita cassetta, esso viene sigillato, per permettere una perfetta adesione tra la nitro e il gel, ed immerso, all'interno dell'apposita cassetta, nel blotting buffer, costituito come da composizione indicata nel paragrafo "Specifiche Tecniche".

Uno dei principali problemi del blotting è il quantitativo proteico disperso nel buffer o rimasto intrappolato all'interno del gel. Proteine a bassa concentrazione potrebbero, quindi, essere trasferite ancora più diluite, rischiando di non essere individuabili all'immunorivelazione, dando origine a dei falsi negativi.

2.1.2 Incubazione con anticorpi.

Gli anticorpi, o immunoglobuline, sono delle proteine antigene-specifiche prodotte dalle cellule B del sistema immunitario. Nella pratica biochimica, gli anticorpi costituiscono un formidabile strumento per la valutazione su base strutturale, grazie alla loro capacità di discriminare tra strutture molto simili. Essi vengono utilizzati sia per i saggi in fase solida sia per quelli in fase liquida. Sono, infatti, in grado di legarsi a un ben preciso epitopo (circa 25 amminoacidi) della proteina che si vuole evidenziare.

Nel western blotting, gli anticorpi sono utilizzati due volte. Viene infatti somministrato prima un anticorpo primario, specifico per la proteina da ricercare, e successivamente un secondo anticorpo che individua gli anticorpi primari, amplificando il segnale.

Nel dettaglio, la nitro, dopo essere stata lavata più volte con PBS, subisce prima di tutto un trattamento a base di latte, che permette di minimizzare legami aspecifici degli anticorpi primari. In seguito viene somministrato l'anticorpo primario, opportunamente diluito in una soluzione a base di latte.

Durante l'attività di Tirocinio, per la valutazione del grado di acetilazione degli istoni, i rocchetti proteici attorno ai quali è avvolto il DNA, gli anticorpi primari utilizzati, ad esempio, sono stati:

1. Anti-acetyl-Histone H3: proveniente da un esemplare di coniglio, individua le proteine istoniche H3 acetilate.
2. Anti-acetyl-Histone H4: proveniente anch'esso da coniglio, individua le proteine istoniche H4 acetilate.
3. Anti-GAPDH: Proveniente da un esemplare di topo, esso si lega alle proteine GAPDH, un enzima appartenente alla famiglia delle ossidoreduttasi, che non subisce alcuna modifica a seguito della somministrazione dei farmaci in esame. Esso, infatti, rappresenta il cosiddetto “controllo di carica”, che serve a compensare la variabilità di manipolazione dei campioni.

Somministrati gli anticorpi primari, segue l’incubazione con gli anticorpi secondari, in questo caso anti-topo e anti-coniglio, in grado di riconoscere la “regione costante” dell'anticorpo primario, identica in tutte le immunoglobuline di ogni singola specie animale. L’anticorpo secondario è funzionalizzato, per esempio, con l’enzima perossidasi. Quest'ultimo, a contatto con H₂O₂ (acqua ossigenata), catalizza la reazione:

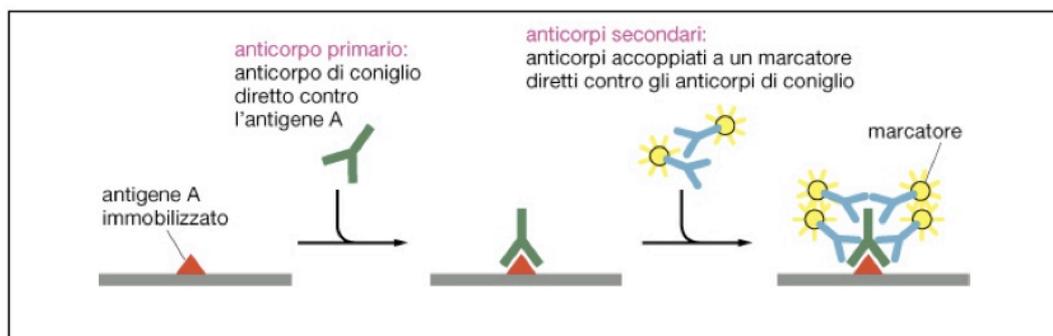
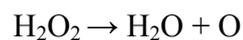


Figura 13. Sistema di riconoscimento con anticorpo primario e secondario

e in presenza di una soluzione a base di acqua ossigenata e luminolo, l'ossigeno liberato, legandosi al luminolo, permette l'emissione di fotoni ovvero di un segnale chemiluminescente, in grado di impressionare una lastra fotografica o un opportuno fotorilevatore.

Alla fine dell'esperimento anticorpo primario e secondario possono essere recuperati, in modo da essere utilizzati in successivi test, comportando un risparmio economico non indifferente, dato il costo delle immunoglobuline sul mercato.

Infine, la membrana di nitrocellulosa può essere anch'essa riutilizzata, dopo esser stata trattata con un tampone che rimuove gli anticorpi.

2.1.3 Specifiche tecniche.

Materiali consumabili utilizzati:

Nitrocellulosa.

Buffer per Blotting: composto di tris-HCl, **metanolo**, glicina e acqua deionizzata.

Buffer TBS-Tween 0,05%: composto di tris-HCl, cloruro di sodio, Twen20 e acqua deionizzata.

Latte in polvere commerciale.

Anticorpi primari.

Anticorpi secondari.

Tempistiche:

Blotting: 1h20'.

Incubazione con Latte. 1h o O/N.

Incubazione con primario: 1h o O/N.

Lavaggi: 3*3'.

Incubazione secondario: 30'.

Lavaggi: 3*3'.

TOTALE: minimo 4h/massimo 12h.

2.2 Trans-Blot Turbo.



Figura 14. Trans Blot Turbo. Costo del solo strumento 1.940,00 €

Il sistema Trans-Blot Turbo è un sistema ultra-rapido (3'-10') per il trasferimento di proteine dal gel a membrane in assenza di metanolo, il più semplice degli alcol, tossico, che può indurre depressione del sistema nervoso centrale mentre i suoi metaboliti (formaldeide e acido formico) sono responsabili di danni al nervo ottico e alla retina.

La tecnologia per il trasferimento è definita “semi-dry” in quanto, a differenza del wet blotting, non avviene in immersione in un tampone, ma quasi a secco, essendo solo la carte filtro all’interno del sandwich imbevute di buffer da blotting.

Lo strumento si presenta semplice ed intuitivo, con un' alta capacità di elaborazione, in grado di eseguire contemporaneamente il trasferimento di 4 gel piccoli (8.6 x 6.7 x 0.1 cm) o di 2 gel medi (13.3 x 8.7 x 0.1 cm), anche sfasati nel tempo. La procedura è anche molto più veloce del metodo classico, il tank blot, permettendo il trasferimento di un gel mini in 3', di 4 mini e 2 medi in 7', per il blotting di proteine comprese 5 e i 150KDa, e in 10' per quelle tra i 25KDa e i 300+ KDa. È possibile eseguire i protocolli pre-impostati dal produttore, comunque modificabili in base all'esigenze, ed è utilizzabile anche per il wet blot, con prestazioni comprese tra i 30' e i 60'. L'efficienza del trasferimento permette il blotting di concentrazioni di proteine fino a 1.25ng, secondo i dati forniti del produttore, con un incremento del 75% rispetto al tank blot..

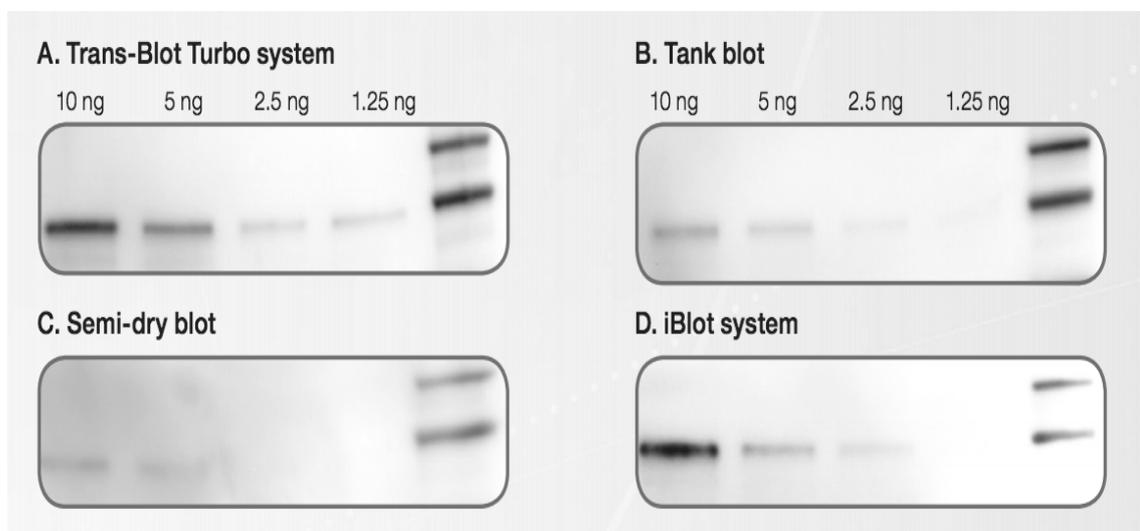


Figura 15. Diverse diluzioni di una mix proteica separate su gel Criterion TGX 4-20% e trasferite utilizzando 4 differenti tipi di blotting: A, Trans Blot Turbo (25 V per 3'); B, TankBlot (100V per 30'); C, Semi-Dry (25V per 30'); D, iBlot (P3 per 7'). Dati Bio-Rad.

Le cassette rimovibili sono costituite da due lastre di elettrodi che fungono da anodo, in platino, e da catodo, in acciaio inox, e possono ospitare o due gel mini o uno midi. Tutto l'avanzamento del processo è visualizzabile sullo schermo LCD, posto sulla parte anteriore dello strumento.

Il sistema non prevede alcuna tecnologia per l'incubazione con le immunoglobuline, che, dunque, deve avvenire secondo il protocollo classico.

2.3. iBlot: Dry Blot.

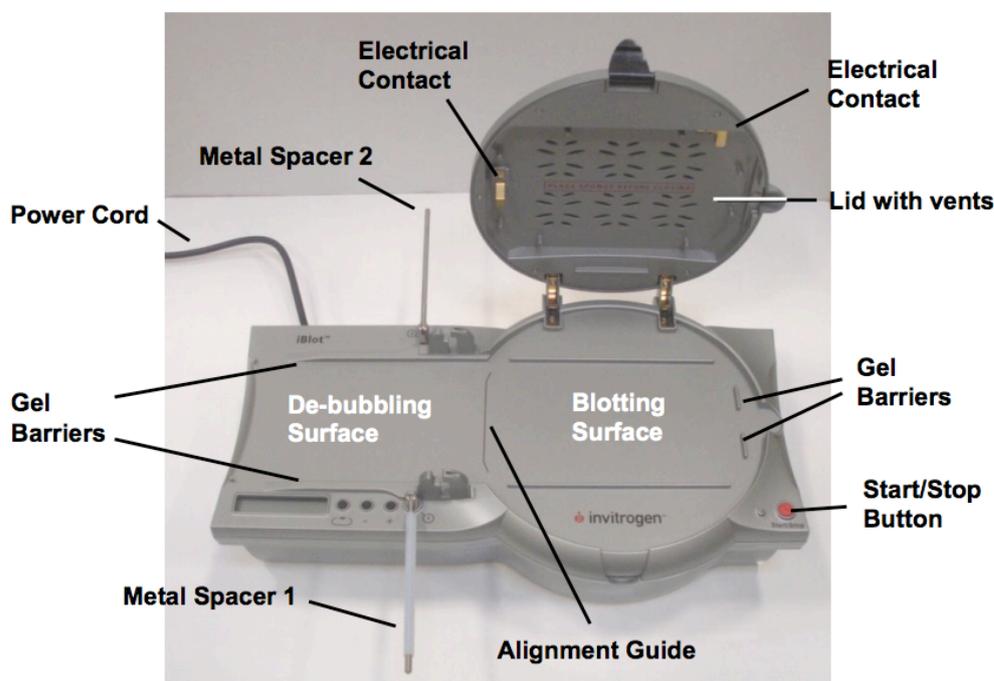


Figura 16. Schema componenti iBlot. Costo dell'apparecchio 1.290€.

Lo strumento iBlot, prodotto dall'azienda "Invitrogen", è un altro sistema ultraveloce di blotting, sia di proteine che di acidi nucleici. Esso permette, inoltre, di eseguire le procedure successive del western blot, relative alla somministrazione degli anticorpi, in tempi decisamente ridotti rispetto allo standard.

La tecnologia utilizzata è quella del "dry blot", ovvero del blotting in assenza di tamponi e di metanolo. Il sistema iBlot è, tuttavia, poco flessibile, essendo compatibile solo con i gels prodotti dalla stessa Invitrogen, dal costo non indifferente, indicativamente, di 188€ per 10 mini gel da 10 pozzetti NuPage a 380€ per 10 midi gel da 48 pozzetti E-PAGE. Per ulteriori informazioni si rimanda al sito dell'azienda.

I gels sono venduti in apposite confezioni, contenenti la membrana (in PVFD o nitrocellulosa per il blotting di proteine e in Nylon per il DNA-blotting) per il trasferimento, un elettrodo di rame e gli opportuni buffer per anodo e catodo.

La tecnologia di trasferimento a secco è realizzabile, poiché gli stack di anodo e catodo incorporano i rispettivi tamponi per la fornitura di ioni. Inoltre, l'anodo di rame non produce ossigeno gassoso a seguito dell'elettrolisi dell'acqua, aumentando la consistenza del trasferimento. Infine, il design dell'apparecchio è tale per cui la

distanza tra gli elettrodi e il sistema di alimentazione integrato siano posti ad una distanza ridotta. Ciò permette la generazione di un campo di alta intensità ed un aumento della velocità di trasferimento.

Si riporta di seguito un esempio, fornito dal produttore, di blotting tramite iBlot:

Lane	Sample
2, 3, 4, 5, 6, and 26, 27, 28, 29, 30	BSA (5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng, and 100 ng)
8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, and 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41	MagicMark™ XP Western Protein Standard (0.5 µL, 1 µL, 2 µL, and 4 µL)
19, 20, 21, 22, 23, and 43, 44, 45, 46, 47	SW480 Human Colon Cancer cell lysate (0.5 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg, and 8 µg)

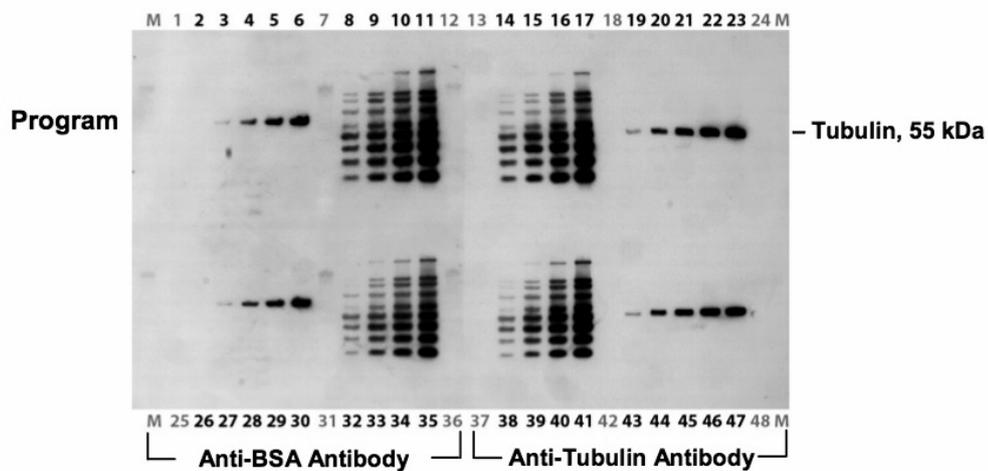


Figura 17. Esempio di blotting e immunorivelazione per chemiluminescenza con iBlot. Dati Invitrogen.

Confrontando i dati con quelli visti in precedenza per il TransBlot Turbo, è evidente la maggiore efficienza di trasferimento dell'apparecchio della Bio-Rad, capace di trasferire finanche 1,25 ng, rispetto all'iBlot dell'Invitrogen, che si ferma, come mostrato in figura, al trasferimento di 10ng. **Il TransBlot Turbo è, dunque, otto volte più efficiente dell'iBlot.**

Tuttavia il sistema dell'Invitrogen permette anche l'immunorivelazione delle bande proteiche, in soli 8 minuti, con un risparmio di tempo complessivo almeno dell'80%.

	Sistema Classico	IBlot
Saturazione (Blocking)	1-8h(O/N)	2'
Ab 1ario	1h	3'
Lavaggio	20'	Non previsto
Ab 2ario	30'-1h	3'
Lavaggio	20'	20'
TOTALE	MAX 10h	28'

Tabella 1. Confronto delle prestazioni del sistema iBlot con il sistema di immunorivelazione per diffusione

Le prestazioni di cui sopra sono possibili grazie all'utilizzo di una nuova procedura di incubazione con anticorpo che prevede l'utilizzo di apposite piastre usa e getta, imbevute di anticorpi, che ne velocizzano la diffusione su tutta la membrana di trasferimento, tramite l'applicazione di un campo elettrico, atto a velocizzare la migrazione degli anticorpi verso i propri antigeni, sul modello di quanto avviene per la procedura di blotting. Le immunoglobuline secondarie sono marcate con l'enzima fosfatasi alcalina (AP) o perossidasi e rilevate per chemiluminescenza. I pacchetti preconfezionati dall'Invitrogen hanno, però, un costo notevole, di circa 150€ per 10 applicazioni.



Figura 18. In figura uno dei passaggi per incubazione con immunoglobuline con lo strumento iBlot..

2.4 SNAP.



Figura 19. Sistema SNAP. Costo: 1200,00€

Lo SNAP, brevettato dall'azienda "Millipore", è uno strumento velocissimo che permette l'esecuzione del blotting e dell'immunoincubazione in soli 22 minuti.

Il sistema aumenta l'esposizione delle proteine, intrappolate nella membrana, alle immunoglobuline, velocizzando notevolmente il sistema classico, basato sul principio della diffusione, utilizzando la tecnologia "vacuum-driven system", un sistema di aspirazione, che permette la realizzazione di un flusso guidato, sotto vuoto, degli anticorpi attraverso la membrana.

Si riporta di seguito un esempio delle prestazioni dello SNAP, fornito dal produttore. La figura si riferisce al western blot di un lisato cellulare di fibroblasti di topo, per l'immunorivelazione dell'anisomicina trattata e del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Il blocking dei siti aspecifici è avvenuto tramite somministrazione di latte scremato in polvere, preparato in un tampone salino, contenente lo 0,1% di Tween. La procedura è stata replicata con l'esecuzione del protocollo SNAP da 1h, del protocollo SNAP da 30' e con il protocollo di immunorivelazione standard. Le immagini sono state rilevate tramite esposizione su lastra per un minuto.

Il sistema riesce a rilevare fino a 0,63 ng di proteina.

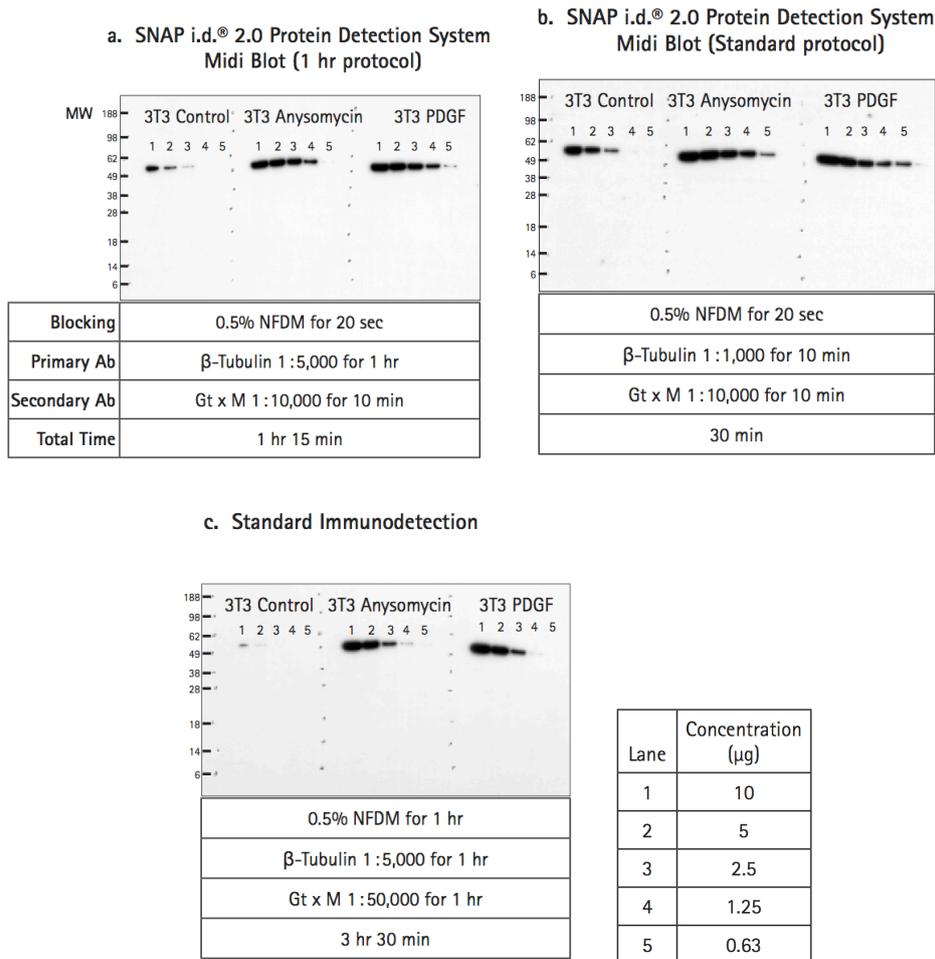


Figura 20. Dati Millipore sulle prestazioni dello SNAP. A. immunorivelazione con protocollo SNAP da 1h; B, immunorivelazione con protocollo SNAP da 30'; C, immunorivelazione con procedure standard.

3° CAPITOLO

IMMUNORIVELAZIONE DEL SEGNALE.

3.1 La natura del segnale.

Il segnale prodotto dall'immunorivelazione dipende dalla tipologia di marcatori utilizzati durante l'immunoincubazione.

Nella fattispecie, sono qui stati esaminati le seguenti tipologie di segnale, da cui dipende la tecnologia impiegata per la loro rivelazione:

Tipologia	Marcatore	Attivazione	Segnale
Colorimetrico	Enzima	Chimica	Precipitato colorato
Chemiluminescente	Enzima	Chimica	Radiazione luminosa
Fluorescente	Fluoroforo	Radiazione elettromagnetica	Radiazione elettromagnetica

Tabella 2. Principali tipologie di fenomeni luminescenti.

I metodi di rilevamento più comuni utilizzano anticorpi secondari coniugati a fosfatasi alcalina (AP) o perossidasi di rafano (HRP). In questi metodi, quando si aggiunge il substrato enzimatico, avviene la formazione sul blot o di un precipitato colorato (rivelazione colorimetrica) oppure un prodotto fluorescente o chemiluminescente, in cui il segnale luminoso è catturato su pellicola o con un sistema di imaging digitale.

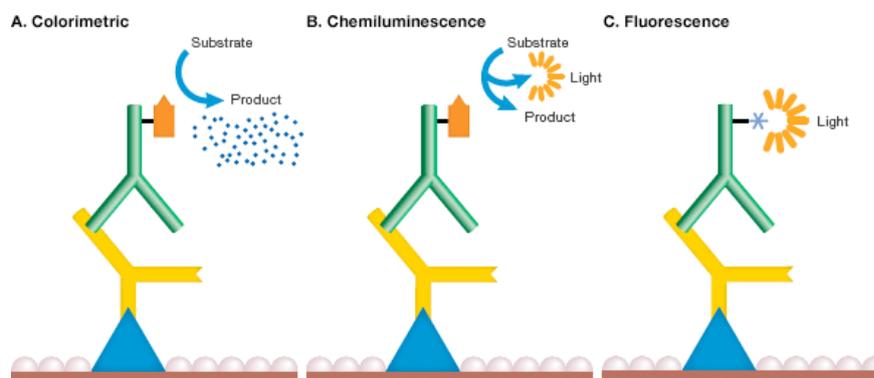


Figura 21. Sistemi di rivelazione immunologici.

Nel secondo capitolo (Paragrafo 2.1, pag. 31) è stato già esaminato il meccanismo di generazione di un segnale per chemiluminescenza, mentre nel primo capitolo

(Paragrafo 1.2, pag. 26), con riferimento alla tecnologia “Criterion Stain Free”, è già stato citato il segnale a fluorescenza per transilluminazione a raggi UV.

Per ciò che concerne il segnale colorimetrico, enzimi, come AP e HRP, possono convertire diversi substrati in un precipitato colorato, in corrispondenza del sito di legame tra l’antigene e l’anticorpo primario o secondario. Il precipitato accumulato sul blot, rappresenta un segnale colorato, facilmente visibile a occhio nudo. La reazione enzimatica può essere monitorata e arrestata al raggiungimento del segnale desiderato. Il rilevamento colorimetrico è più facile da usare rispetto a metodi di rilevamento basati su pellicola, che richiedono prove ed errori nella determinazione degli adeguati tempi di esposizione e utilizza materiali costosi, come la pellicola per raggi X e di prodotti chimici per lo sviluppo in camera oscura. La rivelazione colorimetrica è considerata un metodo di media sensibilità rispetto al rilevamento radioattivo o per chemiluminescenza. La dissolvenza delle macchie dopo l’esposizione alla luce, l’inibizione dell’attività delle HRP a causa dell’azide, un azoturo utilizzato come preservante per fluidi biologici (plasma, siero, diluizioni anticorpali ed altri campioni biologici contenenti proteine) e la precipitazione in siti di legami aspecifici, rappresentano le principali limitazioni nella sensibilità del sistema colorimetrico.

Enzima	Substrato
HRP	4-cloro-1-naftolo (4CN)
	3, 3'-diaminobenzidina (DAB)
AP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)
	Nitro-blu-tetrazolio (NBT)

Tabella 3. Principali marcatori enzimatici e relativi substrati.

I vantaggi, invece, dell’utilizzo di un segnale chemiluminescente rispetto ad altri metodi sono la velocità e la sensibilità. Questo metodo è ideale per l’imaging CCD, che ha tempi di esposizione tipiche compresi tra i 5’’ e i 5’, a seconda della sensibilità del substrato. La rivelazione è possibile fino a quantitativi di femtogrammi di proteine, dimostrando una maggiore sensibilità rispetto alla maggioranza dei sistemi colorimetrici e paragonabile al rilevamento radioisotopico. La sensibilità di rilevamento dipende dall’affinità della proteina con l’anticorpo primario, l’anticorpo secondario e il substrato HRP, e può variare da un campione all’altro.

Nel caso della fluorescenza, i marcatori delle immunoglobuline secondarie sono i **fluorocromi**, o fluorofori, molecole che, dopo avere assorbito fotoni di una certa lunghezza d’onda (frequenza di eccitazione), esibiscono fluorescenza, ovvero emettono a loro volta fotoni ad un’altra lunghezza d’onda (frequenza di emissione), di norma

superiore e, dunque, con minore energia. In figura un semplice esempio del meccanismo di fluorescenza. La radiazione emessa può essere rilevata tramite opportuni sensori e tradotta in un'immagine.

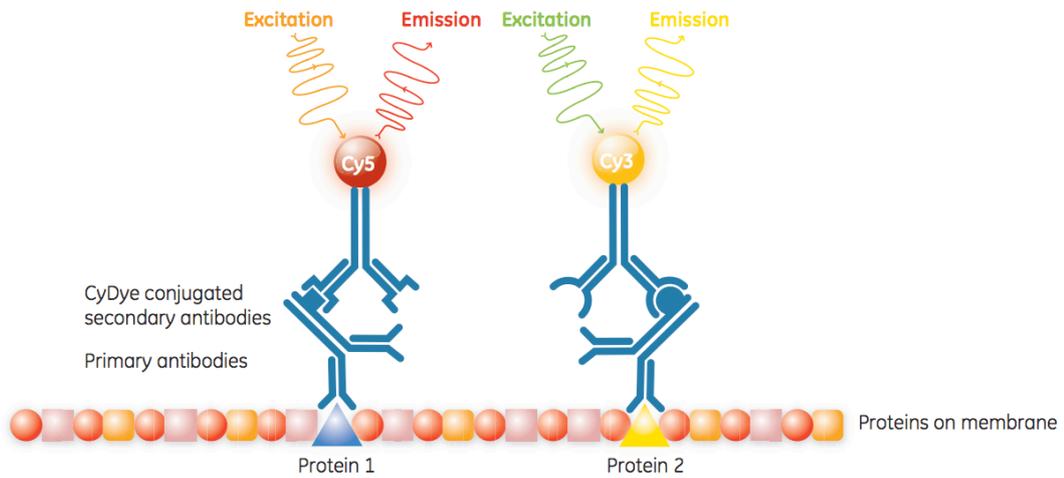


Figura 22. Meccanismo di funzionamento del fenomeno della fluorescenza.

Nella rivelazione di un segnale a fluorescenza, un anticorpo primario o secondario è marcato con un fluoroforo, utilizzato durante immunorivelazione. Una sorgente di luce eccita il fluoroforo e il segnale fluorescente emesso è catturato da un sensore ed elaborato per produrre l'immagine finale. In fluorescenza, un fotone ad alta energia ($h\nu_{ex}$) eccita un fluoroforo, inducendolo a lasciare lo stato fondamentale (S_0), raggiungendo un più alto stato di energia (S'_1). Parte di questa energia viene dissipata, permettendo al fluoroforo di entrare in uno stato di "eccitazione rilassata", ad un livello

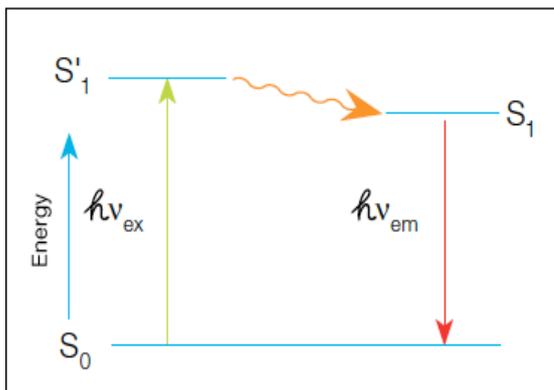


Figura 23. Schema di eccitazione ed emissione di un fluoroforo.

energetico (S_1) leggermente inferiore allo stato S'_1 . Un fotone di luce viene, dunque, emesso ($h\nu_{em}$), restituendo il fluoroforo allo stato fondamentale. Il fotone emesso possiede minore energia (e maggiore lunghezza d'onda) a causa della dissipazione di energia durante lo stato di eccitazione.

Nella rivelazione per fluorescenza, bisogna tenere presente le seguenti caratteristiche per l'ottimizzazione del segnale:

1. **Rendimento quantico** (o efficienza quantica): misura l'efficienza di emissione di fotoni dopo l'assorbimento di un fotone. I processi che restituiscono il fluoroforo allo stato fondamentale, ma non comportano l'emissione di un fotone fluorescente abbassano la resa quantica. Fluorofori con elevate rese quantiche sono più luminosi.
2. **Coefficiente di estinzione** - misura di quanto bene un fluoroforo assorbe la luce a una specifica lunghezza d'onda. Come per la resa quantica, fluorofori con elevati coefficienti di estinzione sono di solito più luminosi
3. **Spostamento di Stokes** – esprime la differenza massima tra la lunghezza d'onda di eccitazione e quella di emissione di un fluoroforo. Maggiore è lo spostamento di Stokes, minore è la sovrapposizione tra l'onda di eccitazione e quella di emissione, aumentando il segnale rilevato.
4. **Spettri di eccitazione ed emissione** - sono diagrammi dell'intensità di fluorescenza di un fluoroforo all'interno del range delle lunghezze d'onda di eccitazione. È opportuno scegliere fluorofori che possono essere eccitati dalla fonte di luce dell'imager e che hanno spettri di emissione che possono essere catturate dallo strumento. Quando si esegue western multiplex, è necessario evitare il fenomeno del crosstalk², ovvero la sovrapposizione degli spettri dei fluorofori utilizzati.

Diversi sono i vantaggi nell'utilizzo di segnali fluorescenti. Utilizzando fluorofori con spettri d'emissione adeguatamente distinti è possibile eseguire le rivelazioni di più segnali contemporaneamente (multiplexing), per la visualizzazioni di più bande proteiche in fluorescenza.

Altro parametro significativo è il **range dinamico**, fino a 10 volte maggiore rispetto ai segnali chemiluminescenti, con una **maggiore linearità** entro i limiti di rilevabilità.

Infine molte molecole fluorescenti sono **stabili** per un lungo periodo, permettendo la memorizzazione del segnale per una nuova immagine in un secondo momento, anche settimane o mesi dopo, senza perdite di segnale rilevanti.

Tra i fluorofori di sempre maggior uso nella pratica biochimica vi sono le **cianine**, molecole dall'evidente potere colorante, solubili e fluorescenti. In grado di restare

² Diafania(crosstalk): fenomeno per il quale si crea un'interferenza (rumore) in un circuito multicanale, dovuta alla variazione di corrente in un canale indotta dalla radiazione elettromagnetica prodotta dalla variazione di corrente in un canale adiacente.

stabili per settimane, esse presentano una risposta perfettamente lineare alla concentrazione del campione. Cy5 e Cy3 sono le cianine più utilizzate ed emettono rispettivamente nel giallo-verde (~550 nm per l'eccitazione, ~570 nm in emissione) e nel rosso (~650/670, ~649 nm).

3.2 Il Problema della rivelazione del segnale.

Giunti a questo punto della trattazione è possibile definire con più precisione il problema a valle del processo di immunorivelazione, ai fini di una corretta quantificazione.

La scelta del marcatore per l'immunoincubazione è infatti un parametro importante nella determinazione del segnale, solo in parte proporzionale alla concentrazione del campione proteico, ai fini di una corretta quantificazione del campione. Si è già parlato dei limiti di rilevabilità della colorazione tramite Coomassie e della tecnologia "Stain Free" rispettivamente per le glicoproteine e le proteine prive, o scarsamente dotate, di triptofani, quali la BSA. Anche il segnale chemiluminescente è influenzato da fattori che esulano dalla concentrazione del campione target, quali i tempi di saturazione dell'immagine o la presenza di processi d'inibizione enzimatica, limitanti per l'azione di AP e HRP. Inoltre alcune proteine possono essere marcate e visualizzate solo tramite specifiche sonde, mentre altre sono facilmente rilevabili con diversi marcatori, enzimatici o fluorescenti.

L'analisi in multiplexing per la rivelazione di più proteine diversamente marcate risente notevolmente dei presenti problemi tecnologici, richiedendo una versatilità degli strumenti, soddisfatta solo dalle ultime tecnologie, come vedremo nel proseguo del presente capitolo.

Inoltre costi, efficienza, risoluzione e stabilità dei marcatori hanno un'alta variabilità: ad esempio i fluorofori sono molto più fotostabili e meno dispendiosi (fino ad un decimo) rispetto ai marcatori chemiluminescenti. Inoltre la rivelazione di proteine con pesi molecolari uguali, o differenti di soli pochi kDa, in multiplexing è impossibile sia per marcatori colorimetrici sia per quelli chemiluminescenti, in quanto essi emettono solo luce bianca, impossibile da distinguere.

Uno studio recente dei laboratori Syngene evidenzia proprio l'importanza della definizione delle condizioni ottimali di rivelazione, per un'uniforme quantificazione dei campioni.

Il suddetto studio, di cui si riportano i risultati in figura, prendono in considerazione 4 replicati del dot blot di 1 µl di ciascuno dei seguenti coloranti Cy3 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), DyLight™ 405, DyLight™ 448,

DyLight™ 549, DyLight™, 594, DyLight™ 633, DyLight™ 649, DyLight™ 680 and DyLight™ 800 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), tutti coniugati con anticorpo di capra anti-uomo, mentre il blotting è stato eseguito a secco per 10 minuti. La rivelazione è avvenuta tramite lo strumento dell'azienda Syngene "G:Box", di cui si tratterà nel prossimo paragrafo.

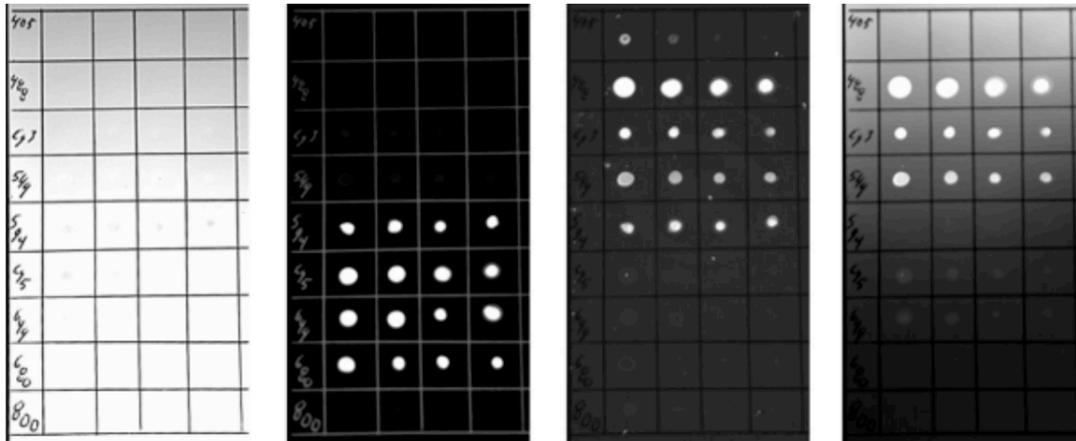


Figura 24. Confronto tra sistemi di rivelazione di diversi marcatori.

Le immagini sono state rivelate rispettivamente, da sinistra verso destra, con:

1. Luce bianca, senza filtri.
2. Luce rossa e filtro FRLP.
3. Raggi UV a onda lunga e filtro SWSP.
4. Luce blu e filtro SWSP.

Nella prima immagine, sono solamente intravedibili i coloranti DyLight 549, 594 e Cy3, a causa del background bianco, assolutamente sconsigliabile per questo tipo di colorazione.

Nella figura successiva, sono, invece, ottimamente visualizzati i coloranti DyLight 594, 633, 649 e 680, mentre i primi 4 e l'ultimo colorante non sono rivelati.

L'utilizzo dei raggi UV e del filtro SWSP (terza visualizzazione) produce invece un'immagine accettabile per DyLight 405, 488, 549 e Cy3. Tuttavia il DyLight 549 non è perfettamente definito ed è presente un alone luminoso intorno ai punti, tale da renderne preferibile la rivelazione tramite luce rossa e filtro FRLP.

La luce blu, combinata con il filtro SWSP, produce un segnale rilevante per Cy3 e DyLight 549. I risultati sono riassunti in tabella.

Lighting and filter	DyLight 405	Dylight 488	Dylight 549 Cy3	Dylight 594	Dylight 633	Dylight 649	Dylight 680	Dylight 800
White lighting without filter	x	x	√	√	x	x	x	x
Epi-Red and FRLP	x	x	x	√	√	√	√	x
LW-UV and SWSP	√	√	√	√	x	x	x	x
Epi-Blue and SWSP	x	√	√	√	x	x	x	x

È evidente come la scelta dei marcatori, in base anche al loro sistema di rivelazione, è un aspetto decisivo per una corretta e, soprattutto, uniforme quantificazione.

Strumenti che permettono l'acquisizione di segnali di natura diversa, sono certamente preferibili a rilevatori, anche più sensibili o ad una più alta risoluzione, ma adatti solo alla rivelazione di specifici segnali.

Un altro studio condotto dai laboratori Syngene, fornisce un altro esempio del legame tra la quantificazione e la tecnologia impiegata per l'immunorivelazione.

Si vogliono confrontare i dati concernenti, la quantificazione di

1. BSA (triptofano 0,3%).
2. Acido Carbonico³ (triptofano 2,3%)
3. Lisozima⁴ (triptofano 3,4%)

tramite tecnologia "Stain Free" e colorazione con "ProtoBlue Safe" (prodotto dall'azienda "GeneFlow", UK).

I campioni, contenente una miscela di BSA, acido carbonico e Lisozima, diluita diverse volte (da 338 a 2.64 ng), sono caricati su gel "Criterion Stain Free" 4-20%, dopo essere stati preparati in Laemmli buffer⁵, con marcatore di corsa ColorBurst, e bolliti a 70° per 10 minuti.

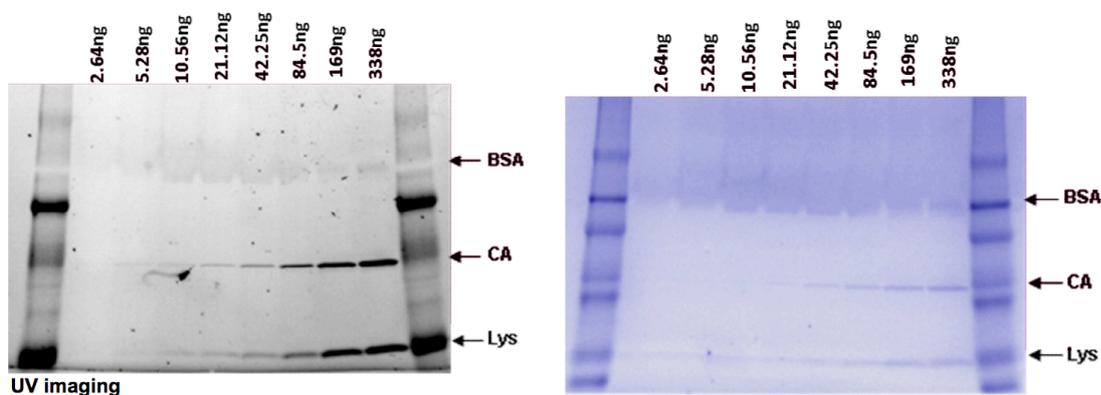
Il gel è stato poi visualizzato tramite "G:Box", con un'esposizione di 5' a raggi UV (502 nm). Dopo è stato colorato tramite "ProtoBlue Safe" e rilevato nuovamente tramite "G:Box".

³ Principale prodotto di scarto della decarbossilazione di amminoacidi e chetoacidi e, in quantità maggiori, del ciclo di Krebs come prodotto ultimo dell'ossidazione a fine energetico del carbonio degli zuccheri, dei grassi e delle proteine.

⁴ Enzima di 14,4 kDa presente in tessuti animali dotato di attività battericida.

⁵ Soluzione a base di Tris-HCl contenente glicerolo, SDS, beta-mercaptoetanolo e il colorante blu di bromofenolo utilizzata per il caricamento dei campioni proteici in elettroforesi su gel di poliacrilammide.

Si riportano in tabella i limiti di rilevabilità dei due sistemi per ciascuna delle proteine in esame.



	Protein	Limit of Detection (LOD) (ng)	Linearity (R ²)
Stain Free	BSA	10.56	0.958
	CA	2.64	0.9975
	Lysozyme	5.28	0.982
ProtoBlue Safe	BSA	2.64	0.9526
	CA	21.12	0.9349
	Lysozyme	21.12	0.9494

In riferimento ai dati visibili in tabella, i limiti di rilevabilità delle tecnologie differiscono notevolmente. Pertanto è quanto mai opportuno uno studio approfondito in merito alla tipologia di marcatori da utilizzare in un Western Blot, in relazione a tutti gli aspetti fin qui analizzati.

Inoltre è evidente la differenza dei valori del background e di definizione, tra le due immagini. L'opportuna valutazione di questi valori nell'analisi densitometrica rappresenta l'ennesimo problema relativo ad un'omogenea quantificazione. Questo aspetto del problema sarà argomento del 4° capitolo della presente opera.

3.3 Sistemi analogici.

Il segnale chemiluminescente, prodotto dai marcatori in fase solida utilizzati nell'immunoincubazione, può essere rilevato e visualizzato tramite sistemi digitali o in modo analogico, tramite lo sviluppo su pellicola foto-impressionabile.

La rivelazione del segnale, tramite sviluppo su lastra, è un processo concettualmente semplice, che richiede però una certa abilità e velocità di esecuzione. Inizialmente si distribuisce sulla membrana, su cui è avvenuta l'immunoincubazione, una soluzione di

luminolo e acqua ossigenata in maniera omogenea. Il luminolo comincia, quindi, ad emettere immediatamente fotoni, in corrispondenza delle perossidasi, o di altri marcatori analoghi, e quindi degli antigeni ricercati.

La membrana è dunque asciugata e inserita in un'apposita cassetta dotata di schermo intensificatore. Si passa, dunque, in camera oscura, ove si inserisce con cura una lastra fotografica, anch'essa segnata per individuarne il verso di lettura, all'interno della cassetta contenente la nitro. Da una prima rivelazione è possibile determinare il tempo di esposizione adeguato per una buona risoluzione del segnale, senza che esso venga saturato.

Una volta ottenuta la lastra con l'opportuna esposizione, essa deve essere digitalizzata tramite un opportuno scanner come il GS-900, le cui prestazioni sono state esaminate in dettaglio nel paragrafo 1.1 della presenta opera.

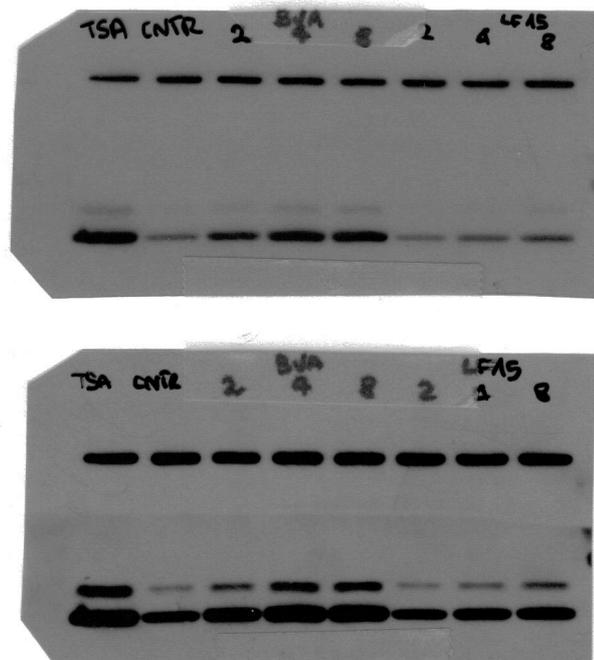


Figura 25. Scannerizzazione di due lastre, impressionate con segnale chemiluminescente.

3.4 Sistemi digitali.

3.4.1 ChemiDoc MP.

Il "ChemiDoc MP", prodotto dall'azienda Bio-Rad, è un sistema d'imaging molto flessibile, in grado di rilevare segnali colorimetrici, chemiluminescenti, fluorescenti, nel rosso, nel verde, nel blu e a UV. Esso è, inoltre, compatibile con la tecnologia

“Stain Free” per la visualizzazione delle proteine, immediatamente dopo la corsa elettroforetica.

Il sistema, la cui scheda tecnica è riportata in fondo al paragrafo, è costituito da 3 elementi principali: una telecamera ad accoppiamento di carica per l’acquisizione di immagini real-time, posizionata nell’estremità superiore dello strumento, la camera a tenuta di luce, basata sulla tecnologia “Universal Hood III”, e il supporto estraibile per l’inserimento dei campioni.



Figura 26. ChemiDoc Mp. Bio-Rad.

diaframma. Un algoritmo controlla lo MZL, permettendo la messa a fuoco automatica, mentre una lente con diottria⁶ +1 è installata all’interno del MZL, per permettere al campione di essere sempre visibile.

La tecnologia Universal Hood III permette la cattura di immagini fluorescenti e chemiluminescenti senza il passaggio in camera oscura. L’involucro è dotato di luce bianca per l’epi-

La camera CCD a 16 bit super-sensitive è dotata di un sistema di raffreddamento per la rivelazione dei segnali più deboli, basata su una cella di Peltier, un dispositivo termoelettrico costituito da molte giunzioni ad effetto Peltier in serie, che assorbono calore da un lato e lo rilasciano dall’altro, in base al verso di scorrimento della corrente. La camera monta uno zoom motorizzato (MZL), che consente la regolazione a distanza delle funzioni di controllo dell’obiettivo, quali lo zoom, la messa a fuoco e la regolazione del

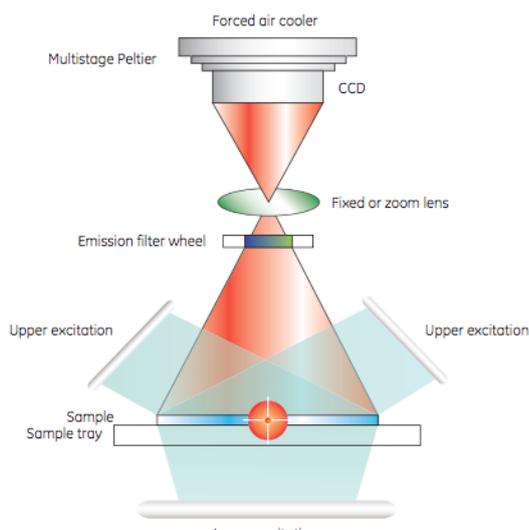


Figura 27. Schema di una camera CCD.

⁶ In ottica, esprime la capacità di un sistema ottico di modificare le direzioni dei raggi di luce entranti per focalizzarli e formarne un’immagine, ad una certa distanza dal centro del sistema ottico stesso (distanza focale). Il numero di diottrie di una lente o di un sistema ottico è pari all’inverso della distanza focale espressa in metri.

illuminazione, permettendo l'illuminazione del campione in qualsiasi modalità, e un trans-illuminatore a raggi UV. Può contenere fino a sei filtri d'emissione diversi per le applicazioni in fluorescenza, mentre un filtro standard è utilizzato per le applicazioni meramente colorimetriche.

Il sistema è, inoltre, capace di rilevare accuratamente la posizione del campione, in modo da ottimizzare la rivelazione dell'immagine automaticamente. Anche il campo è regolato autonomamente in modo da ottenere una profondità di campo nulla (campo piatto), per un'uniformità di immagine superiore e una quantificazione più accurata.

Grazie alla tecnologia impiegata, il rapporto "segnale-rumore" dei trasferimenti è, dunque, incrementato fino all'83% rispetto alla rivelazione su pellicola, mentre il fenomeno della diafania è quasi del tutto assente, essendo i canali isolati.

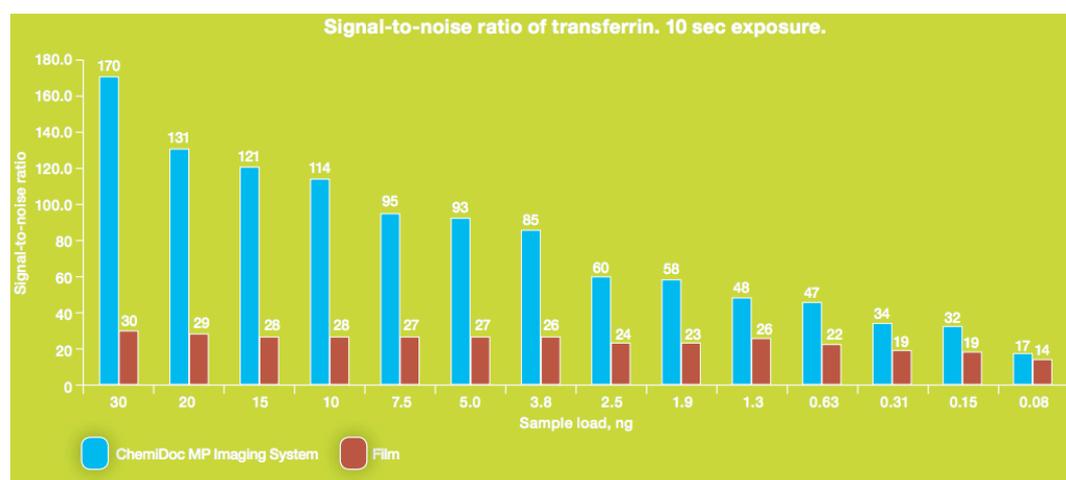


Figura 27. Andamento rapporto segnale-rumore, in base alla quantità di campione caricato.

Lo strumento monta un set di filtri con un sistema di multicolorazione a LED, che permette la rivelazione di molti fluorofori disponibili sul mercato, indicati in tabella.

Fluorescenza	Coloranti
Red	Cy5, Cy5.5, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680, DyLight 649, DyLight 680, IRye 680.
Green	Cy3, Flamingo, Krypton, Pro-Q Diamond, Alexa Fluor 546, DyLight 549, Rodamina.
Blue	Cy2, Coomassie Fluor Orange, Alexa Fluor 488, DyLight 488, Pro-Q Emerald 488, Qdot 523, Qdot 605, Qdot 625, Qdot 705.

Tabella 4. Coloranti rilevabili tramite ChemiDoc MP.

La procedura di acquisizione dell'immagine è totalmente guidata, tramite protocolli pre-configurati o definiti dall'utente, utilizzando il software Image Lab, di cui si discuterà più dettagliatamente nel quarto capitolo.

Il software permette di definire tutti i parametri di acquisizione, monocolore o multicolore, per una rivelazione ottimale dell'immagine. È possibile, quindi, selezionare il tipo di supporto ("Nucleic Acid gels", "Protein gels", "Blots"), il tipo di reagente utilizzato, in base ai quali il sistema definirà automaticamente la sorgente di illuminazione e il filtro da utilizzare. Seguono le impostazioni relative al tempo di esposizione e alla tipologia di colore con cui elaborare l'immagine (es. scala di grigi).

È utilizzabile anche uno strumento per l'esposizione automatica, che stima un tempo di esposizione ottimale e garantisce il miglior utilizzo del range dinamico, per la rivelazione di tutte le bande ("Intense Bands") o per la rivelazione anche dei segnali più deboli ("Faint Bands"), a scapito di una possibile saturazione dei segnali più forti.

Il sistema è anche in grado di visualizzare in rosso, eventuali porzioni di blot, in cui il segnale si è saturato, come mostrato nell'immagine sotto.



Figura 28. In rosso sono evidenziati i pixel in cui il segnale è saturato.

Per la rivelazione di un segnale chemiluminescente è possibile, invece, utilizzare il "signal accumulation mode" (SAM), un sistema utilizzato per semplificare la cattura di una buona immagine da un campione chemiluminescente. Questo tipo di campione richiede spesso lunghi tempi di posa, per ottenere un'immagine che rappresenti la

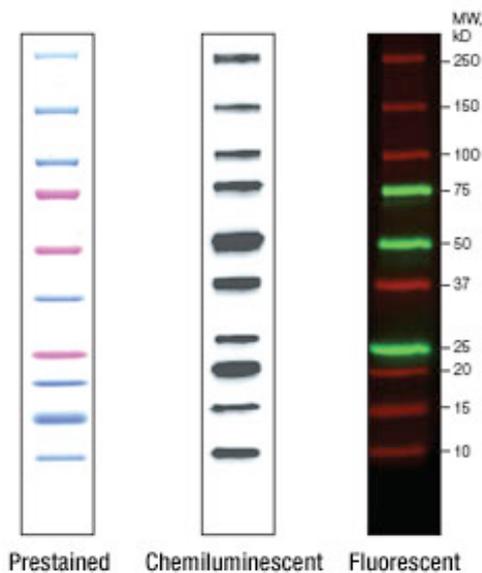


Figura 29. Esempio di rivelazione tramite colorazione, chemiluminescenza e fluorescenza dello stesso campione.

migliore gamma di tutti i segnali, comportando quindi una perdita di tempo. Il SAM permette l'acquisizione di un'immagine del campione, in diversi istanti, fissati i tempi di esposizione (minimo e massimo) e il n° di frame da realizzare.

Seguono le impostazioni per l'esecuzione dei protocolli d'individuazione delle bande e per la quantificazione, che saranno esaminate nel 4° capitolo.

ChemiDoc MP Technical Specifications

Applications	
Chemiluminescence	Yes
Fluorescence*	Yes
Colorimetry/densitometry	Yes
Gel documentation	Yes
Hardware Specifications	
Maximum sample size	<ul style="list-style-type: none"> ■ Length: 28 cm ■ Width: 36 cm
Maximum image area	<ul style="list-style-type: none"> ■ Length: 26 cm ■ Width: 35 cm
Maximum image area for standard, UV-excited gels	<ul style="list-style-type: none"> ■ Length: 25 cm ■ Width: 26 cm
Excitation source	<ul style="list-style-type: none"> ■ Trans-UV and epi-white are standard (302 nm included, with 254 and 365 nm available as options). ■ Optional trans-white conversion screen. ■ Optional XcitaBlue™ UV/blue conversion screen. Blue, green, and red epis.
Detector	Supercooled CCD
Pixel size (H x V in microns)	6.45 x 6.45
Cooling system	Peltier cooled
Camera cooling temperature	-30°C controlled
Filter selector	<ul style="list-style-type: none"> ■ 6-position filter wheel ■ 1 without filter for chemiluminescence
Emission filters	<ul style="list-style-type: none"> ■ 1 included (standard) ■ 3 optional (530, 605, 695)
Dynamic range	>4.0 orders of magnitude
Pixel density (gray levels)	65,535

3.4.2 ImageQuant LAS 4000.



Figura 30. ImageQuant Las 4000.

L'ImageQuant Las 4000 è, invece, il prodotto di punta per la rivelazione di immagini dell'azienda "GE- Healthcare". Lo strumento presenta le stesse funzionalità del ChemiDoc MP, salvo la rivelazione di gels in tecnologia "Stain free".

La risoluzione è elevata, fino a 6,3 MPel (3072 × 2048 pixel) e una profondità di fuoco pari a 480 mm. Il rumore di fondo è ridotto grazie al sistema di raffreddamento a -30°

C.

La quantificazione è uniforme ed è possibile eseguire rivelazioni multiplex. La sensibilità è tale da permettere il rivelamento anche di 40 ng di proteine:

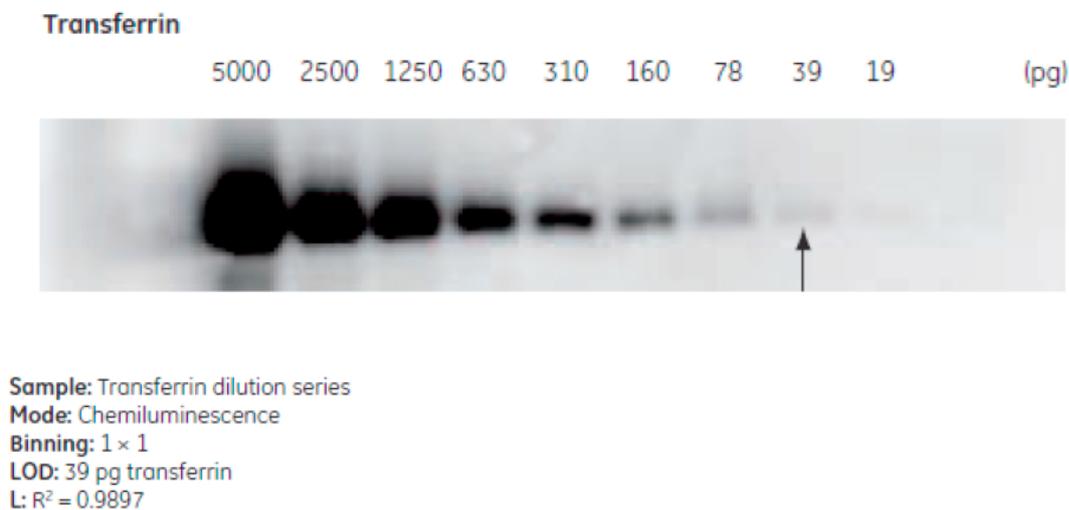
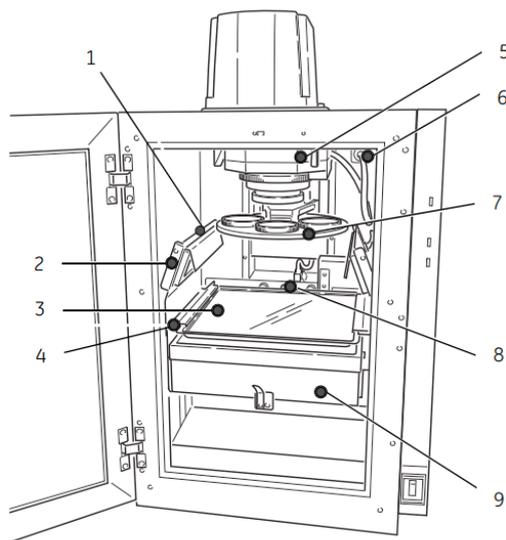


Figura 31. Determinazione del limite di rivelazione di ImageQuanti Las 4000.

Al suo interno lo strumento monta:



1. Connettore all'alimentazione IDX dell'epi-illuminatore.
2. Epi-illuminatore:
 - a. Infrarosso (710 nm)
 - b. Red (630 nm)
 - c. Green (520 nm)
 - d. Blue (460 nm)
 - e. Modulo RGB a LED.
 - f. UV (365 nm)
 - g. Luce bianca.
3. Supporto per il campione.
4. Supporto mobile per un miglior posizionamento del campione.
5. Lenti:
 - a. F0.85/43 mm.
 - b. F1.8/24 mm.
6. Connettore delle lenti all'alimentazione.
7. Sistema automatizzato, gestito tramite software, dei filtri, di cui i più utilizzati sono:
 - a. Alexa (per NIR LED)

- b. Cy5 (per i red LED)
 - c. Cy3 (per i green LED)
 - d. EtBr (per ibromuro di etidio⁷)
 - e. Un filtro per la proteina GFP⁸)
 - f. Un filtro per i blue LED
 - g. L41 UV (per UV LED)
8. Connettore del trans-illuminatore e della luce bianca all'alimentazione.
 9. Trans-illuminatore a raggi UV (312nm).

3.4.3 G:Box XR5.



Il “G Box”, prodotto dall’azienda Syngene, è un sistema per l’acquisizione di immagini di gel, filtri (nitrocellulosa, PVDF e nylon) e colonie cellulari, in chemiluminescenza, fluorescenza e tramite trans-illuminazione UV. È compatibile anche con la rivelazione di segnali colorimetrici ed anche della tecnologia “Stain Free”.

Il cuore dello strumento è una camera CCD, con una risoluzione compresa tra i 1.4m pixel e gli 8.3m pixel, con un sistema di raffreddamento, analogo a quello utilizzato nel ChemiDoc MP, per le rivelazione anche dei segnali più deboli.

Il range dinamico è di 4,8 OD, maggiore di quasi il 25% rispetto al ChemiDoc Mp, unica sostanziale differenza tra i due strumenti.

Anche questo strumento monta delle lenti motorizzate, per il controllo in remoto, e fino a 7 filtri per la luce.

Il software abbinato allo strumento è il “GeneSys” e permette, come ImageLab, di eseguire scansioni e rivelazioni in maniera del tutto automatica, settando gli input e gli output dello strumento. Anche per questo strumento sono disponibile algoritmi e

⁷ Il bromuro di etidio è una molecola intercalante di acidi nucleici (DNA e RNA) utilizzata comunemente nell'elettroforesi su gel di agarosio. Quando è esposto ai raggi ultravioletti, infatti, esso è in grado di emettere fluorescenza che si intensifica di quasi 20 volte se intercalato nel DNA.

⁸ Proteina espressa nella medusa *Aequorea victoria*. La GFP, se colpita e eccitata da una radiazione ad una specifica lunghezza d'onda, è in grado di riemettere luce di colore verde acceso.

protocolli per l'acquisizione pre-impostati o definiti dall'utente. Le prestazioni e le funzionalità di GeneSys non saranno però trattate nella presente opera.

4° CAPITOLO

DENSITOMETRIA E QUANTIFICAZIONE.

4.1 Densitometria: cenni teorici.

L'analisi densitometrica consiste nello studio di schemi quantitativi e qualitativi di distribuzioni di mappe d'intensità di livelli di grigio delle componenti delle immagini da esaminare.

I sistemi d'imaging creano uno o più file per ciascun campione durante l'acquisizione dell'immagine. La dimensione dei file dipende dalle dimensioni fisiche del campione e dalla risoluzione digitale. L'immagine è, dunque, acquisita in forma digitalizzata ed in differenti formati: gli elementi caratteristici sono la **risoluzione di acquisizione** o visualizzazione (espressa in pixel per inch) ed il **tipo** (B/N, scala di 16 o 256 grigi o colori, milioni di colori), che identifica la profondità del colore, ovvero la quantità di informazioni associata ad ogni pixel (es.: 8 bit per pixel = 256 colori). Il sistema a 16 bit per pixel (bpp), utilizzato in tutti i rivelatori esaminati nel 3° capitolo, utilizza 5 bit per rappresentare il rosso e 5 bit per rappresentare il blu, ma 6 bit per rappresentare il verde: ciò è dovuto al fatto che l'occhio umano è più sensibile al verde che al rosso e al blu. In questo modo si possono ottenere fino a 65.536 colori diversi ($32 \times 32 \times 64$). L'unità base, il pixel, è identificata in un'immagine dalla sua posizione relativa (x, y) e dalle sue caratteristiche di colore/intensità (R,G,B o Gray Level).

Le immagini a colori sono rappresentate o tramite **coordinate cromatiche RGB**, mediante i colori primari Red, Green e Blue, o mediante i principali fattori di percezione umana del colore, convenzionalmente chiamati Hue (**tinta**), Saturation (**saturazione**) e Intensity (**intensità**), nell'insieme detti **coordinate cromatiche HSI**. Nel formato convenzionale RGB, un'immagine è rappresentata, in ogni pixel considerato, come l'intensità di questi tre colori base. Quando tutti i tre colori valgono

zero, il colore dell'oggetto è nero; quando tutti i tre colori sono al valore massimo, il colore dell'oggetto è bianco. Livelli uguali di R, G e B generano il grigio.

Utilizzando operatori matematici di discriminazione sulla matrice binaria di digitalizzazione o criteri di soglia densitometrici (es. livello di grigio) è possibile isolare i diversi elementi dell'immagine, oppure ottenere informazioni sulla distribuzione intensitometrica che li costituiscono.

Per le immagini in toni di grigio, la segmentazione è realizzata analizzando l'istogramma della scala di grigio: diversità e discontinuità nella scala di grigio stanno a indicare precise variazioni del grado di luminosità dell'immagine e quindi forti differenze fra gli oggetti e lo sfondo.

Le caratteristiche di tessitura sono definite dalla distribuzione spaziale di livelli di grigio in una zona. Ai fini dell'analisi dell'immagine, la tessitura è definita come una ripetizione di variazioni locali dell'intensità dell'immagine, soltanto finemente distinguibili come oggetti separati alla risoluzione considerata.

Il passaggio cruciale nell'analisi dell'immagine è la misura. Mediante adeguati algoritmi di calcolo matriciale si caratterizzano gli elementi isolati (perimetro, area, shape factor, dimensione minima e massima) e successivamente si possono ottenere informazioni statistiche sulla loro distribuzione.

Le misure derivabili dall'applicazione dell'analisi dell'immagine sono di due tipi, quelle che si riferiscono a proprietà specifiche (“**feature specific measurement**”) e quelle concernenti parametri globali (“**global measurement**”).

4.2 Principi e problematiche della quantificazione.

I software di analisi permettono, innanzitutto, la visualizzazione dell'immagine, la regolazione del contrasto e la stampa o l'archiviazione dell'immagine, con tutte le eventuali modificazioni. In genere sono presenti gli strumenti analitici adatti per il **dimensionamento dei frammenti**, la **quantificazione**, la definizione e analisi di modelli e la generazione dei **report di analisi**. Sono ovviamente disponibili anche le funzioni d'utilità d'immagine comuni, come la rotazione, l'inversione dei pixel e il ritaglio.

Esso determina la corretta area di visualizzazione in base alle dimensioni digitali dell'immagine, senza influenzarne le caratteristiche originali. È possibile regolare il **contrasto** e la **luminosità** ai fini di un'ottimizzazione della visualizzazione. Alti o bassi livelli di grigio, o di colore, possono essere utilizzati per aiutare la visualizzazione

dell'immagine all'interno del range di visualizzazione d'interesse. Aumentando i valori bassi, ad esempio, il background e il rumore possono essere attenuati, mentre l'aumento del contrasto migliora la visualizzazione dei segnali più deboli.

In genere è anche possibile la visualizzazione e l'elaborazione sia mono sia multicanale, per la quantificazione di più immagini, sia visualizzati singolarmente che sovrapposti. Ad esempio, in figura 33, è possibile osservare la sovrapposizione di due immagini, la prima chemiluminescente, esito di un immunoblot e la seconda colorimetrica relativa ai marcatori di peso di molecolare dello stesso blot, rivelata tramite scansione a luce bianca.

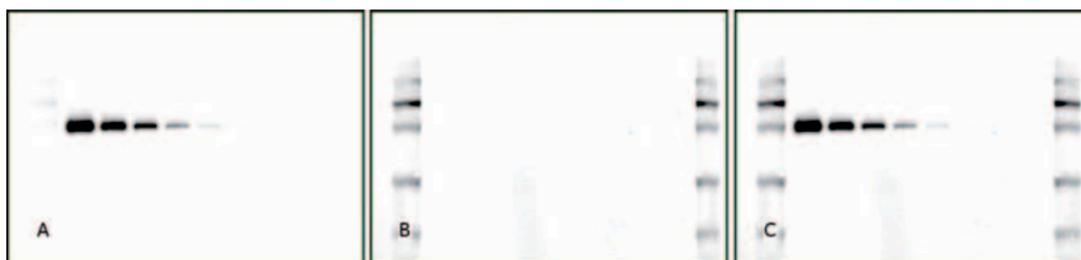


Figura 32. Esempio di sovrapposizione multicanale.

Il software permette l'analisi d'immagini anche poco definite, con aree imprecise, difficilmente quantificabili a causa della saturazione dei pixel. In questi casi è, però, consigliabile l'esecuzione di una nuova rivelazione dell'immagine, con tempi di esposizione minori, per esempio, per evitare o minimizzare il fenomeno della saturazione. Ai fini di una migliore acquisizione dell'immagine, per una risoluzione maggiore o per evidenziare maggiormente un segnale, è possibile, inoltre, selezionare l'area della scansione, stabilire la dimensione dei pixel, scegliere filtri o laser maggiormente adeguati al tipo di segnale da rivelare.

Il background, lo sfondo dell'immagine, è una delle principali caratteristiche da correggere prima di procedere con la quantificazione. La natura del background può variare notevolmente, secondo fattori, quali:

1. La chimica di rivelamento utilizzata.
2. La matrice del campione (gel, membrana, micropiastre).
3. Integrità e qualità del campione.

Nel caso della rivelazione tramite fluorocromi, a causa dell'altissima sensibilità del segnale fluorescente, il background può presentarsi anche notevolmente marcato, soprattutto se il campione è stato oggetto di movimenti durante l'imaging.

Il background, comunemente, appare caratterizzato da:

1. Un segnale uniforme in tutta l'immagine.

2. Regioni irregolari o chiazze non uniformi.
3. Picchi di rumore.
4. Segnale a bande.

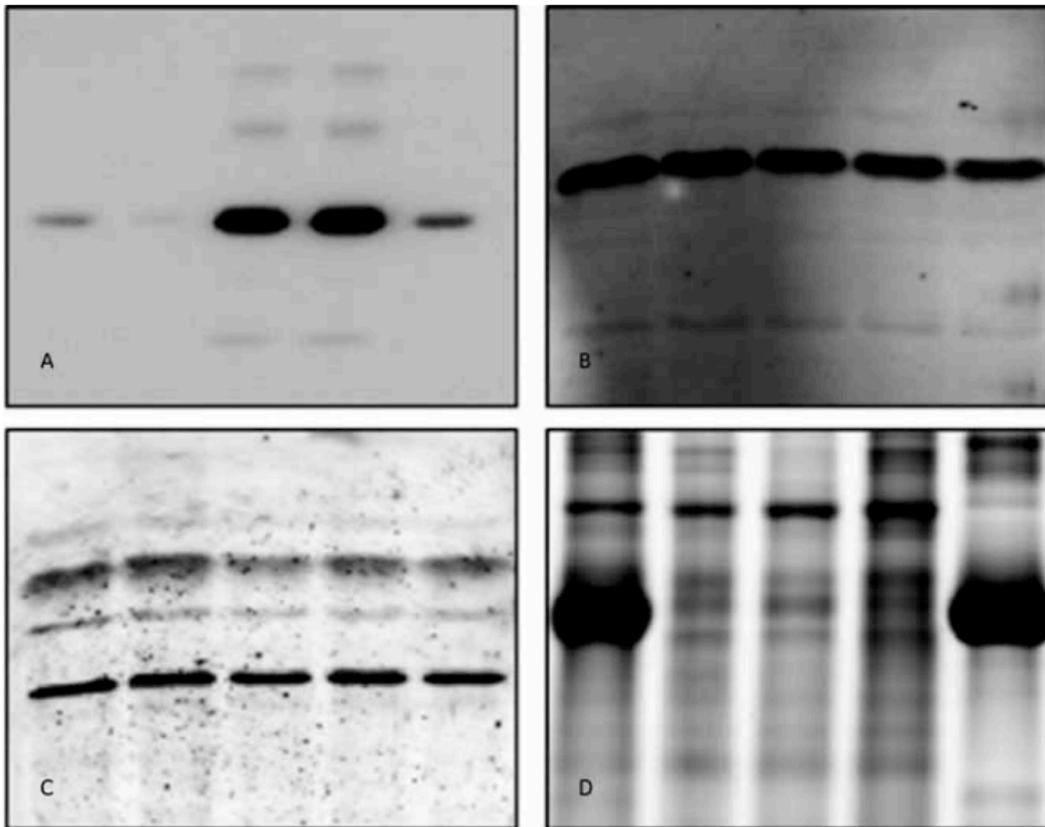


Figura 33. Tipologie di background. A, uniforme. B, a chiazze; C, granulato; D, a bande.

In base alla tipologia di background sono possibili due tipologie di analisi differenti: locale o globale.

L'analisi locale è opportuna in presenza di un gradiente del background, variabile da area ad area. Nella fattispecie il calcolo del background da sottrarre al valore del target (banda o punto), viene calcolato tramite una media del valore dei grigi dei pixel in un intorno di esso, selezionato dall'utente. Tuttavia se tale intorno è troppo a ridosso del target, si rischia di sottostimare il segnale; al contempo se essa è troppo grande può portare a segnali inaspettati, inficcienti ai fini della quantificazione.

Se, invece, il background è uniforme, è possibile procedere con l'applicazione dello stesso valore di background per l'intera immagine. Tale valore è determinato dal valore minimo del segnale nel profilo dell'immagine oppure tramite una media dei valori dei grigi in un'area specifica dell'immagine selezionato dall'utente. Tuttavia, se

nell'immagine sono presenti dei rumori, quali per esempio dei picchi di segnale, questi contribuiscono alla definizione del rumore di fondo. Il calcolo del background sarebbe quindi sovrastimato e, sottratto al segnale da rivelare, porterebbe a una sottostima della quantificazione.

È pertanto preferibile un'analisi del background locale, per una più fedele analisi del segnale.

Corretto il background, è possibile procedere con la quantificazione vera e propria.

In genere nei gels o blots ogni linea o corsia rappresenta un campione.

L'analisi di un'intera miscela proteica, come ad esempio per un'immagine proveniente da un gel "Stain free", è valutata sommando i contributi delle singole bande. In base, poi, alle posizioni delle bande, in relazione al marcatore dei pesi molecolari utilizzato, è possibile determinare parametri come la dimensione dei frammenti, il peso molecolare o il punto isoelettrico.

La determinazione dei volumi, invece, avviene in proporzione al calcolo del volume complessivo del campione, determinato dall'area della corsia di ciascun campione. Questo approccio può essere realizzato automaticamente, in presenza di corsie perfettamente definite, oppure in modo manuale, in base ai risultati della corsa elettroforetica e delle condizioni a contorno.

La rivelazione di un segnale chemiluminescente, invece, consta, in genere, del seguente protocollo:

1. Individuazione delle corsie di corsa.
2. Sottrazione del background.
3. Individuazione delle bande.
4. Calibrazione delle dimensioni molecolari.
5. Normalizzazione rispetto a un parametro di controllo.

In merito alla normalizzazione, a titolo di esempio, si prenda la rivelazione del segnale prodotto dalla proteina GAPDH, di cui si già parlato nel Paragrafo 2.1.2 "Incubazione con anticorpi", pag. 30, e che rappresenta il "controllo di carica".

I valori di acetilazione degli istoni H3 e H4, uniche proteine rivelate, oltre naturalmente al GAPDH, sono rapportate al valore del controllo di carica, proprio per compensare la variabilità di manipolazione dei campioni. Il rapporto tra due grandezze è definito **raziometrico**.

In genere, nella valutazione di un proteoma, insieme ai campioni da analizzare e ai marcatori di peso molecolare, si possono inserire altri campioni di cui si conosce già una o più caratteristiche, quali per esempio il "controllo" e il "controllo positivo". In

questo modo è possibile razionalizzare i risultati ottenuti rispetto a un parametro di cui si conoscono già l'autenticità e l'affidabilità.

Ancora una volta si fa riferimento all'attività di tirocinio, a titolo d'esempio. Nella suddetta sede dovevano essere validati dei farmaci per l'inibizione delle de-acetilasi istoniche, degli enzimi il cui meccanismo d'azione non è argomento di quest'opera, che avrebbero dovuto portare ad una sovra-espressione delle proteine istoniche H3 e H4 nel proteoma di cellule di glioblastoma immortalizzate. In questo caso, insieme ai campioni di proteine, provenienti da cellule a cui erano stati somministrati i suddetti farmaci, sono stati analizzati, meramente per fattori legati alla quantificazione, anche:

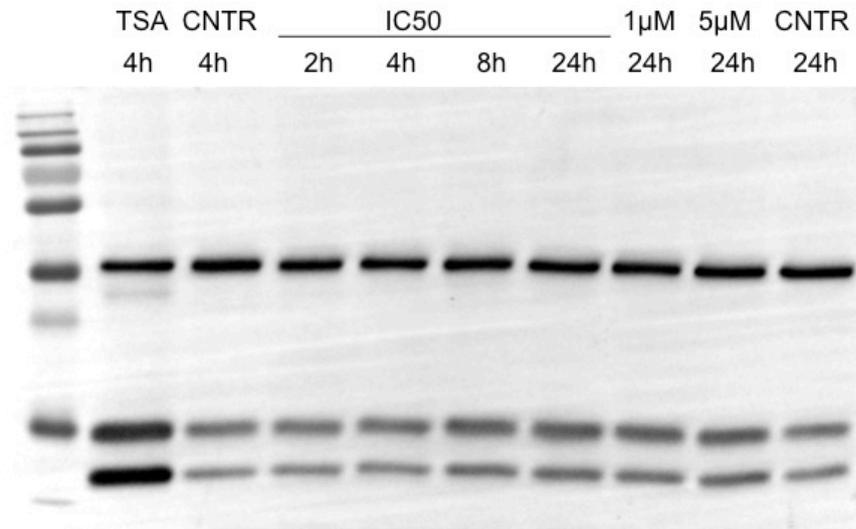
1. Un campione di proteine provenienti da una coltura cellulare cui non è stato somministrato alcun farmaco e che funge quindi da controllo, in relazione al quale poter valutare eventuali modificazioni del proteoma.
2. Un campione di proteine provenienti da una coltura cellulare cui è stato somministrato un farmaco (Tricostatina A, TSA) dalle comprovate capacità inibitorie nei confronti delle de-acetilasi istoniche, che rappresenta il controllo positivo, con cui poter confrontare i risultati ottenuti con i farmaci sperimentali.

Si riporta, per chiarezza, l'immagine del suddetto immunoblot, acquisita tramite ChemiDoc MP. In corsia, da sinistra verso destra: 1, il MWM; 2, Il controllo positivo (TSA); 3, il controllo a 4 ore; da 4 a 9, campioni con farmaco a diverse concentrazioni e con tempi di somministrazione diversi; 10, controllo a 24h.

Le bande più alte rappresentano il controllo di carica (GAPDH), mentre quelle più in basso sono rispettivamente gli istoni H3 acetilati e gli istoni H4 acetilati.

È proprio questo che s'intende per normalizzazione di un campione rispetto a un parametro, indispensabile per un'analisi qualitativa e quantitativa delle modificazioni del proteoma di un organismo.

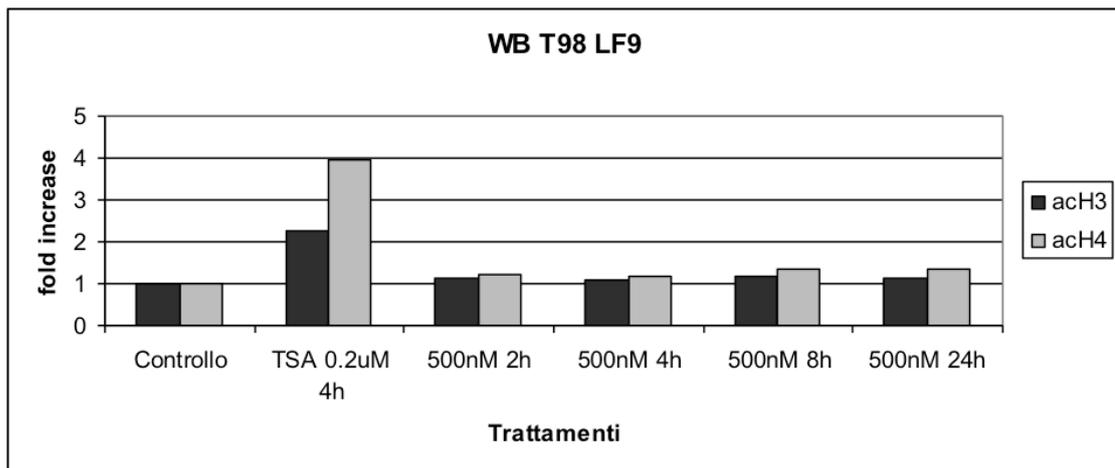
WB LF-9 16-01-13



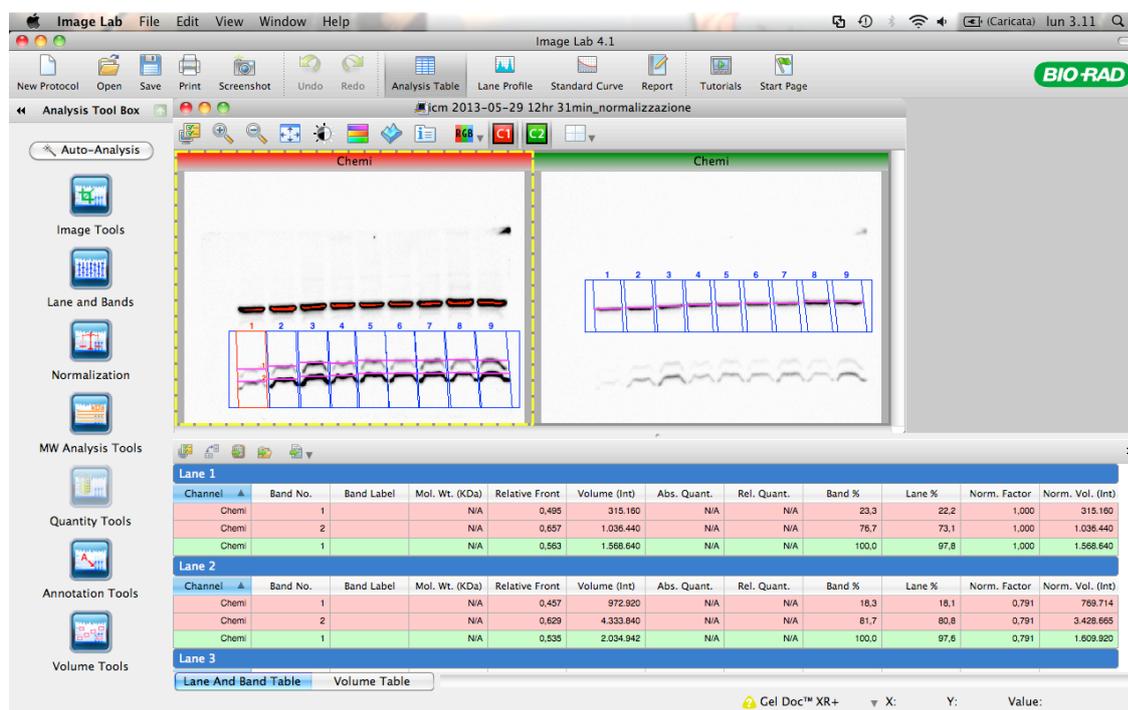
Exp 60 sec

Figura 34. Immagine immunoblot per valutazione dell'acetilazione istonica.

Gli stessi risultati sono riportati in tabella, tramite elaborazione su un foglio di calcolo elettronico, che permettono di valutare l'espressione delle proteine ricercate in relazione alla condizione del controllo.



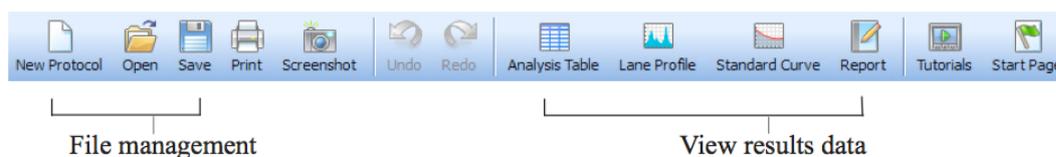
4.3 ImageLab.



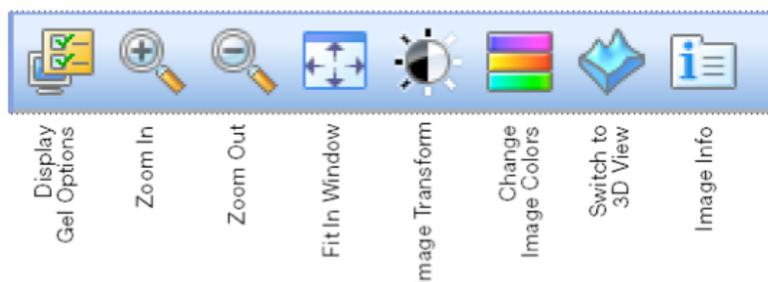
“ImageLab” è il software dell’azienda Bio-Rad per l’imaging, l’elaborazione e l’analisi di gels e blot tramite lo strumento ChemiDoc MP, utilizzabile sia in ambiente Windows sia in quello Macintosh.

Il software garantisce tutte le funzionalità di cui si è parlato nei precedenti paragrafi del presente capitolo. L’interfaccia utente è semplice e basata principalmente su 4 barre di strumenti:

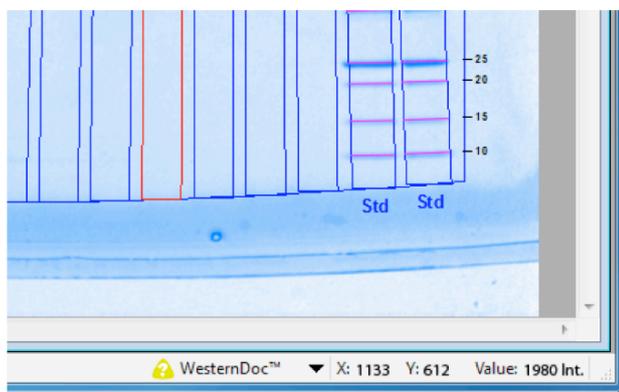
1. La barra principale, presenta tutti gli strumenti classici per la gestione dei file e la visualizzazione dei risultati.



2. Il “display toolbox”, contenente gli strumenti per la visualizzazione e la regolazione dell’immagine.



3. L’”Analysis toolbox”, a sinistra della finestra principale, per le operazioni di regolazione della superficie da analizzare, individuazione delle corsie, individuazione delle bande, regolazione del background, determinazione dei volumi e della quantificazione delle bande.
4. La “Status bar”, per l’indicazione esatta della posizione del cursore (X, Y) e dell’intensità dell’immagine in quel punto.



L’analisi dell’immagine può cominciare, in maniera automatica, anche in sede di acquisizione d’immagine. Si è già parlato, nel Paragrafo “3.4.1 ChemiDoc MP”, pag. 50, della procedura di acquisizione dell’immagine tramite software.

Una volta impostanti i parametri di acquisizione, il software permette di definire altri parametri concernenti l’analisi automatica dell’immagine, primo fra tutti la sensibilità di individuazione delle corsie e delle bande. Essa può essere “bassa”, per la rivelazione di bande marcate, “alta”, per la rivelazione delle bande più deboli, oppure “personalizzata” dall’utente. La sensibilità non può essere diversa tra i vari canali di

un'immagine multicanale, ove pertanto è necessario lavorare manualmente, se le immagini provenienti dai vari canali hanno caratteristiche molto diverse.

Definita la sensibilità, è possibile indicare la procedura di normalizzazione del campione, rispetto ad un intero campione (“Total Lane Protein Normalization”) oppure rispetto ad una specifica banda (“Housekeeping Protein Bands Normalization”).

Per l'analisi automatica dei pesi molecolari, invece, il sistema richiede le seguenti informazioni:

1. La tipologia di MWM utilizzato. È possibile selezionare uno degli standard della Bio-Rad oppure definirne di propri.
2. La corsia del MWM.
3. La funzione per l'interpolazione dei dati, relativa al rapporto della mobilità delle bande con i pesi molecolari delle proteine. Sono disponibili 4 funzioni in base al tipo di gel: “Gradient gel”, per i gel che presentano un gradiente di risoluzione, e “Fixed percentage gels”, per i gel a risoluzione fissa.

Impostati questi parametri, occorre solo collocare in modo corretto il campione e definire il tipo di output desiderato tra un'immagine, un report stampabile, contenente sia i dati relativi alle caratteristiche dell'immagine che quelli concernenti l'analisi densitometrica, o un report su monitor.

CONCLUSIONI

Il “Western blotting” è una delle procedure più utilizzate in ambito biochimico, essendo necessario per la discriminazione, l’identificazione e la quantificazione in fase solida di proteine.

L’utilizzo dei nuovi dispositivi e protocolli, esaminati nella presenta opera, si concretizza nell’apporto di molti miglioramenti rispetto allo sistema standard, traducibili, sinteticamente, nell’ottimizzazione di almeno tre specifiche:

1. Il tempo di esecuzione, ridotto finanche del 90%.
2. Maggiore pertinenza del segnale rivelato al quantitativo proteico reale.
3. Ottimizzazione della quantificazione, rispetto al segnale.

La visualizzazione tramite tecnologia “Stain Free”, l’uso dei sistemi di blotting Dry e semi-Dry, il riconoscimento tramite l’uso degli anticorpi guidato, la rivelazione con camera CCD e l’acquisizione guidata, permettono l’esecuzione della procedura di blotting, dopo l’esecuzione della corsa elettroforetica, in un’ora.

L’eliminazione dei buffer di blotting, il miglioramento dell’efficienza del trasferimento e l’uso dei sistemi d’incubazione guidata, aiutano a migliorare il rapporto di proporzionalità tra il numero di anticorpi legati al target proteico reale e l’intensità del segnale prodotto dai marcatori. Questo comporta un aumento della coerenza tra il segnale rilevato e la presenza fisica delle proteine che lo hanno prodotto, migliorando la pertinenza dei dati di quantificazione ricavati con quelli del sistema reale.

Infine, i sistemi di imaging di ultima generazione, tramite l’utilizzo della camera CCD, l’aumento del range dinamico, l’ottimizzazione dei tempi di esposizione, la visualizzazione a schermo, la presenza di background regolari e omogeni, permette di analizzare le variazioni dell’intensità delle bande dell’immagine acquisita con un dettaglio maggiore, minimizzando le approssimazioni e uniformando i dati rispetto ai valori di background e di controllo.

I benefici dell'applicazione delle metodiche e delle conoscenze proprie dell'ingegneria nello studio dei problemi relativi a specifici processi molecolari e cellulari sono evidenti. La definizione di modelli quantitativi di tali processi, a causa dell'ordine dimensionale delle masse in oggetto e del gran numero di variabilità presenti, può rappresentare un ostacolo insormontabile nella ricerca scientifica condotta in ambito biochimico. La progettazione di nuove tecnologie e l'approccio analitico proprie dell'ingegneria, permettono lo studio e l'analisi di tali fenomeni, con un approccio di misura più cristallino ed efficace.

BIBLIOGRAFIA

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *Journal of Molecular Biology* 98 (3): 503–517.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. (1977): "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12):5350-5354.

Nelson D.L., Cox M.M., *Introduzione alla biochimica di Lehninger*, Bologna, Zanichelli, 2011.

Esteller M., "Epigenetics in Cancer", in "The New England Journal of Medicine", a. XI, n. 358, 13 Marzo 2008.

Gürtlera A., Kunzb N., Gomolkac M., Hornhardtc S., Friedla A. A., McDonaldb K., E. Kohnb J., Poschb J., "Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis", in "ScienceDirect", Volume 433, Issue 2, 15 February 2013, Pages 105–111.

SITOGRAFIA

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6039A.pdf

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/iblotssystem_man.pdf

<http://www.bio-rad.com/en-us/product/criterion-tgx-stain-free-precast-gels>

<http://www.bio-rad.com/en-us/product/semi-dry-rapid-blotting-systems/trans-blot-turbo-transfer-system>

<http://www.millipore.com/catalogue/module/c73105>

<http://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/detection-methods#1>

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1351095345757/litdoc29020301_20130324214508.pdf

<http://www.syngene.com/g-box-chemi-x11-4/>

<http://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/detection-methods>

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1351095345757/litdoc29020301_20130324214508.pdf

<http://www.bio-rad.com/en-us/product/image-lab-software>

RINGRAZIAMENTI

Essendo il primo membro della mia generazione ad aver manifestato la volontà di iscrivermi ad un corso di studio universitario ed ad averne, oggi, completato un ciclo, un primo, sentito ringraziamento va alla mia famiglia, che mi ha supportato in questi anni, nonostante l'impossibilità di comprendere un sistema percepito inevitabilmente come estraneo o stereotipato. Grazie per la fiducia accordatami e per l'ingente supporto economico, sostenibile solo tramite impagabili sacrifici.

E proprio in virtù di questo semplice primato, non posso che ringraziare tutti i miei Professori, che mi hanno trasmesso, non solo le mere nozioni scolastiche previste da ambigui programmi ministeriali, ma spesso anche esempi, valori, modelli di vita e di pensiero. Professori di ogni ordine e grado, appartenenti tutti al mondo della martoriata istruzione pubblica, la cui capacità di combattere la rigidità sociale temo sia, purtroppo, pesantemente compromessa, soprattutto nel sud Italia. Grazie a voi Professori Savoca, Saitta, Sesto, Puleo, Scardaci, Iuculano, Campo, Cicognani, Dardari, Cristofolini e Cavalcanti per avermi permesso, per lo meno, di ambire a questo salto sociale, nonostante le resistenze di un sistema scolastico, oggi più di ieri, sconquassato e sotto-finanziato.

Al Prof. Giordano e alla Dott.ssa Pasini, oltre che i ringraziamenti per avermi fornito una preparazione "ex nova" per lo studio delle tematiche affrontate in questa tesi di Laurea e la stima personale che va ben oltre la suddetta tesi, vanno i miei più sentiti auguri per lo svolgimento delle molte e complesse attività di ricerca portate avanti dal gruppo di ingegneria cellulare e molecolare del Dipartimento dell'Ingegneria dell'energia elettrica e dell'informazione.

Ma questi anni a Cesena non sono stati, ahimè, solo di studio.

Un ringraziamento speciale va ai membri di buona volontà, attuali e passati, dell'Associazione Studentesca Ingegneria Cesena (A.St.I.Ce.), che ho avuto l'onore di presiedere negli anni 2010 e 2011, e ai rappresentanti degli Studenti, che mi hanno fiancheggiato nel consiglio dell'allora Seconda Facoltà di Ingegneria.

Un posto nel cuore sarà sempre dedicato a una “creatura” che considero, ne più ne meno, di una figlia: UniRadio Cesena. Non posso che ringraziare le tre direzioni che ho avuto l’onore e l’onere di guidare dalla fondazione ad oggi e tutto il cast del progetto. Grazie, perché con voi mi sono sentito meno solo. Siete la gioventù che crede ancora in qualcosa, pronta a mettersi in gioco per se stessi e per gli altri, ben disposta al sacrificio e al gioco di squadra. Siete la migliore gioventù.

Infine ringrazio i miei amici, le mie colonne incrollabili, la roccia della mia vita. Grazie, perché, non solo non sarebbe stato possibile raggiungere questo traguardo, ma, senza di voi, stento a immaginare cosa sarei diventato umanamente, a causa delle premature intemperie, che tanto bene conoscete. In qualche modo, vi devo la vita.