

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

Corso Integrato: Diagnostica per Immagini e di Laboratorio

Modulo:
Basi di Diagnostica di Laboratorio (2 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

Il Laboratorio di Diagnostica Clinica

Il laboratorio di diagnostica clinica si avvale di tecniche tipiche della chimica analitica, della biochimica e della biologia molecolare,

nel laboratorio di diagnostica clinica vengono stimati parametri utili alla biochimica clinica ed alla biologia molecolare clinica;

la biochimica clinica e la biologia molecolare clinica studiano il singolo soggetto malato per raccogliere dati che abbiano valore di prove semeiologiche a favore o contrarie alla diagnosi formulata dal clinico.

La semeiotica é una disciplina che studia i sintomi ed i segni delle malattie e di come entrambi debbano essere integrati per giungere alla diagnosi.

IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA ED IL CONTROLLO DI QUALITA'

Prelievo, raccolta e conservazione di materiali biologici

Variabilità analitica ed errori di misura

Controllo dei metodi impiegati in un laboratorio di diagnostica

Variabilità biologica e valori di riferimento

BIOCHIMICA CLINICA

Misure spettrofotometriche per la misura di analiti

Metodi immunochimici per la misurazione di antigeni

Dosaggi enzimatici dei fluidi biologici

Proteomica applicata alla diagnostica

BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

Enzimi di restrizione

La reazione di PCR nella diagnostica clinica

Real-Time PCR

Prevenzione da contaminazioni in un laboratorio di biologia molecolare

TESTI CONSIGLIATI

**METODOLOGIE DI BASE PER LA BIOCHIMICA E LA BIOTECNOLOGIA, A.J. Ninfa, D.P. Ballou,
Ed. Zanichelli**

BIOTECNOLOGIA MOLECOLARE, R.G. Glick, J.J. Pasternak, Ed. Zanichelli

VET.

BIOCHIMICA CLINICA

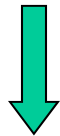
Roberto Giacomini Stuffer

Misure Spettrofotometriche

La spettrofotometria rappresenta una tecnica ampiamente utilizzata per il dosaggio di numerosi analiti, permette di risalire alla concentrazione dell'analita stesso.

Legge di Lambert-Beer

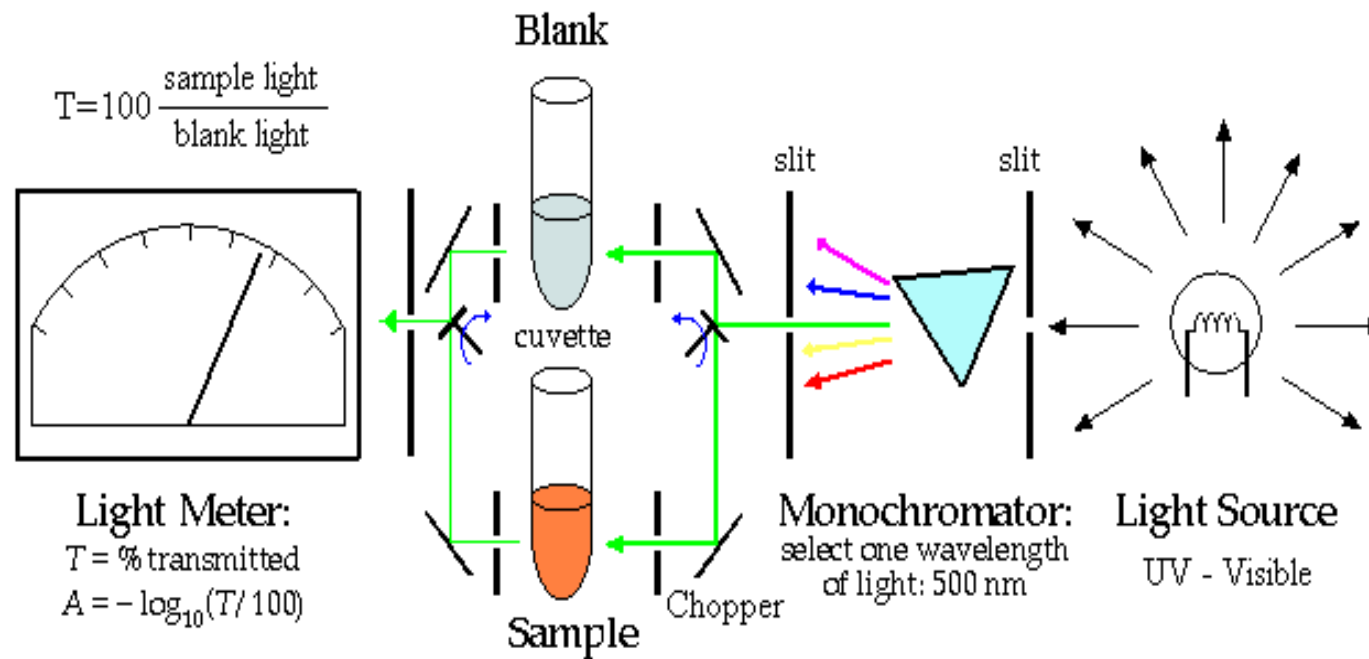
$$A = abc$$



$$c = \frac{A}{ab}$$

A=Assorbimento della soluzione
a=Coefficiente di estinzione molare
b=Cammino ottico della soluzione
c=Concentrazione del campione

Lo Spettrofotometro



Cuvette: - vetro

- quarzo

lampada

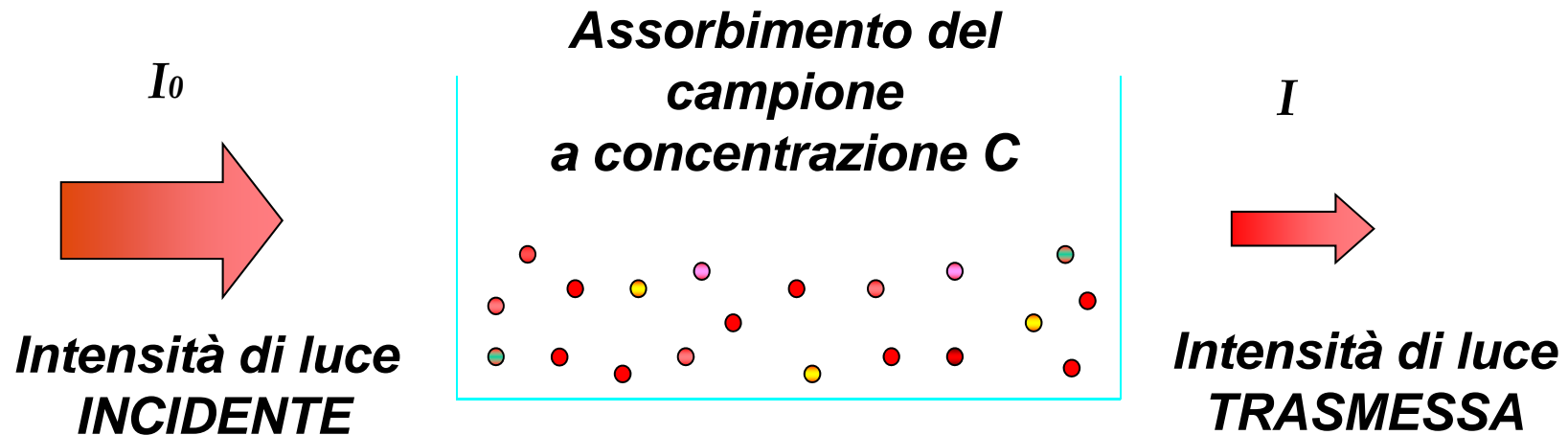
visibile : tungsteno

UV : deuterio

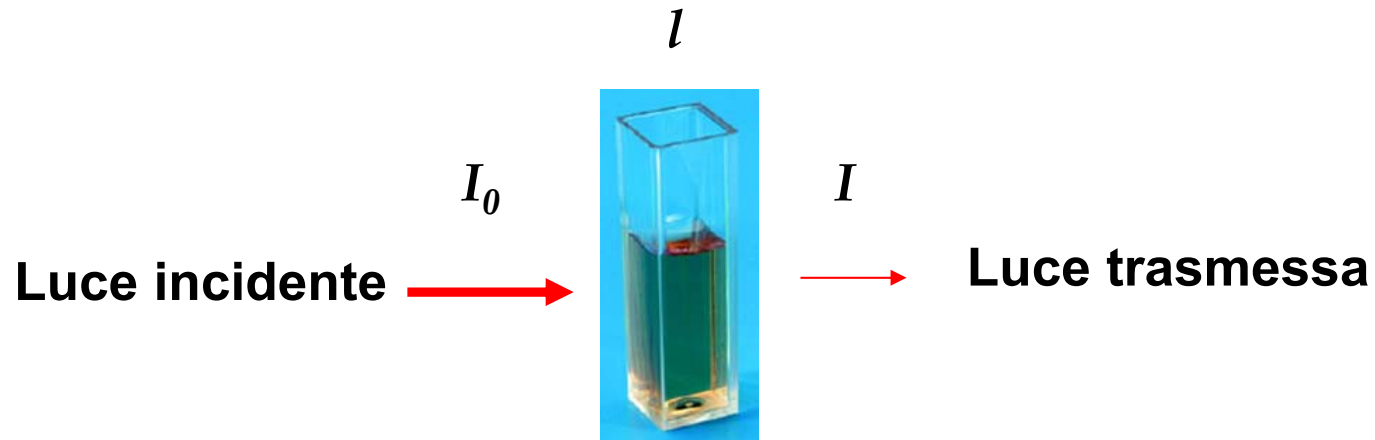
Misure Spettrofotometriche

Maggiore é la quantità di molecole che la luce incontra, maggiore é l'assorbimento, minore é l'intensità di luce trasmessa, in una cinetica enzimatica é necessario che substrato e prodotto abbiano un diverso assorbimento in qualche zona spettrale (visibile-ultravioletto);

luce visibile: nm 380-780,
luce ultravioletta: nm 200-380.



Misure Spettrofotometriche



Trasmittanza

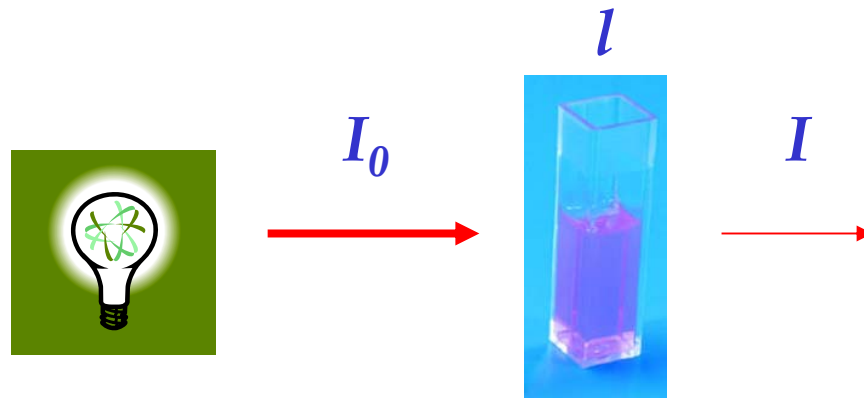
$$T = I/I_0$$

Assorbanza

$$A = -\text{Log } T = \text{Log } I_0/I$$

Relazione tra Concentrazione ed Assorbimento di una Sostanza ad una certa Lunghezza d'onda

Legge di Lambert-Beer: $A = abc$



c = concentrazione Molare della sostanza che assorbe la luce.

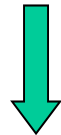
b = lunghezza del cammino ottico espressa in cm.

a = Coefficiente di Estinzione Molare della sostanza che assorbe luce.

Curve Standard

Si può risalire alla concentrazione di un'analita in una soluzione utilizzando uno standard a concentrazione nota.

$$C : C_{st} = A : A_{st}$$

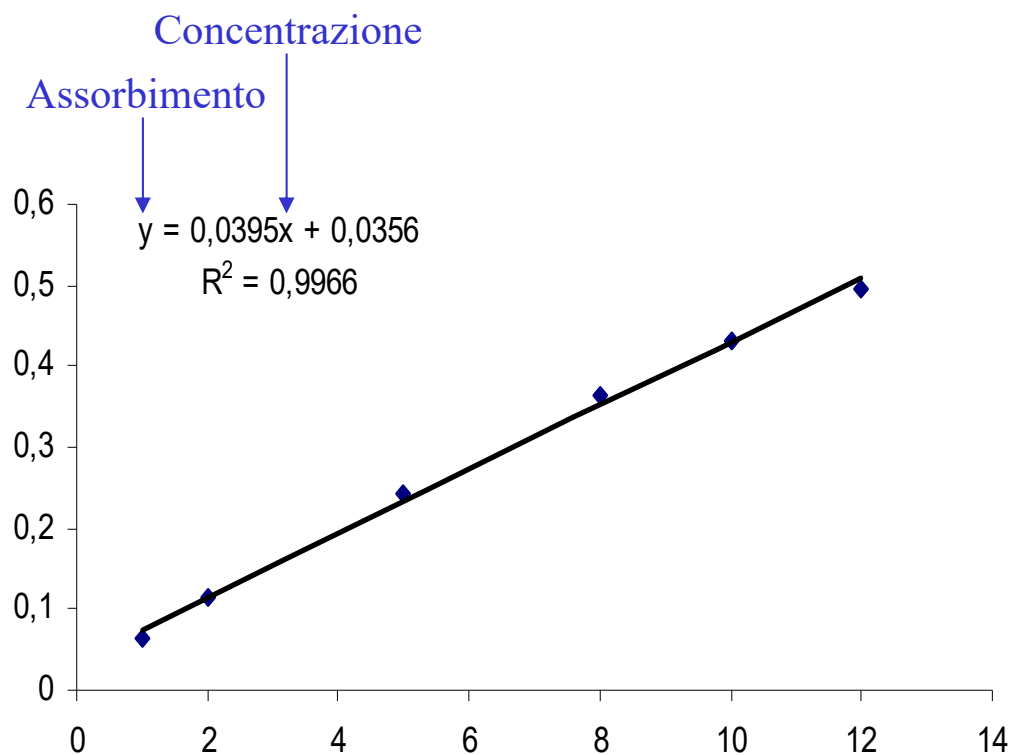


$$C = \frac{A}{A_{st}} \times C_{st}$$

Questo rapporto è valido solo se le concentrazioni dell'analita incognito e dello standard sono comparabili.

Retta di Taratura

E' consigliabile ricavare la concentrazione dell'analita da una serie di standard a concentrazione nota, piuttosto che da un singolo standard.



$$y = mx + b$$



$$x = \frac{y - b}{m}$$

m è il coefficiente angolare ed esprime la pendenza della retta.
b = y quando x = 0.

La formula è applicabile solamente se l'assorbimento del campione incognito è compreso fra il valore minimo e massimo della retta di taratura.

Metodi fotometrici

Analisi fotometrica diretta



Può essere effettuata sia nel visibile sia nell'UV. E' applicabile quando si studiano sostanze che assorbono "naturalmente" ad una particolare lunghezza d'onda, spesso, per rendere il saggio specifico, è necessario effettuare un procedimento di separazione prima dell'analisi.

Analisi fotometrica indiretta



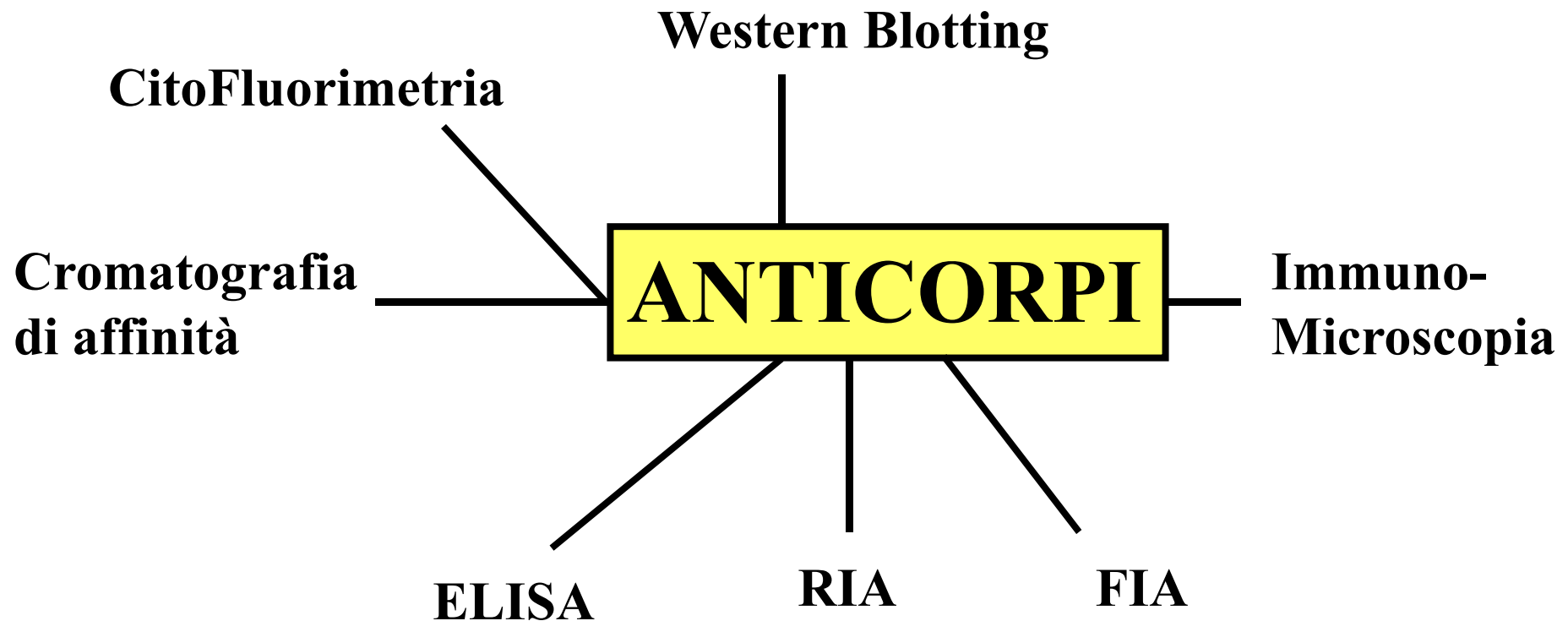
E' usata nella maggior parte delle applicazioni in biochimica clinica. La sostanza da analizzare subisce un'adatta reazione chimica, che la trasforma in un derivato fotoassorbente, si parla di analisi fotometrica basata sullo sviluppo del colore.

Metodi fotometrici

Sostanze	Reazioni di Assorbimento
Glucosio	Glucosio ossidasi-perossidasi; esochinasi-glucosio-6-fosfato deidrogenasi, etc.
Acido lattico-piruvico	Conversione NAD/NADH in presenza di LDH
Urea	Ureasi-reazione Berthelot
Ammoniaca	Reazione di Berthelot dopo mineralizzazione
Proteine	Lettura UV; dosaggio dell'ammoniaca; reazione con biureto
Deidrogenasi	Test ottico semplice per deidrogenasi
Emoglobina	Reattivo di Drabkin
Calcio	Acido Cloranilico
Magnesio	Giallo titanio
Lipidi totali	Reagente solfofosfovanilico
Colesterolo	Reattivo di Liebermann Burchard; reazione enzimatica – Trinder.

Metodi Immunochimici

Le tecniche immunochimiche permettono la rivelazione di un antigene (proteine, polisaccaridi e acidi nucleici) mediante anticorpi, sfruttando il riconoscimento specifico di un determinante antigenico (epitopo, che é quella piccola parte di antigene che lega l'anticorpo specifico).



Metodi Immunochimici

Anticorpi Policlonali

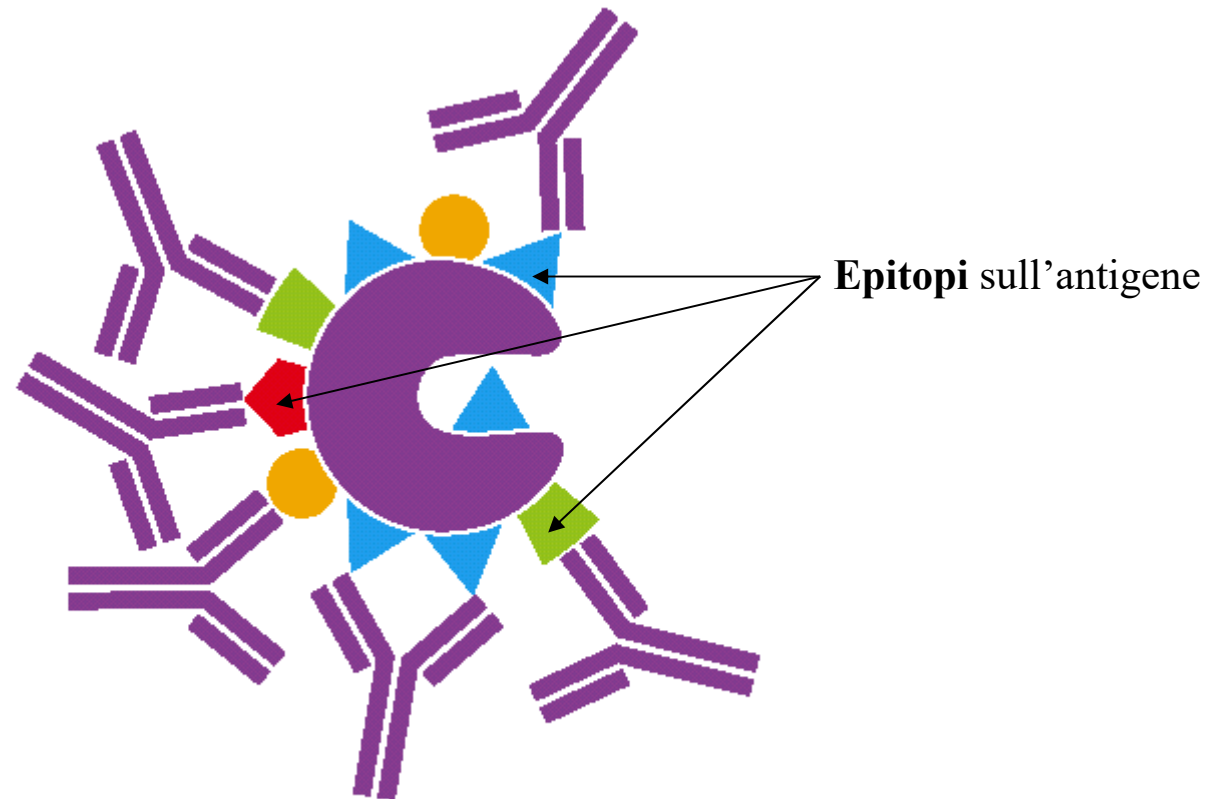


Figure 4: Schematic diagram of polyclonal antibodies binding to various epitopes on an antigen.

Metodi Immunochimici

Anticorpi Monoclonali

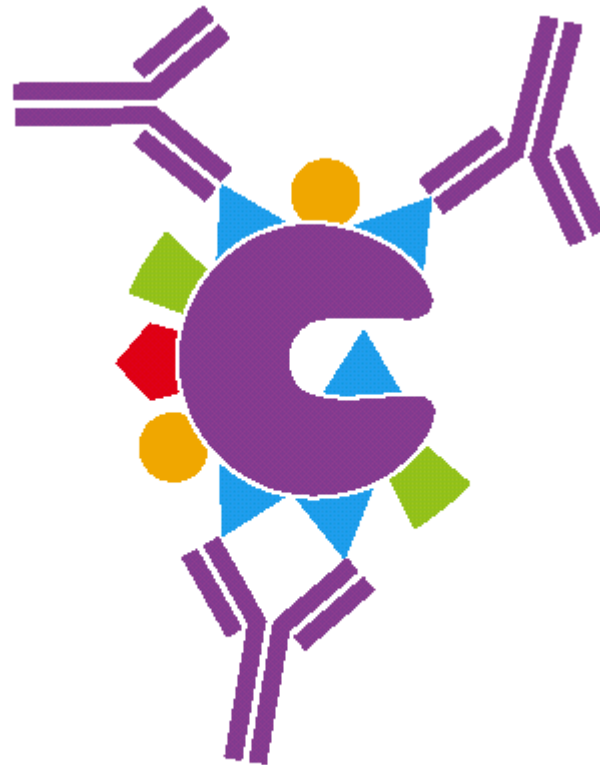
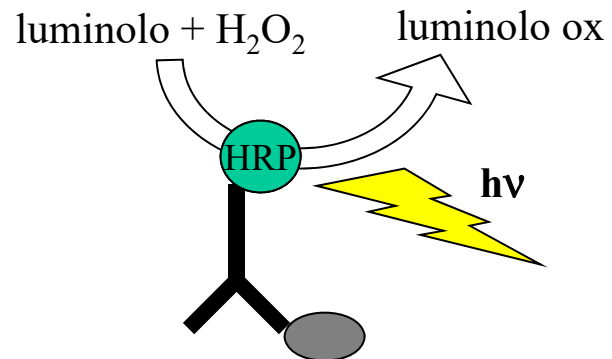


Figure 5: A given clone of monoclonal antibodies reacts with a specific epitope on an antigen.

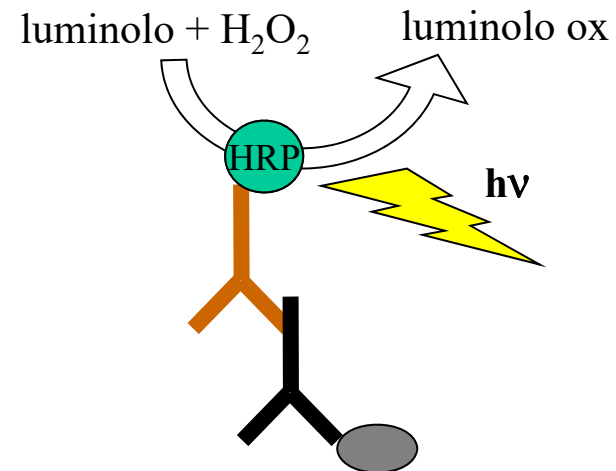
Metodi Immunochimici

Procedura di colorazione con anticorpi

Colorazione Diretta



Colorazione Indiretta



Metodi Immunochimici

Colorazione Diretta



Figure 6: Direct method: Enzyme-labelled *primary* antibody reacts with tissue antigen.

Vantaggi

Costo Minore
Rapidità

Svantaggi

Scarsa
sensibilità.

Metodi Immunochimici

Colorazione Indiretta



Figure 7: Two-step indirect method: Enzyme-labelled *secondary* antibody reacts with *primary* antibody bound to tissue antigen.

Vantaggi

Elevata sensibilità
Versatilità

Svantaggi

Costo Maggiore
Tempi più lunghi.

Metodi Immunochimici

Fasi del saggio immunologico



Blocking



Incubazione con anticorpo primario



Lavaggi



Incubazione con anticorpo secondario



Lavaggi



Rivelazione.

Metodi Immunochimici

I dosaggi immunologici permettono una determinazione quantitativa di una data sostanza (ormoni, proteine, etc.).

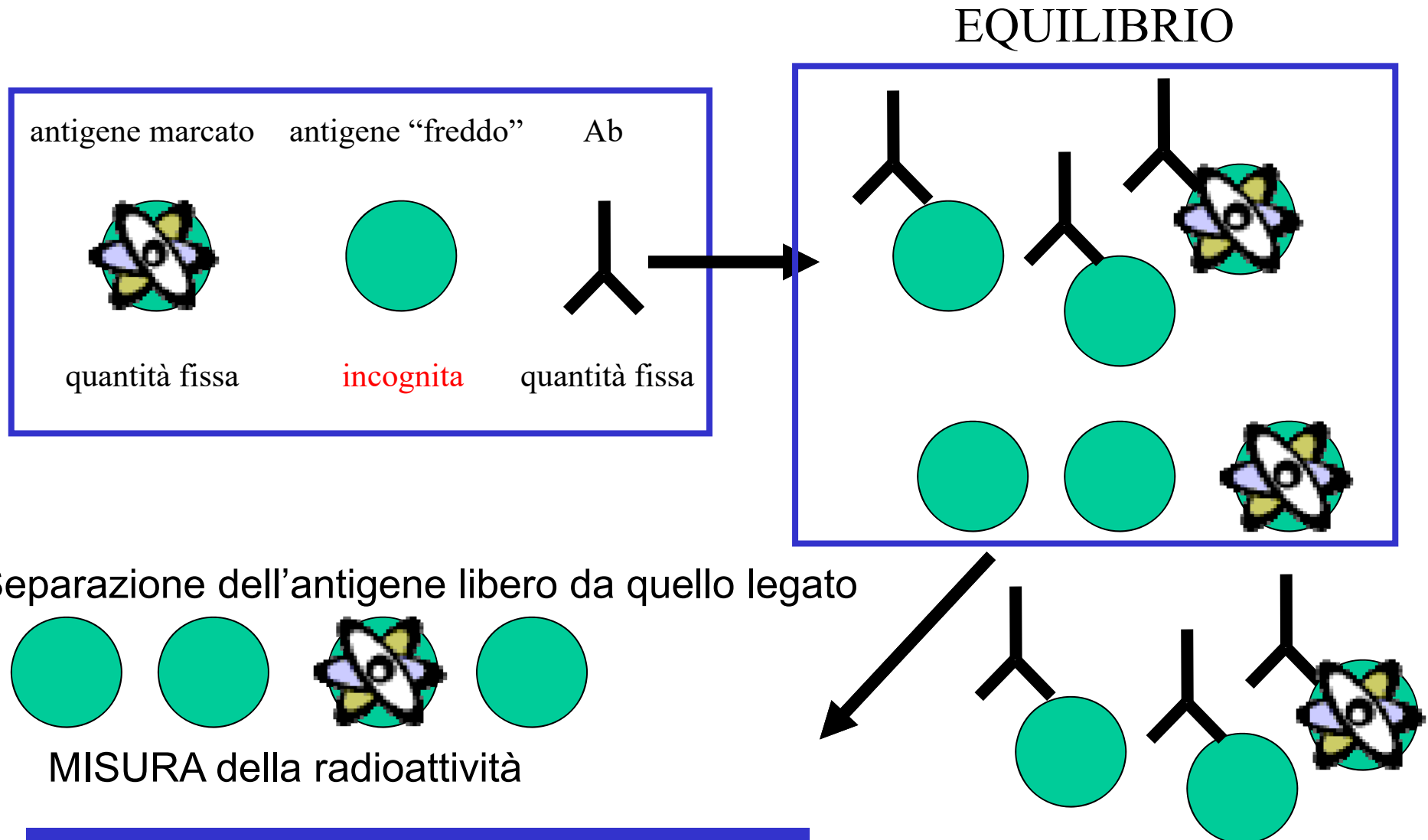
Caratteristiche di questi dosaggi sono:

1. sensibilità,
2. economicità,
3. praticità (veloci, semplici, applicabili a molti campioni per volta),
4. possibilità di automatizzare il processo.

Esistono diverse tipologie di dosaggio immunologico:

1. immunodosaggi competitivi (RIA = Radio Immuno Assay),
2. dosaggi Immunometrici (IRMA = Immuno Radio Metric Assay; sandwich-ELISA),
3. dosaggi di immunoassorbimento con enzimi (ELISA = Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).

Immunodosaggi Competitivi



C'è sempre bisogno di una curva standard.

Dosaggio RIA

RIA: Radio Immuno Assay

Gli antigeni vengono normalmente marcati con ^{125}I o ^3H .
La separazione dell'antigene libero da quello legato è possibile utilizzando diverse tecniche (proteina A, ammonio solfato, ecc.)

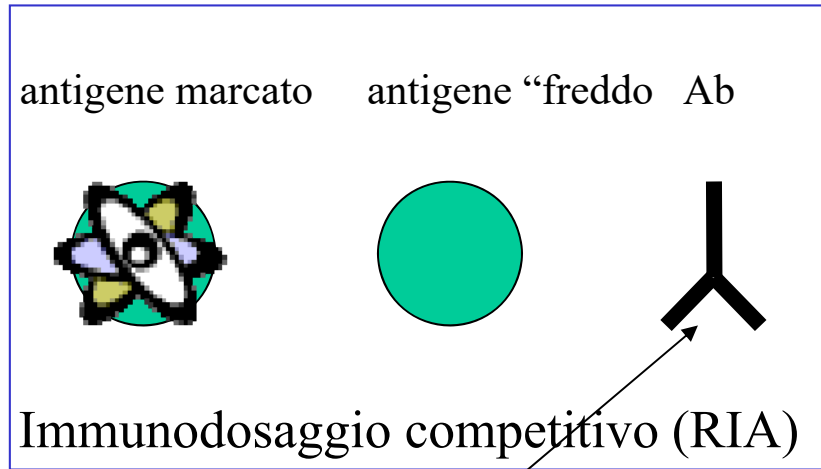
Vantaggi

Richiedono piccole quantità di anticorpo
Sensibilità elevata (per lo ^{125}I 10^{-12} - 10^{-14} M)

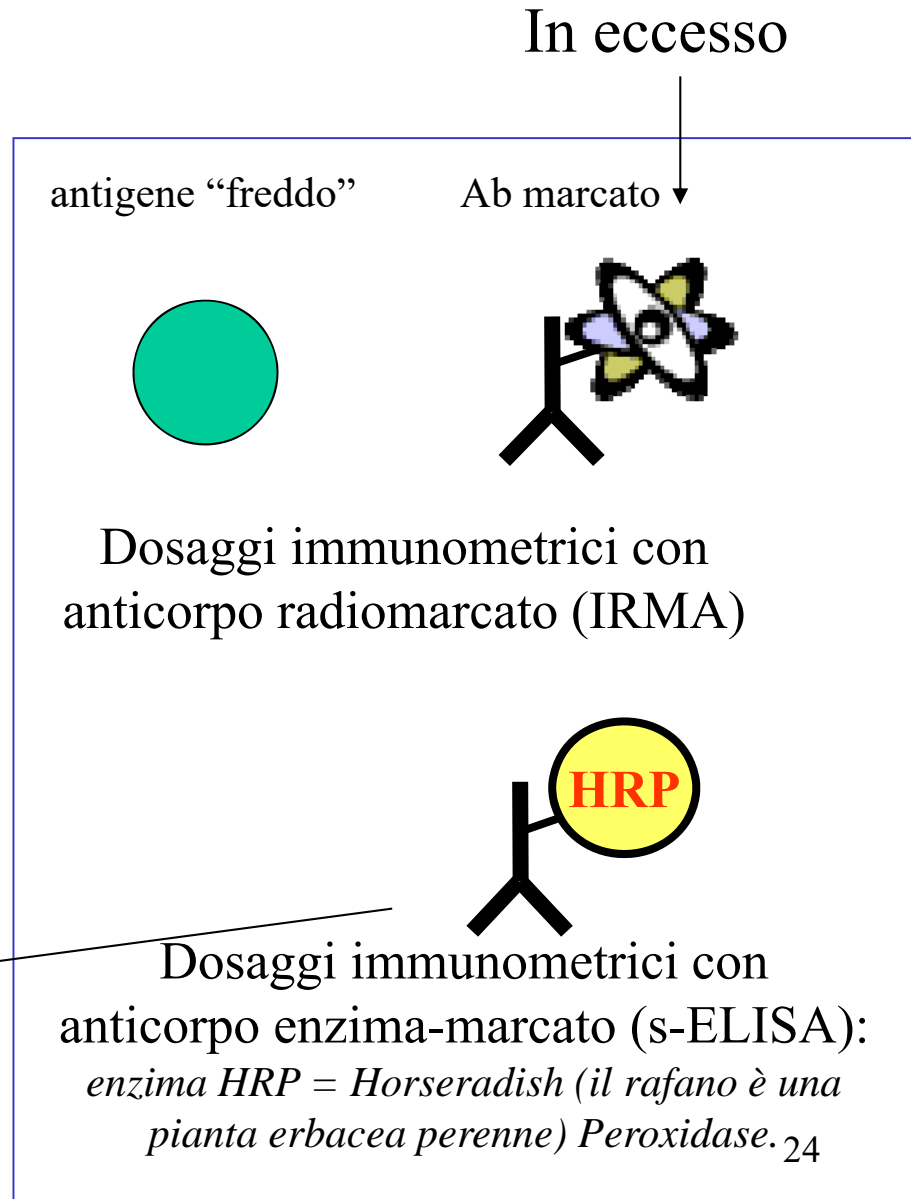
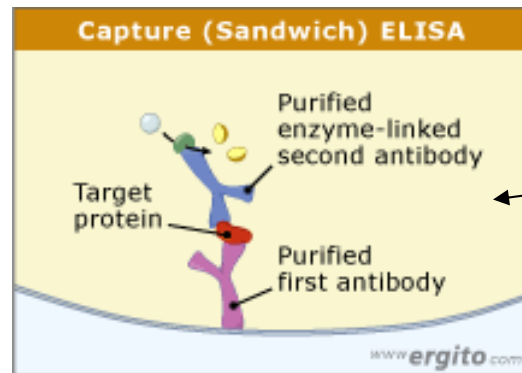
Svantaggi

Non sono automatizzabili.

Dosaggi Immunometrici



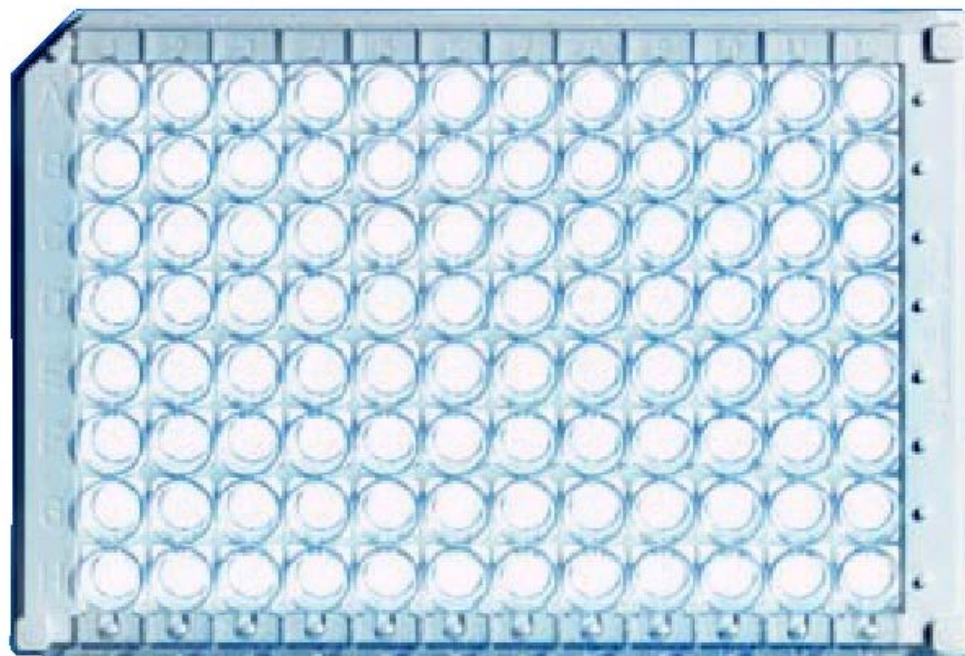
limitante



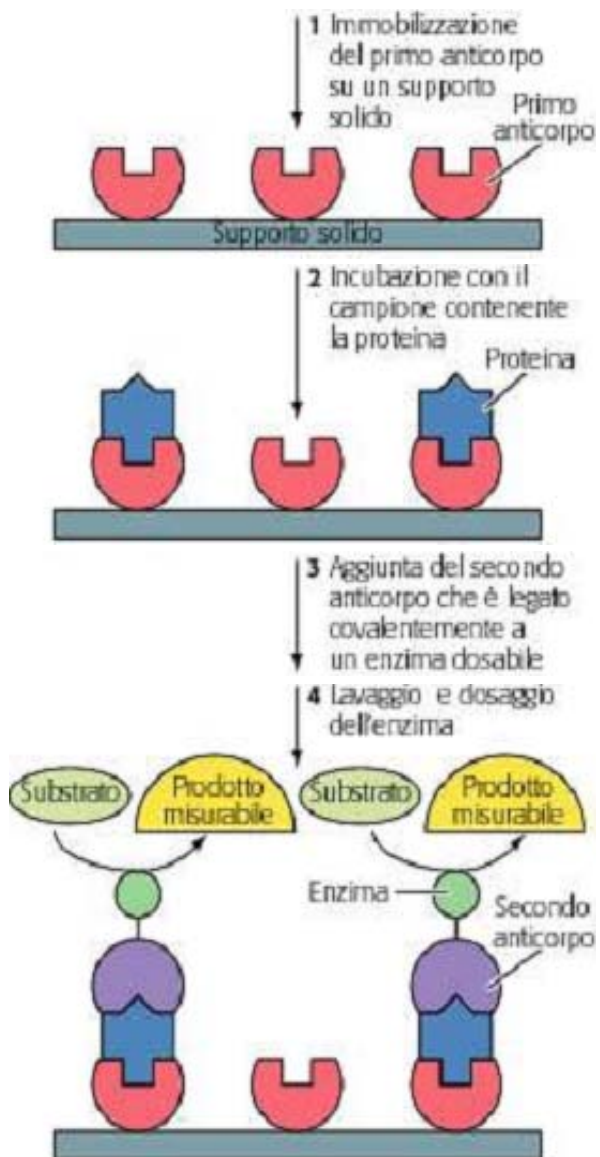
Dosaggi Immunometrici

Componenti del saggio:

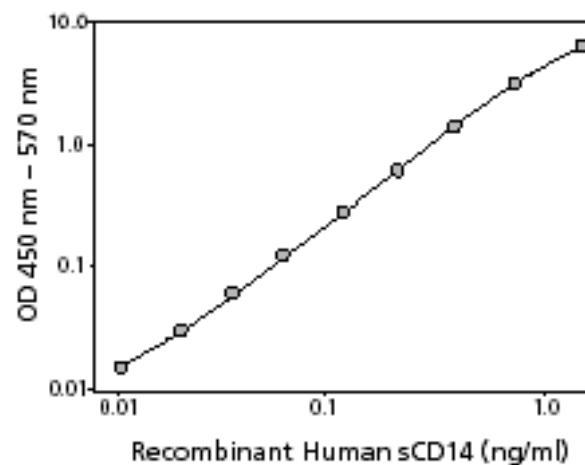
1. Ab di cattura (immobilizzato su pozzetto),
2. Ag presente nella miscela che deve essere dosato,
3. Ab di rivelazione.



Sandwich ELISA



Human Soluble CD14 Sandwich ELISA Curve



Caratteristiche dei dosaggi immunometrici

Vantaggi

Sensibilità

Velocità

Automatizzabilità (Lettori ELISA, robot)

Analisi di molti campioni per volta

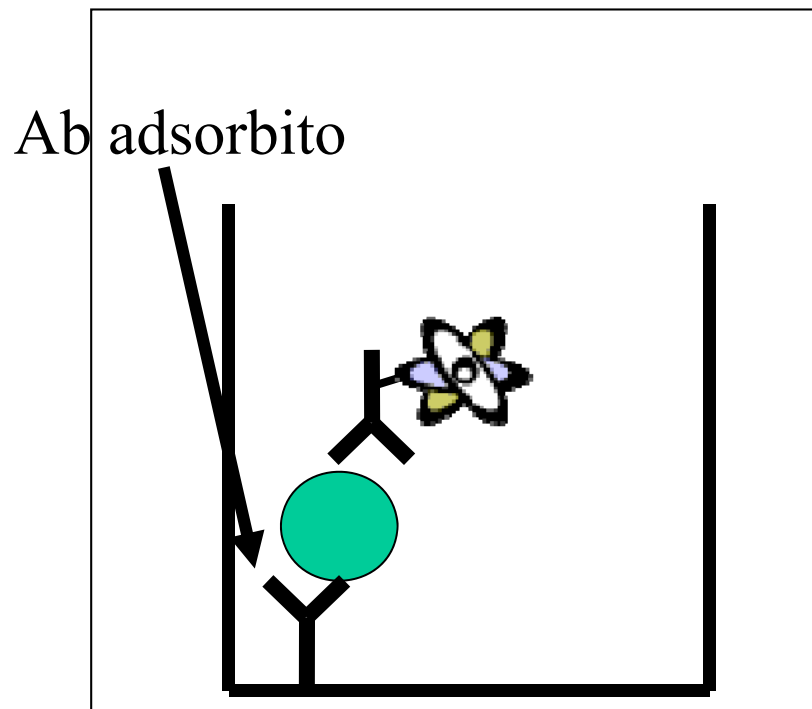
Svantaggi

Uso di due anticorpi (non sempre disponibili e comunque costosi).

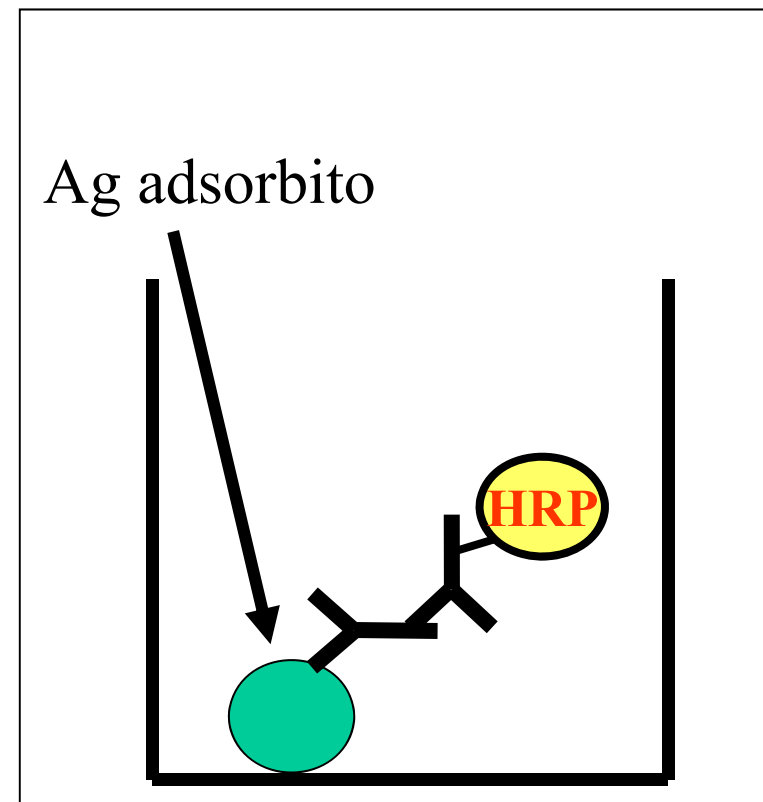
Dosaggi di immunoassorbimento

Sono effettuati sempre su piastre da microtitolazione a 96 pozzetti (oggi anche a 384 e 1536 pozzetti) in polistirene o polivinilcloruro.

Dosaggi immunometrici (IRMA o s-ELISA)

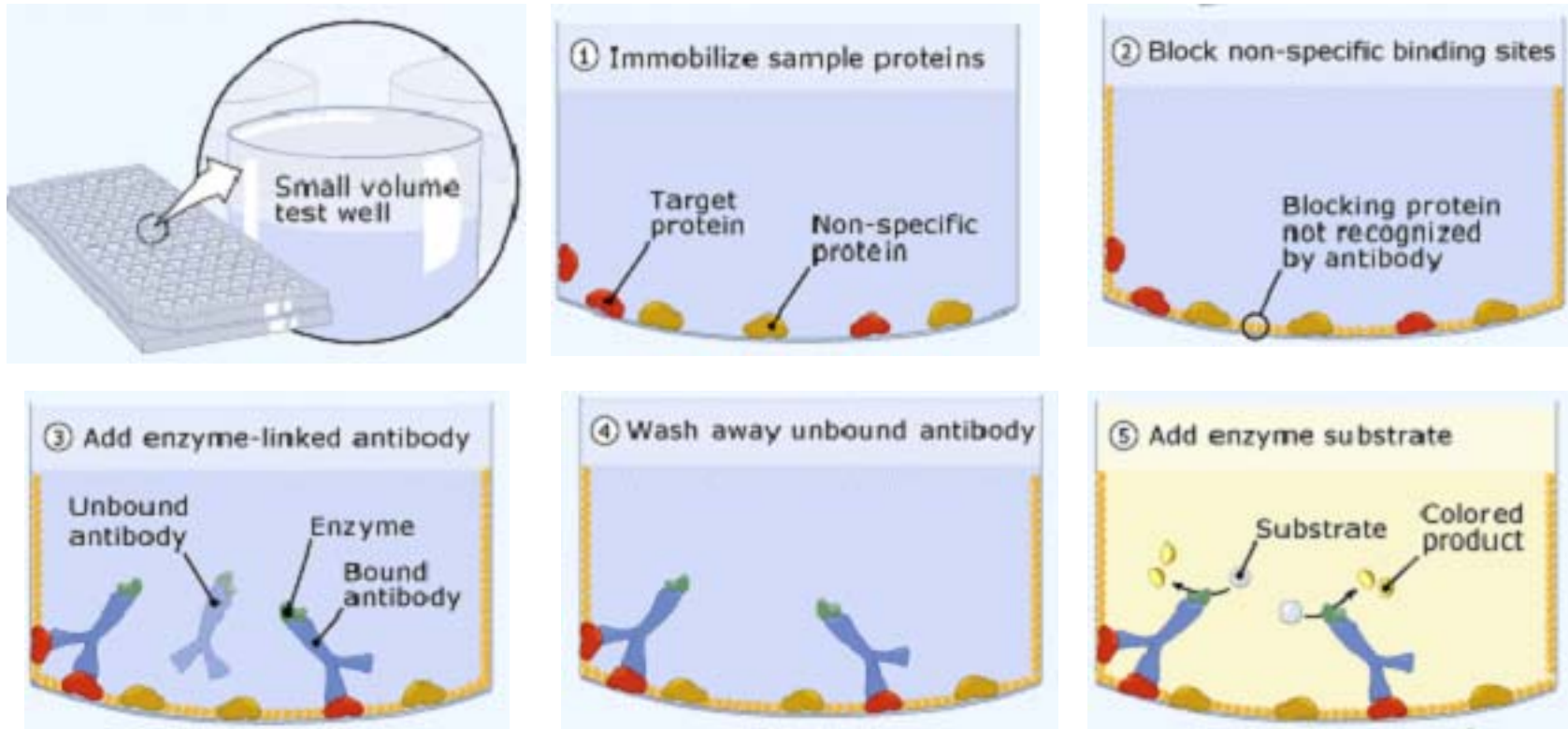


Dosaggi di immunobinding (ELISA)



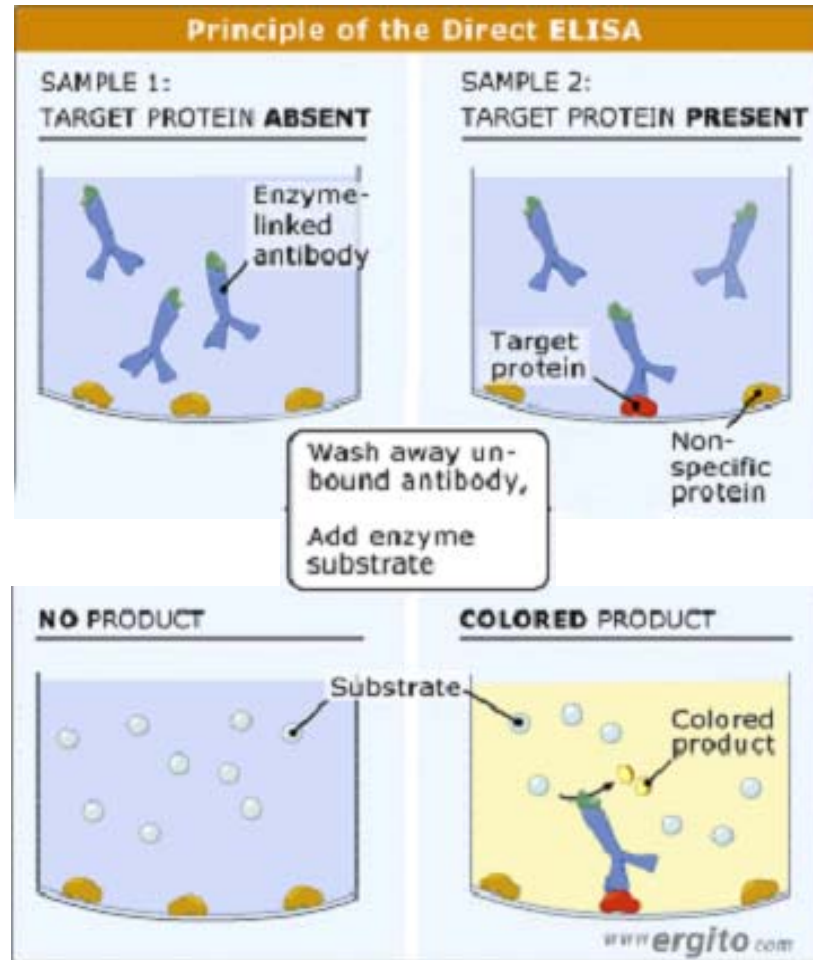
Saggio ELISA Diretto

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

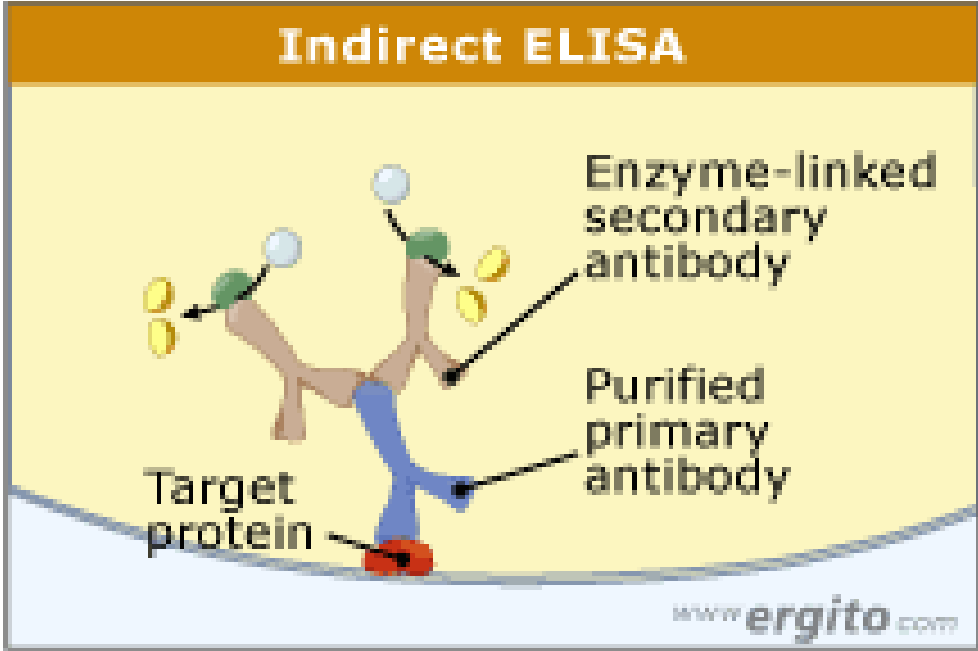


In questo caso, il saggio è detto diretto, perchè utilizza un solo anticorpo specifico per il nostro antigene e marcato con un enzima.

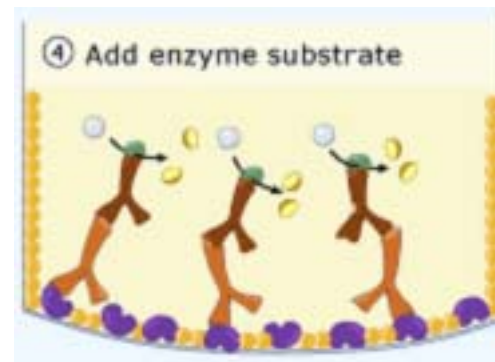
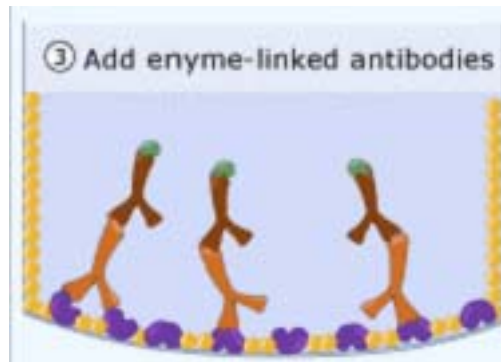
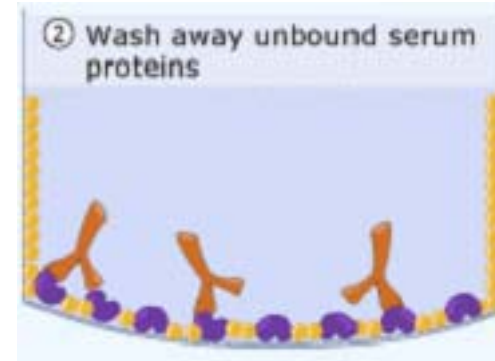
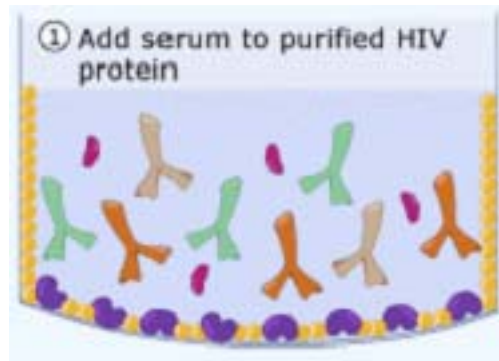
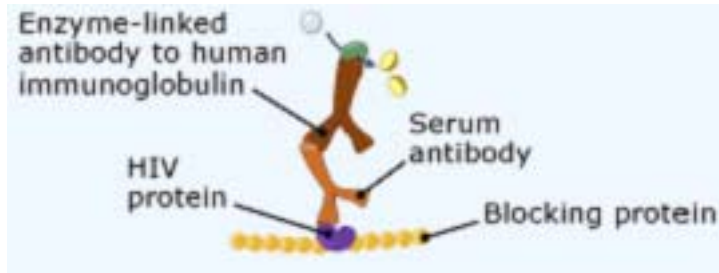
Saggio ELISA



Saggio ELISA indiretto



Saggio ELISA indiretto



Enzimi e Diagnostica Clinica

Gli enzimi sono proteine dotate di attività catalitiche, con un ruolo fondamentale nella regolazione delle varie vie metaboliche, essi hanno alta specificità di substrato.

La quantità in peso di enzima presente in un campione biologico è estremamente piccola, conviene quindi valutare la sua attività enzimatica, misurandola come velocità della reazione catalizzata.

$$1U = 1\mu\text{mol}/\text{minuto}$$

Una unità di attività è la quantità di enzima che catalizza la conversione di una micromole di substrato per minuto in condizioni standard di temperatura, pH e concentrazione di substrato, l'enzima deve essere il fattore limitante della reazione, mentre il substrato deve essere in eccesso, nella maggior parte dei casi, la quantità di enzima presente in un campione biologico è direttamente proporzionale alla sua attività.

Enzimi e Diagnostica Clinica

ISOENZIMI



Enzimi che catalizzano la stessa reazione, ma presentano diverse proprietà molecolari (carica, punto isoelettrico, solubilità, peso molecolare). La base della loro uguaglianza funzionale risiede in pochi domini strutturalmente simili (omologhi). La loro diversità è invece data dalle sequenze proteiche presenti al di fuori dei domini omologhi.



Da un punto di vista diagnostico è importante poter distinguere l'attività dovuta ad un particolare isoenzima. Enzimi ubiquitari possono presentare isoforme tessuto-specifiche.

Enzimi e Diagnostica Clinica

LDH (lattico-deidrogenasi)



Enzima ubiquitario. Un aumento in circolo può essere dovuto a necrosi di uno degli organi in cui è espresso.

CK (creatinfosfochinasi)



E' presente prevalentemente nei muscoli scheletrici, nel miocardio e nel cervello. Da un punto di vista clinico è importante la sua utilizzazione nella diagnostica dell'infarto al miocardio.

Fosfatasi Alcalina



**Espresso in molti tessuti (fegato, ossa, intestino, placenta, reni), presenta forme isoenzimatiche specifiche per ogni tessuto.
I valori normali sono più elevati in due sole condizioni fisiologiche: nell'infanzia e nella gravidanza.
I livelli di fosfatasi alcalina aumentano nelle epatopatie e nelle malattie ossee.**

Enzimi e Diagnostica Clinica

AST E ALT (aspartato e alanina aminotransferasi)



L'AST è legato ai mitocondri, mentre l'ALT è citosolica. Normalmente sono impermeabili alle membrane plasmatiche. Un aumento in circolo indica la presenza di cellule non più integre.

L'AST è presente in molti tessuti, mentre l'ALT è maggiormente concentrata nel fegato.

Colinesterasi



E' un enzima plasmatico, prodotto dal fegato per essere messo in circolazione.

Il livello dell'enzima diminuisce quando il fegato non è più in grado di sintetizzare proteine. Il dosaggio dell'enzima nelle epatiti è però di scarsa utilità, perchè la diminuzione è evidente dopo la prima settimana di malattia.

Metodi di Misura dell'Attività Enzimatica

Preincubazione



Per ottenere una perfetta termostatazione della miscela di reazione, il campione in esame viene preincubato con gli altri componenti della reazione per alcuni minuti.

Misura della velocità di reazione enzimatica



La velocità di reazione viene misurata dalle variazioni delle concentrazioni di substrato (S) o di prodotto (P) in un'unità di tempo ($-dS/dt$ e $+dP/dt$).

Le misure devono essere effettuate subito e per tempi brevi, per evitare l'accumulo dei prodotti o l'esaurimento dei substrati:



sistema di misura a due punti,



sistema di misura in continuo.

Metodi di Misura dell'Attività Enzimatica

Sistema di misura a due punti



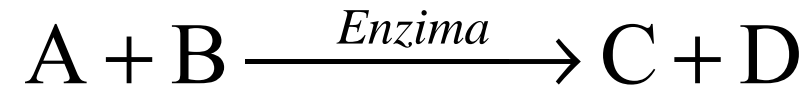
Si eseguono solo due determinazioni, una senza campione (bianco) e una con il campione. La differenza fra le due misure permette di stabilire la variazione della concentrazione del substrato.

Sistema di misura in continuo



Permette di monitorare la variazione di concentrazione nel tempo. E' il metodo più usato per misurare un'attività enzimatica. In molte situazioni la reazione viene seguita tramite la misura dell'assorbanza della miscela di reazione.

Sistema di Misura in Continuo



A o B "colorati"



Diminuzione dell'assorbanza

C o D "colorati"



Aumento dell'assorbanza.

Sistema di Misura in Continuo

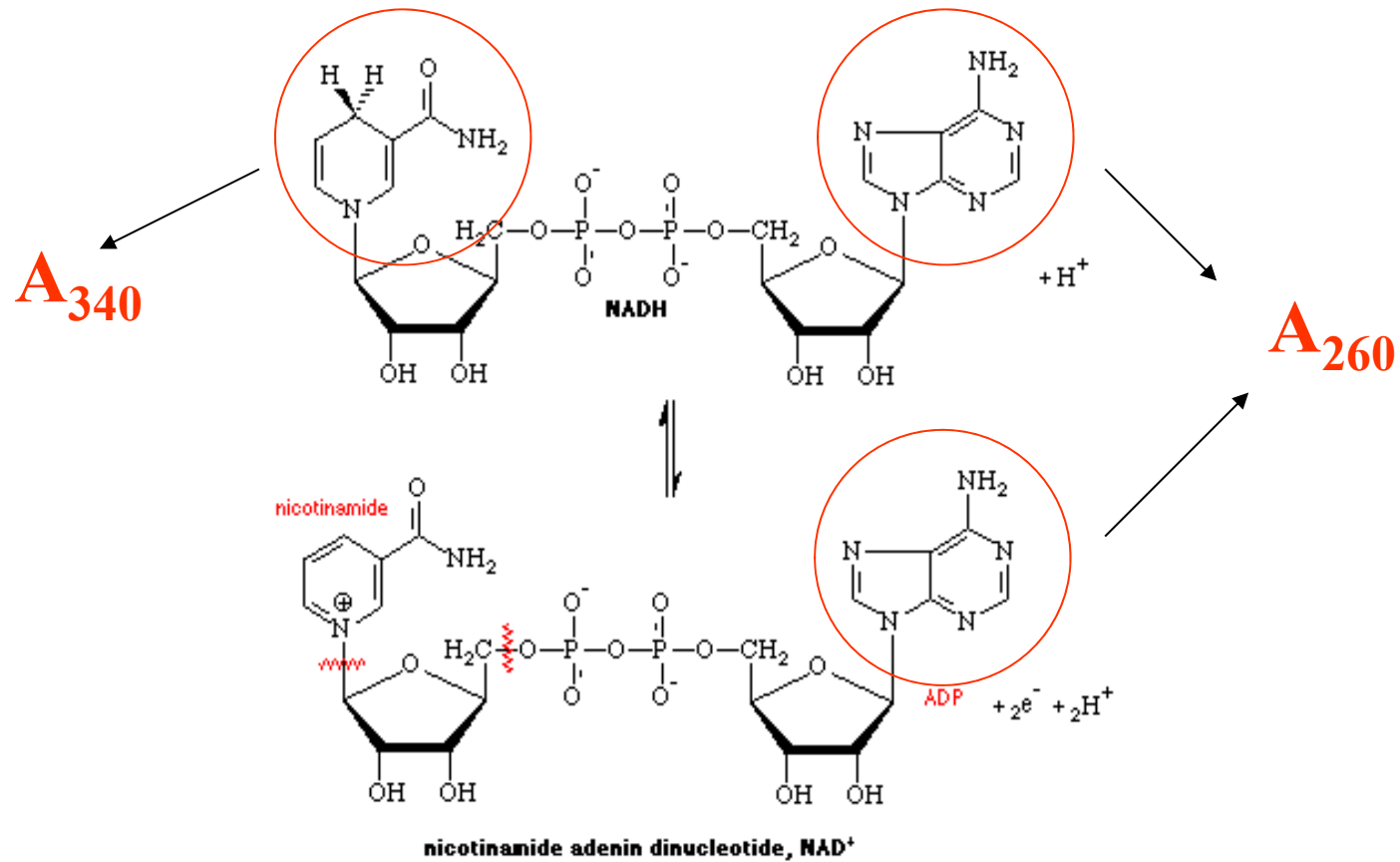
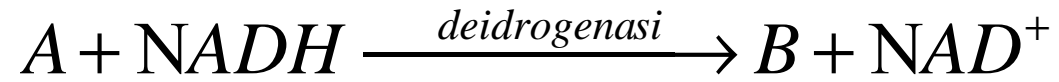


Giallo

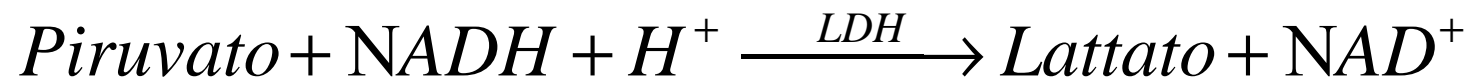
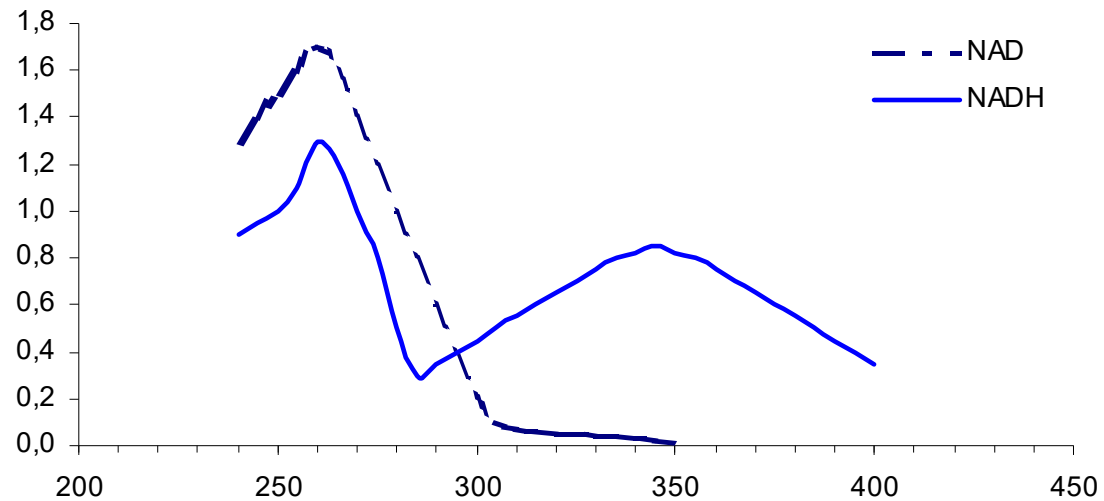


A_{405.}

Test Ottico Semplice



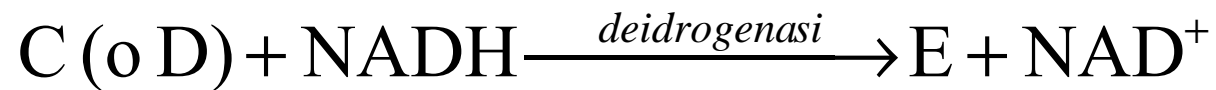
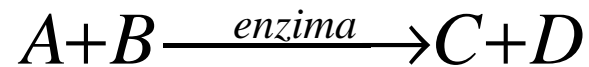
Test Ottico Semplice



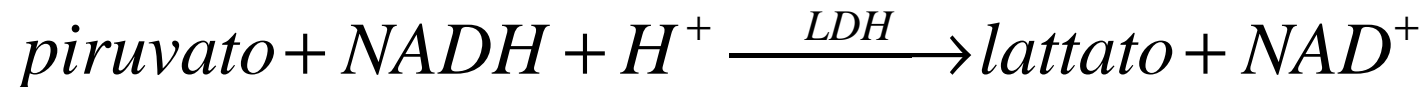
A_{340} ↓ → Attività LDH ↑

Test Ottico con Indicatore

Per alcune reazioni enzimatiche, nessuno dei composti che si formano o scompaiono presenta un assorbimento nel visibile o nell'UV. In questo caso è possibile "accoppiare" alla reazione primaria una reazione detta "indicatrice".



Test Ottico con Indicatore



Considerazioni Generali

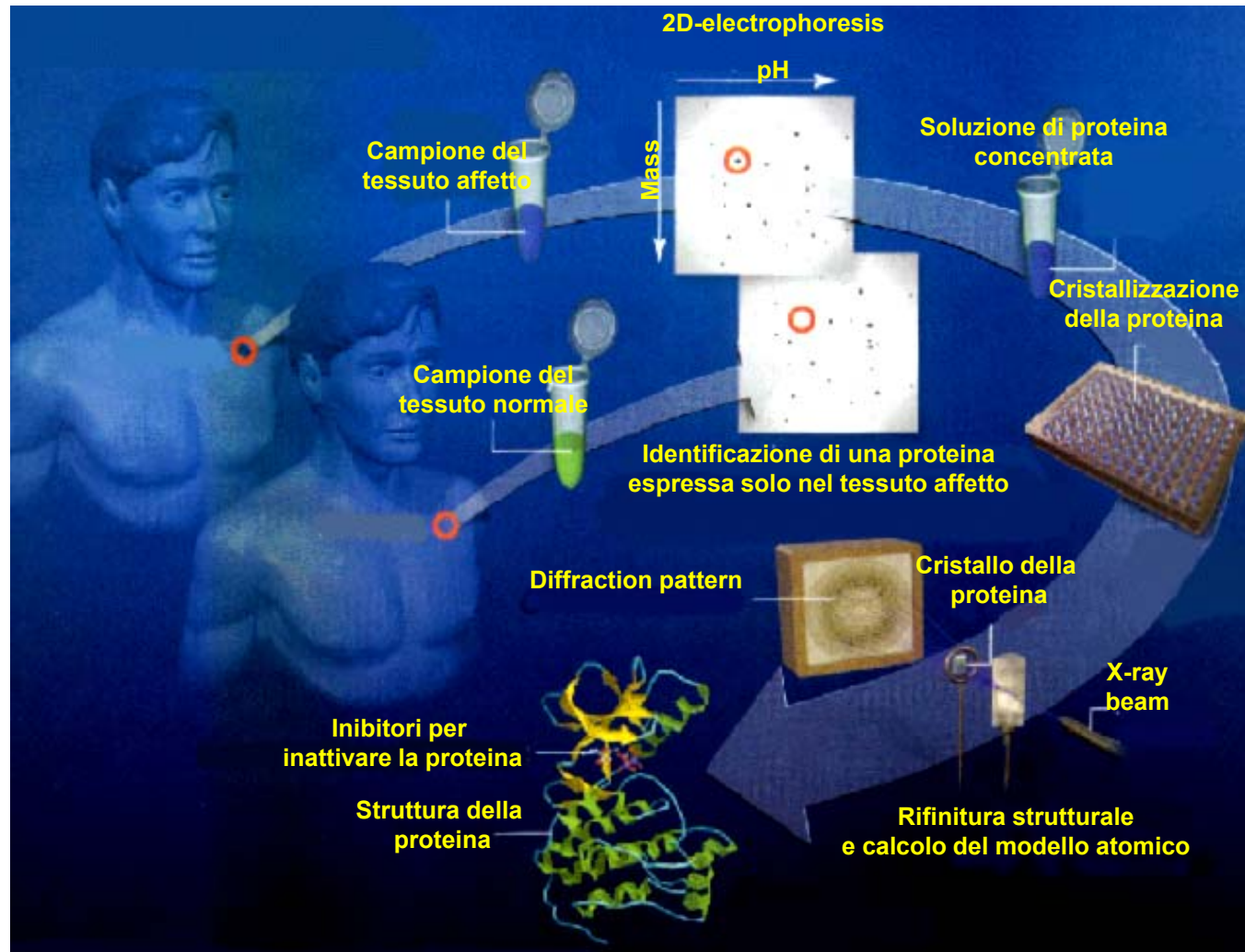
L'attività catalitica in vitro degli enzimi dipende da numerosi fattori interdipendenti, che devono essere studiati variando la loro concentrazione singolarmente.

Essi sono:

1. concentrazione di substrato (deve saturare completamente l'enzima);
2. quantità di enzima che catalizza la reazione;
3. stato di attivazione dell'enzima;
4. quantità di cofattori che intervengono nella reazione;
5. presenza di inibitori;
6. temperatura di incubazione (da 30°C a 37°C, un aumento di 1°C provoca una variazione del 10% dell'attività dell'enzima);
7. pH del mezzo di reazione (deve essere più vicino possibile all'optimum).

Proteomica Applicata alla Diagnostica

Scoperta di nuovi target per lo sviluppo di farmaci



Elettroforesi di Proteine

L'elettroforesi è la migrazione di particelle cariche in un campo elettrico. Particelle con carica positiva migrano verso il catodo, quelle con carica negativa vanno verso l'anodo.

Amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici possiedono gruppi ionizzabili e quindi, in dipendenza dal pH, possono essere presenti in soluzione come specie cariche.

Esistono diversi tipi di gel per elettroforesi applicabili alle proteine:

1. elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE);
2. elettroforesi in condizioni native;
3. isoelettrofocalizzazione (IEF);
4. elettroforesi bidimensionale (2D PAGE = 2D polyacrilamide gel-electrophoresis).

Quale tipo di elettroforesi usare?
Dipende tipo di analisi che vogliamo fare.

Identificazione/separazione in base alla dimensione	→	SDS-PAGE
Identificazione /separazione in base alla funzione	→	gel nativo
Separazione in base al pI	→	IEF
Analisi di una miscela complessa	→	2D gel

Gel di Poliacrilammide

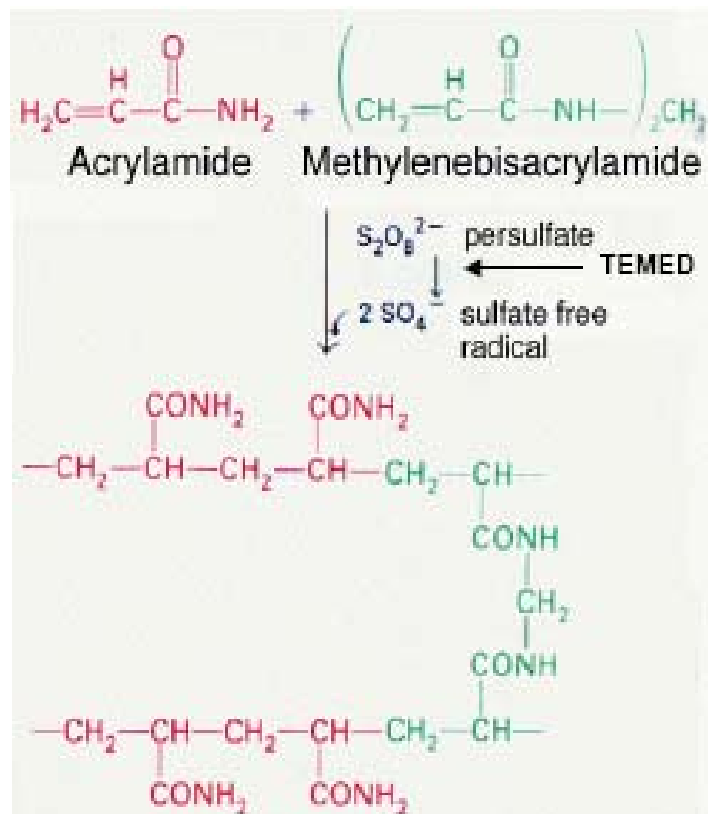
Acilammide: amide α,β -insatura

N,N'- metilenbisacrilammide: due molecole di acrilammide legate insieme tramite il gruppo ammidico

Preparazione


Acilammide e bisacrilammide si fanno reagire con ammonio persolfato in presenza di TEMED. Il TEMED genera un radicale dal persolfato, che inizia la reazione di polimerizzazione radicalica.


La soluzione si versa rapidamente tra due vetri tenuti separati da spaziatori. Infine, si inserisce un pettine che formerà i pozzetti.



Gel di Poliacrilammide

La dimensione dei pori del gel decresce con l'aumentare della concentrazione di acrilammide.

C < 2.5% di acrilammide  proteine di massa molecolare > 10⁶

C > 30 % di acrilammide  proteine di massa molecolare < 2000

Mobilità Elettroforetica

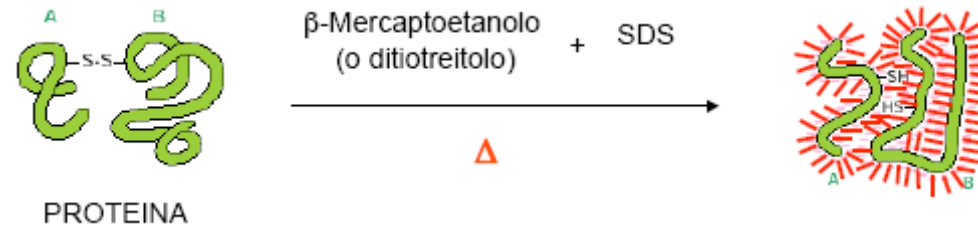
La mobilità elettroforetica di una certa molecola è determinata da:

- 1. carica;**
- 2. dimensioni e forma;**
- 3. viscosità del mezzo.**

SDS-PAGE

Per avere una separazione solo in base alla massa delle proteine, bisogna eliminare l'effetto della carica.

Ciò è possibile effettuando l'elettroforesi in presenza di un agente denaturante delle proteine (SDS = Sodium Dodecyl Sulphate) e di un riducente dei legami disolfuro (β -mercaptoetanolo, DTT).



Il β -mercaptoetanolo è un solfuro che distrugge i legami S-S eventualmente presenti nelle proteine.

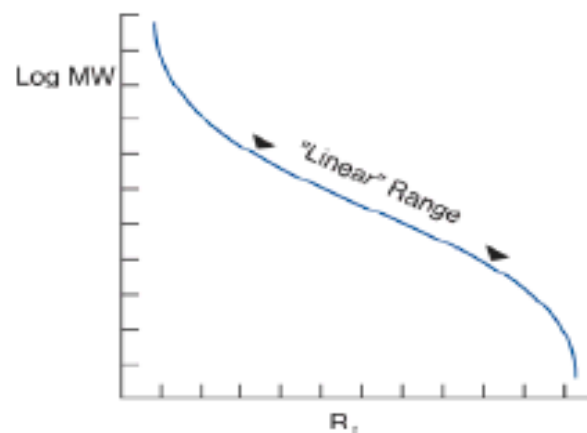
Il SDS è un potente detergente anionico, si lega alle proteine tramite le sue catene apolari, distruggendone la struttura secondaria e terziaria.

La carica netta della proteina viene completamente mascherata dall'SDS e la separazione nel gel avviene solo in base alle dimensioni molecolari.

Valutazione del Peso Molecolare con SDS-PAGE

La determinazione della massa molecolare di una proteina mediante SDS-PAGE va effettuata utilizzando la concentrazione di acrilammide adeguata alla massa delle proteine da separare.

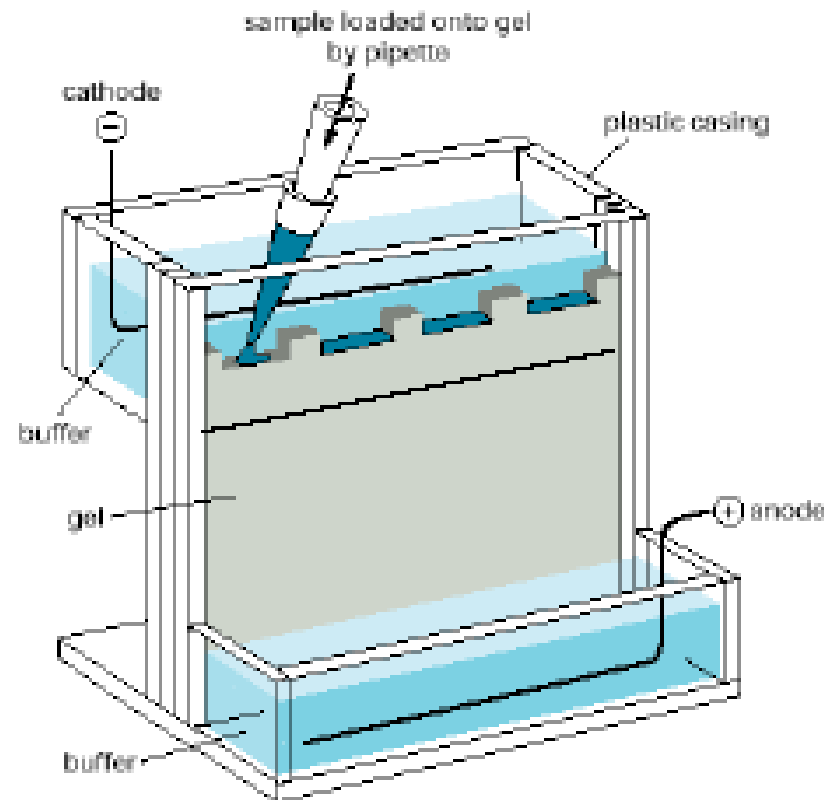
Acrilammide (%)	M_W delle proteine (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5	57-212



SDS-PAGE: Metodo Discontinuo

Gel di Impaccamento (stacking gel): gel a bassa concentrazione di acrilammide e quindi con pori larghi, sul quale si caricano i campioni.

Gel di Separazione (resolving gel): gel ad alta concentrazione di acrilammide e quindi con bassa porosità, nel quale avviene la separazione in base alla massa molecolare.



Metodi di Colorazione delle Proteine

Coomassie Brilliant Blue: le proteine vengono colorate per immersione in una soluzione di coomassie. Si rivelano fino a 100ng di proteina.

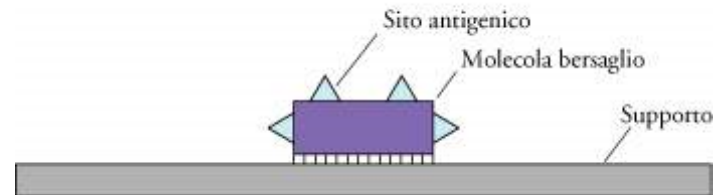
Silver staining: ioni Ag^+ vengono ridotti ad Ag metallico sulle proteine, conferendo loro una colorazione scura. Rivela fino a 1ng di proteina. Può essere impiegata dopo la colorazione con coomassie.

Colorazione di Schiff con acido periodico (PAS): permette di distinguere i diversi componenti di una miscela di glicoproteine. Ha scarsa sensibilità e spesso viene accoppiata al Western blotting.

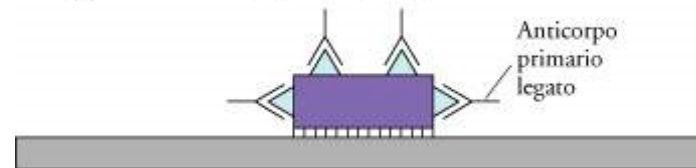
Western blotting: la proteina di interesse viene identificata nella miscela con anticorpi specifici e rilevata per mezzo di anticorpi secondari coniugati ad un enzima. La presenza del complesso proteina-anticorpo-anticorpo secondario può essere rilevata con metodi colorimetrici o chemioluminescenti. Permette di rivelare pg di proteina.

Principio del Western Blotting

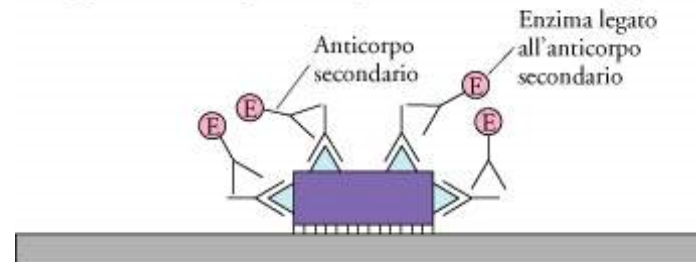
A Ancoraggio del campione al supporto



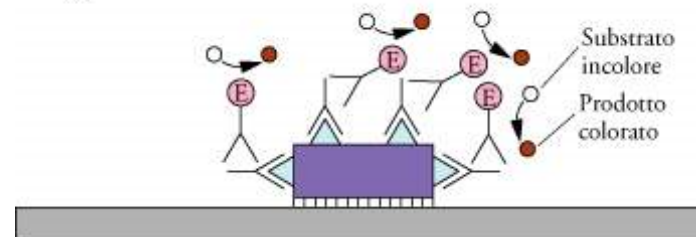
B Aggiunta di anticorpo primario; lavaggio



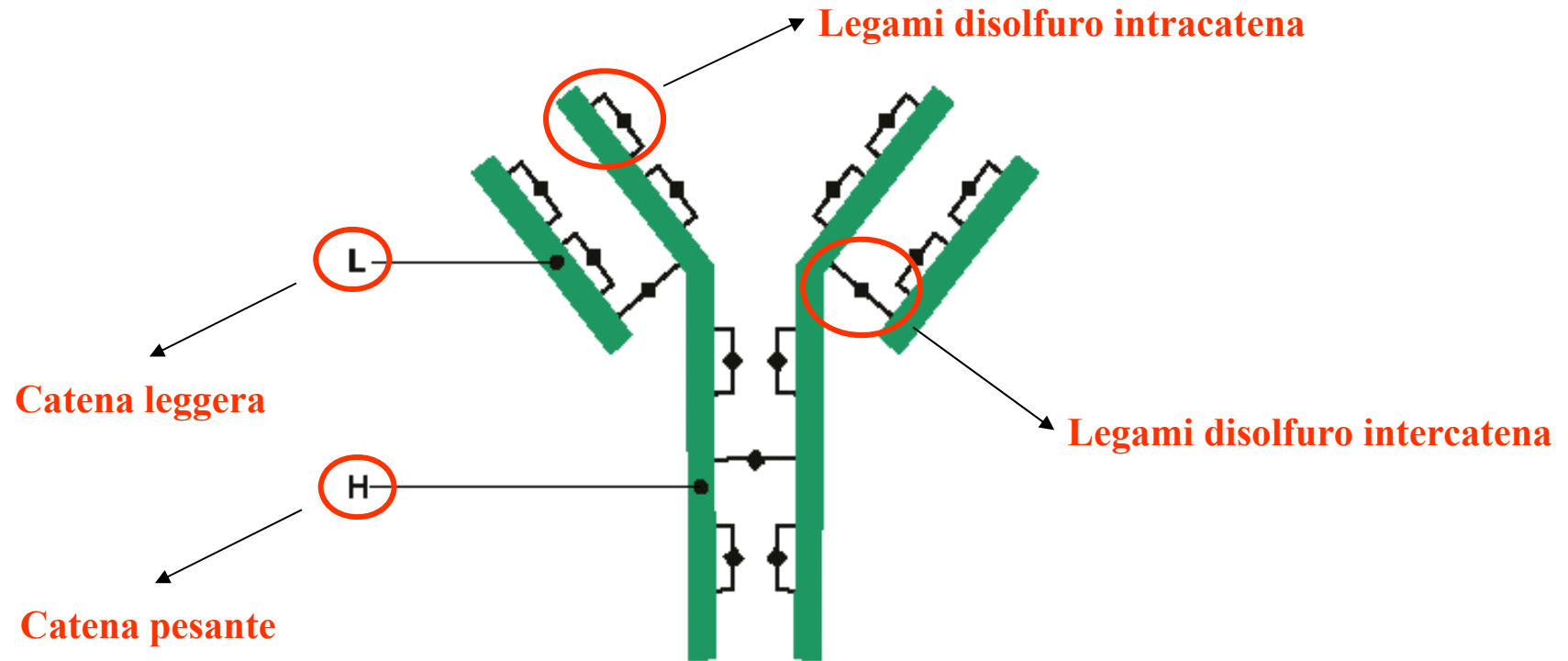
C Aggiunta del coniugato anticorpo secondario-enzima; lavaggio



D Aggiunta del substrato



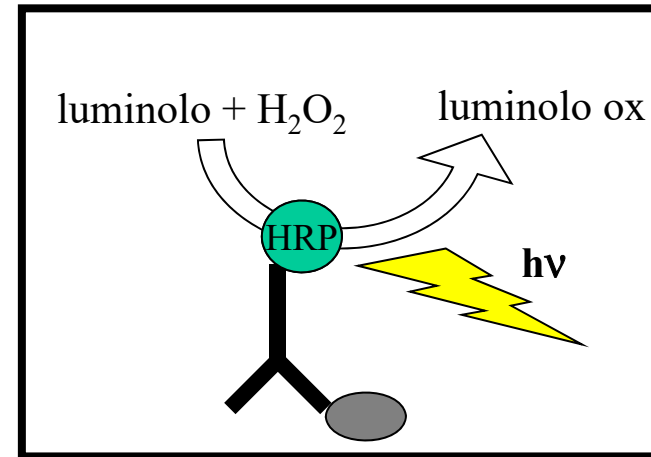
Struttura di un anticorpo



Procedura di colorazione con anticorpi

Colorazione Diretta

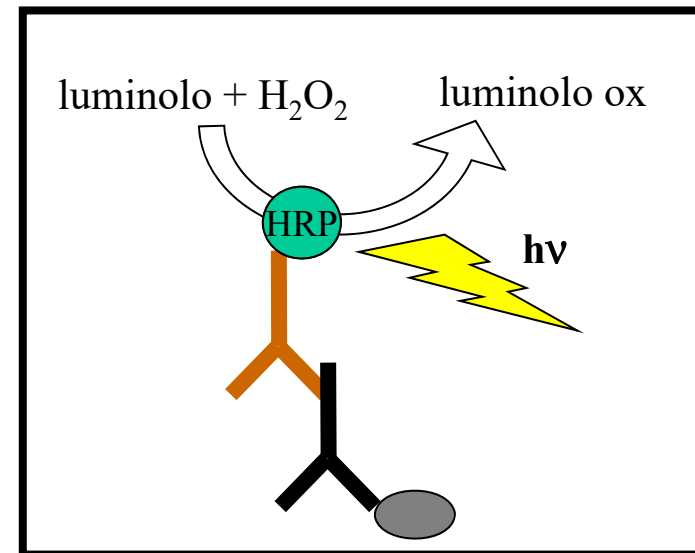
■ **PRIMARY ANTIBODY** The first antibody used in a staining procedure.



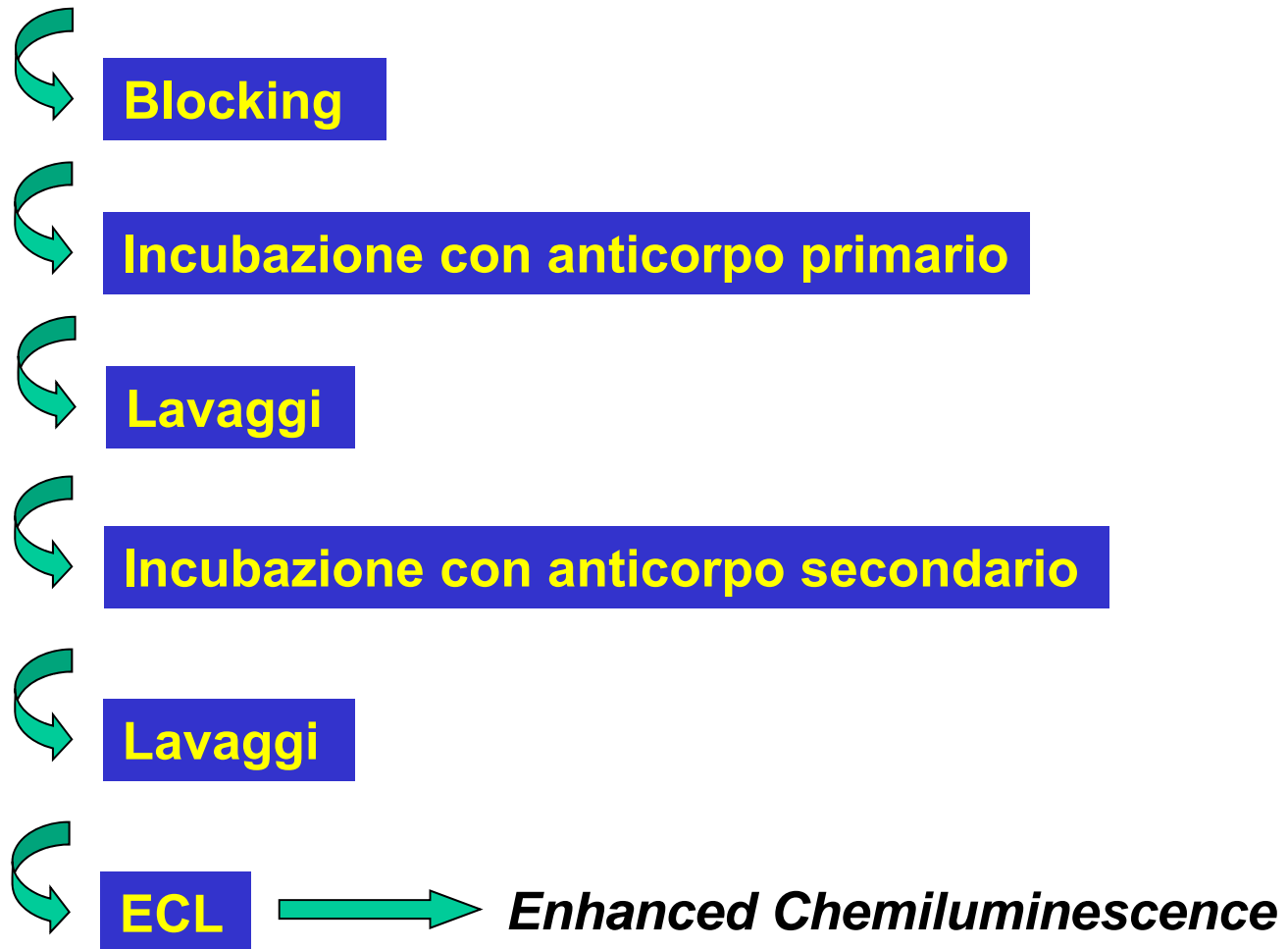
Colorazione Indiretta

■ **PRIMARY ANTIBODY** The first antibody used in a staining procedure.

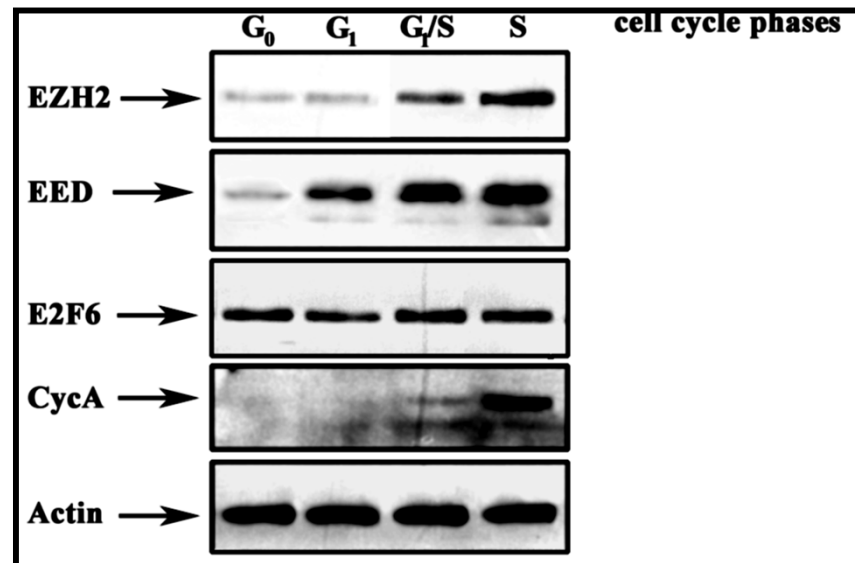
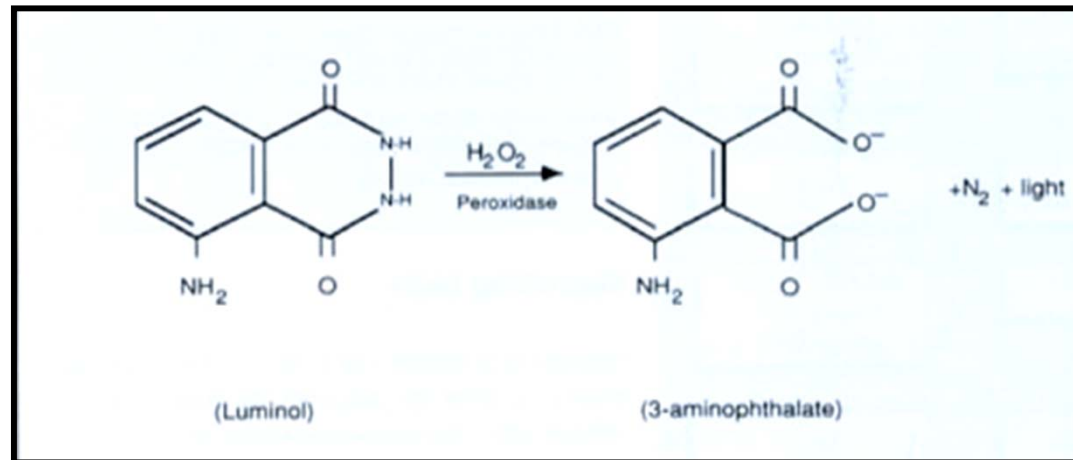
■ **SECONDARY ANTIBODY** The second antibody used in a staining procedure; it reacts with the primary antibody, now the antigen, and forms a bridge between the primary antibody and a subsequent reagent, if any. Also known as "link" antibody.



Fasi dell'immunocolorazione



La reazione in gioco



Isoelettrofocalizzazione (IEF)

L'IEF è una elettroforesi in un gradiente di pH costruito tra un catodo e un anodo. Esso separa le molecole in funzione del loro diverso punto isoelettrico. E' un metodo ad alta risoluzione, in quanto è possibile separare proteine con punti isoelettrici che differiscono per 0.01 unità di pH.

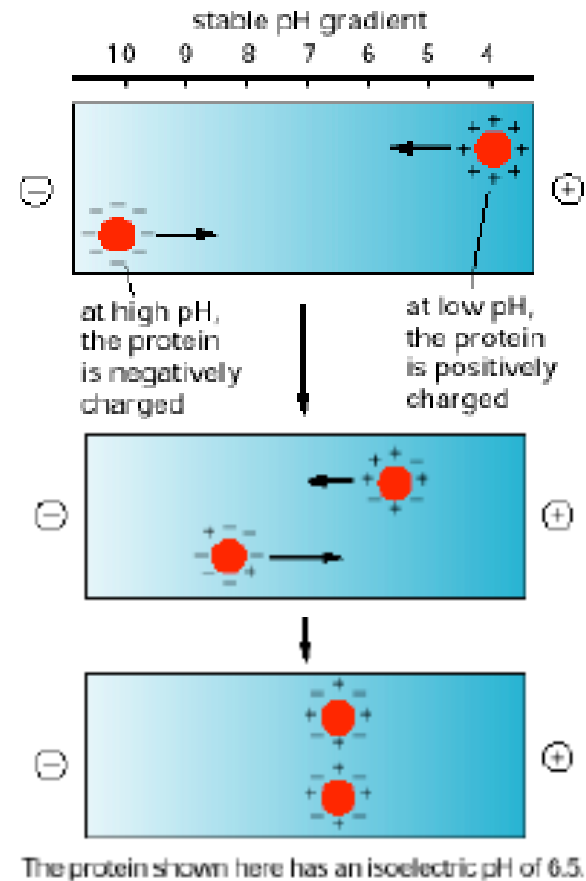
Per creare il gradiente di pH si usano anfoliti di sintesi (miscele di acidi poliammino policarbossilici) che si introducono nel supporto. Se si vuole analizzare qualitativamente una miscela di proteine si dovrà usare un gradiente di pH (es. 3-10). Un intervallo di pH più ristretto è invece utile per determinazioni di pI o quando si analizzano proteine con pI molto simili.

Isoelettrofocalizzazione (IEF)

I campioni possono essere caricati in qualunque punto del gel.

Le proteine si muoveranno verso il loro punto isoelettrico.

Le proteine non saranno più cariche al loro pI.



Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Gli impieghi dell'IEF sono:

- 1. la determinazione del pI di una proteina: la distanza di migrazione della proteina si confronta con quella di proteine con pI noto,**
- 2. la separazione di isoenzimi: si possono distinguere differenti forme molecolari dello stesso enzima, che differiscono per pochi amminoacidi,**
- 3. lo studio della microeterogeneità di una proteina: è possibile scoprire se la proteina subisce una modificazione post-traduzionale (fosforilazione).**

Gel Elettroforesi Bidimensionale

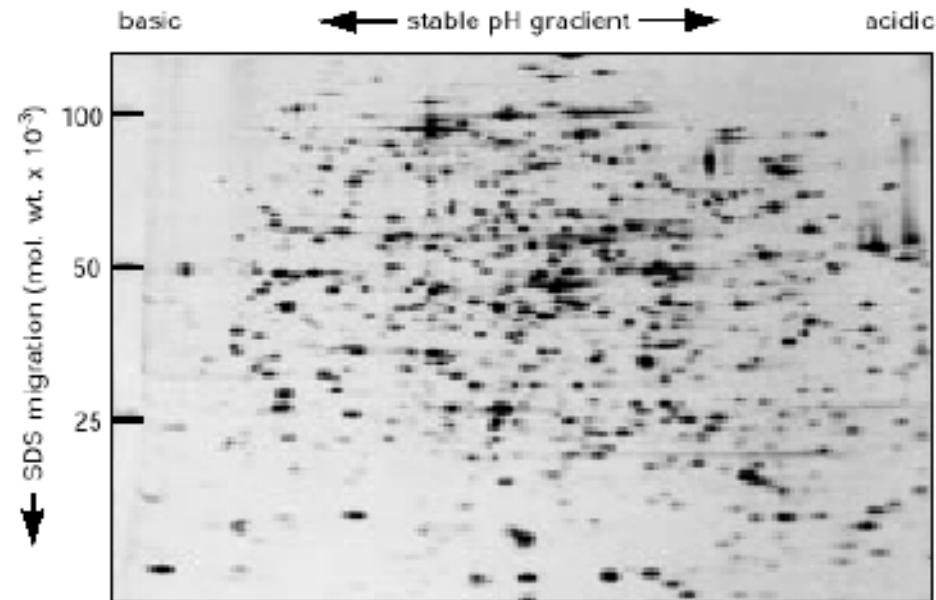
Essa combina le caratteristiche della IEF (proteine separate in base alla loro carica) con quella della SDS-PAGE (separazione in base alle dimensioni delle proteine). La combinazione delle due tecniche nell'elettroforesi bidimensionale permette di analizzare e separare una miscela complessa di proteine.

1° Gel: IEF su gel di poliacrilammide, in presenza di anfolti. Le proteine, nello stato denaturato, si separano quindi in base al loro pI .

2° Gel: il 1° gel è posizionato sopra il gel contenente SDS. Durante l'elettroforesi nella seconda dimensione, le proteine legate all'SDS entrano nel gel e si separano in base al peso molecolare.

Gel Elettroforesi Bidimensionale

Elettroforesi 2D delle proteine contenute in una cellula batterica di *E. coli*



Ogni macchia corrisponde ad una catena polipeptidica; le proteine sono separate in accordo con il loro pI da sinistra a destra e in base alla massa molecolare dall'alto al basso.

Gel Elettroforesi Bidimensionale

PROBLEMA ASSOCIATO ALL'ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE:

Gel 2D possono essere usati per separare >1000 bande/spot, mentre le cellule esprimono da 1000 a 10000 proteine diverse.

APPROCCI PER MIGLIORARE LA SEPARAZIONE DELLE PROTEINE:

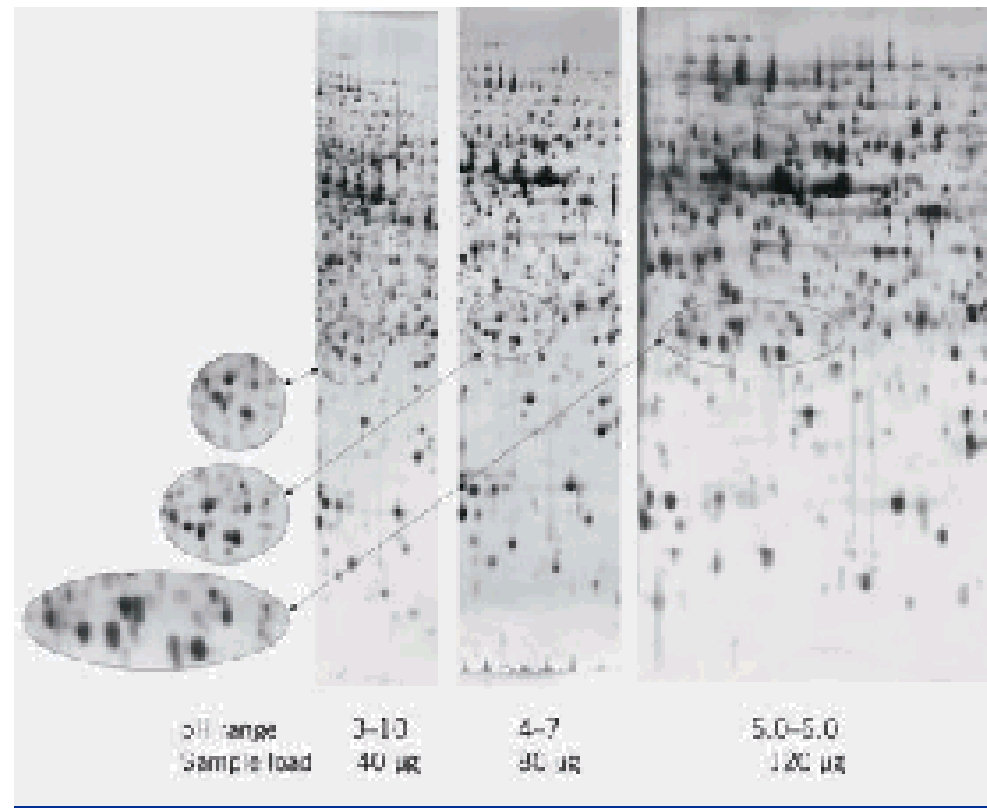
- ✓ Separazione in base alle differenti solubilità o compartimentazione delle proteine
- ✓ Intervallo più stretto delle IPG strips per focalizzare un particolare intervallo di pI

Le IPG strips (Immobylin Polyacrilamide Gel strips) sono strisce di gel di acrilamide con gradiente fisso di pH.

Gel Elettroforesi Bidimensionale

ZOOMING

Usare strip IPG ad intervallo ristretto, in modo da focalizzare un particolare intervallo di pI.



Proteomica

Lo studio del genoma (genomica) o della trascrizione genica non è sufficiente per descrivere le differenze che possono esistere fra una cellula ed un'altra.

Genoma



35000 geni

- ✓ Molti hanno varianti di splicing,
- ✓ molti subiscono modificazioni extra-chimiche che alterano la loro funzione,
- ✓ molti subiscono tagli proteolitici,
- ✓ molti devono essere trasportati a localizzazioni specifiche per avere una competenza funzionale;

é più utile studiare l'insieme delle proteine contenute in una cellula (proteoma),

la proteomica è l'analisi diretta del proteoma, cioè la misura della presenza di proteine in una cellula e della loro abbondanza relativa.

Proteomica

Perchè studiare la Proteomica?

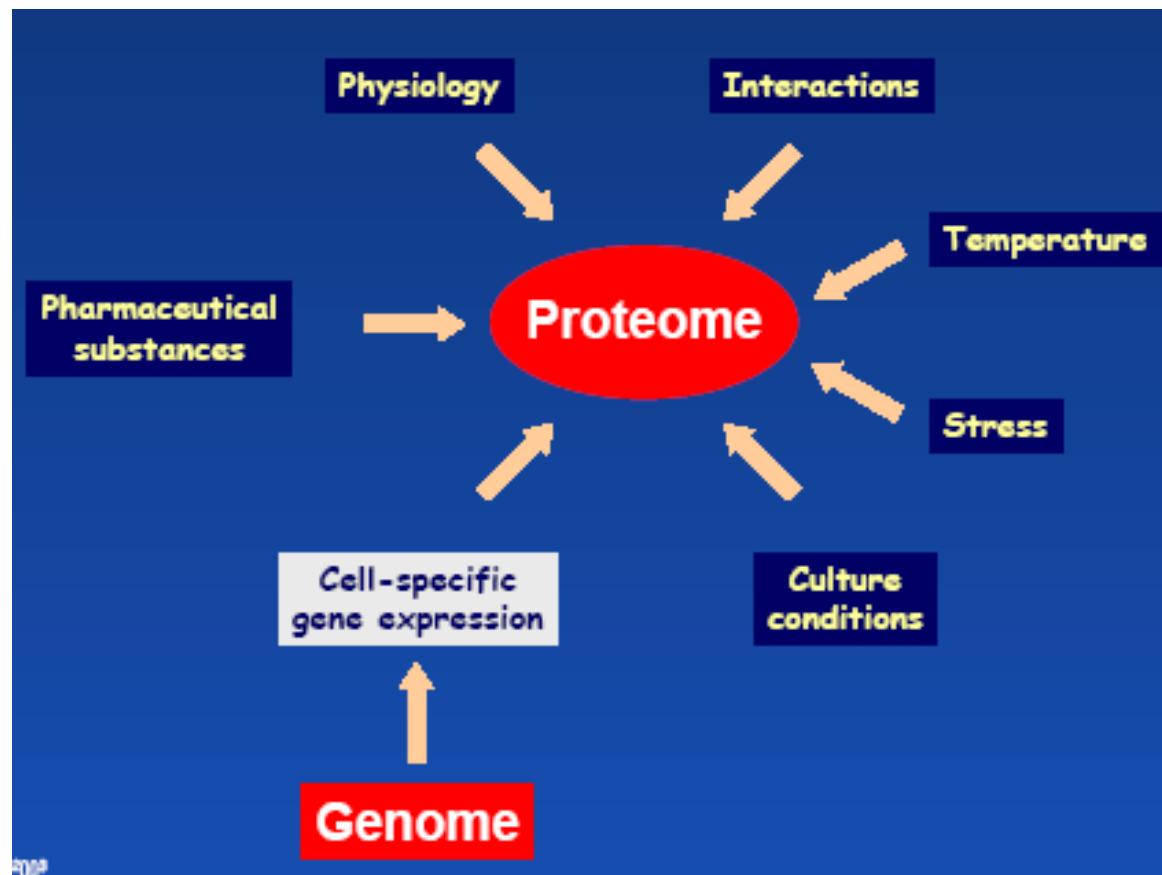
Per comprendere meglio l'espressione e la formazione delle proteine:

- ✓ controllo trascrizionale,
- ✓ controllo post-trascrizionale (splicing alternativo, editing dell'RNA),
- ✓ controllo traduzionale e della degradazione,
- ✓ controllo delle modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, glicosilazione, attacco di lipidi, taglio peptidico):

Modification	Residues	Role
Cleavage	Various	Activation of proenzymes and precursors
Glycosylation	Asn,Ser,Thr	Molecular targeting, cell-cell recognition etc
Phosphorylation	Ser,Thr,Tyr	Control metabolic processes & signalling
Hydroxylation	Pro, Lys	Increase H-bonding & glycosylation sites
Acetylation	Lys	Alter charge & weaken interactions with DNA
Methylation	Lys	Alter interactions with other molecules
Carboxylation	Glu	More negative charge, e.g. to bind Ca
Transamidation	Gln, Lys	Formation of crosslinks in fibrin

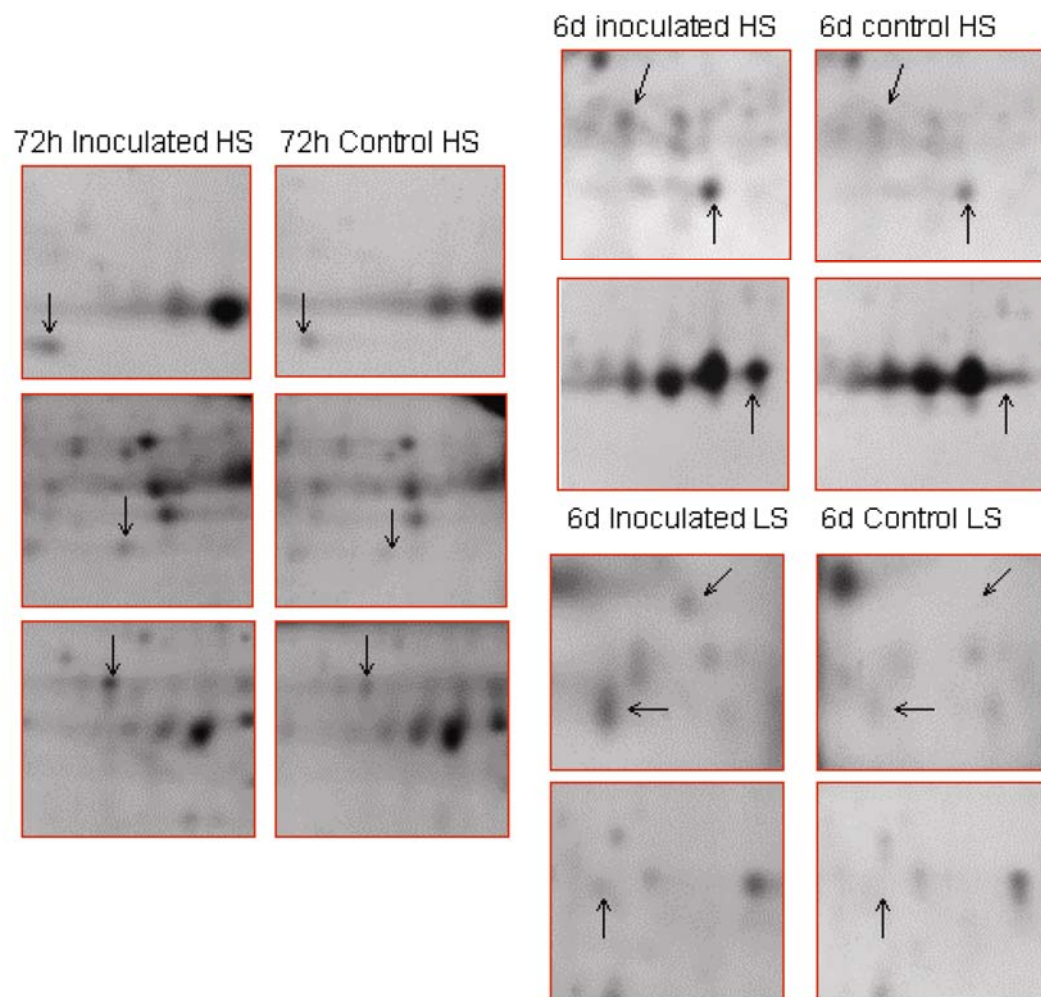
Proteomica

Il proteoma cambia la sua composizione in seguito a diversi stimoli, che agiscono a diversi livelli:



Espressione Proteica Differenziale

Attraverso l'elettroforesi bidimensionale è possibile confrontare il proteoma di una cellula in seguito ad un trattamento:



Analisi dell'Immagine



I gel bidimensionali possono essere acquisiti mediante scanner e camere digitali e le proteine ottenute analizzate tramite software specializzati (ImageMaster, Melanie III, PDQuest).



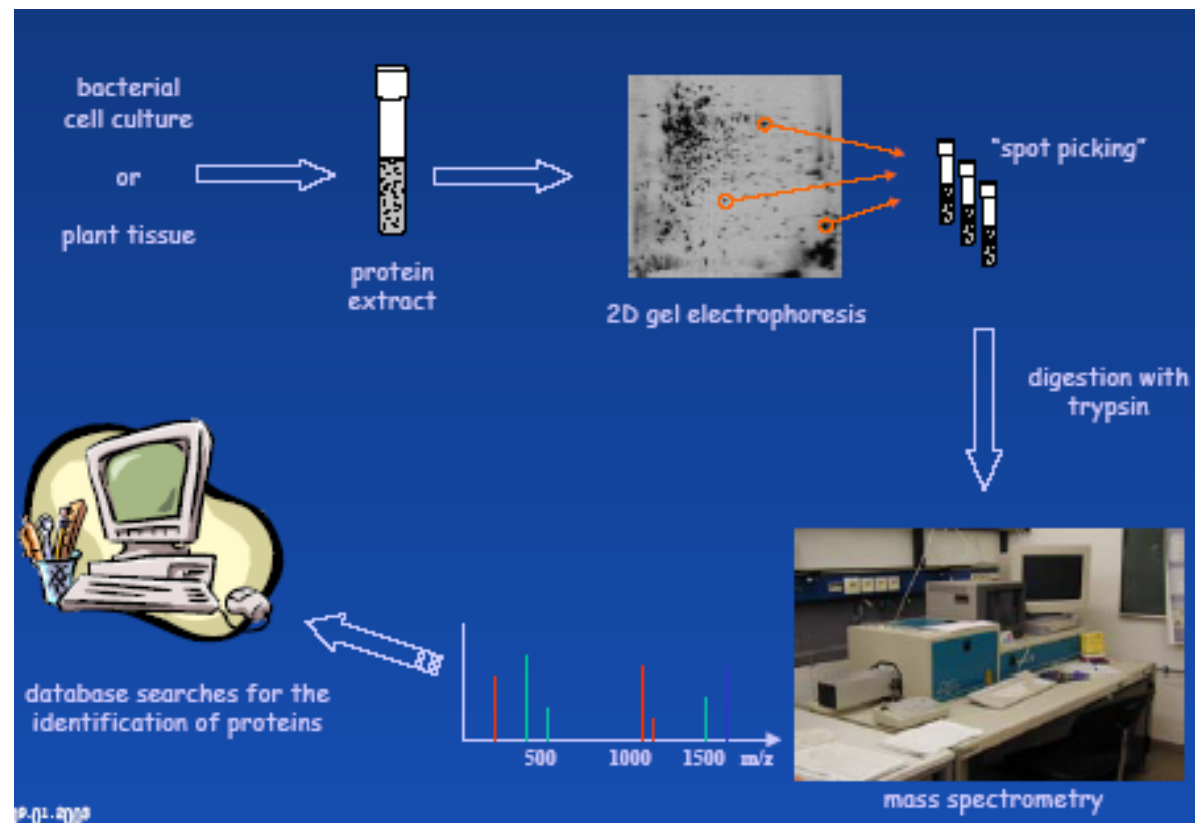
Le funzioni del software:

- quantificazione,
- identificazione,
- allineamento,
- confronto,
- corrispondenza fra due bande.

Identificazione di una Proteina

Una volta identificato uno spot d'interesse in una mappa bidimensionale, è possibile risalire a quale proteina corrisponde.

L'identificazione richiede normalmente l'analisi mediante spettrometria di massa (MS) e ricerca su database della proteina corrispondente.



Principio della Spettrometria di Massa

Si può separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (generalmente tramite campi magnetici),

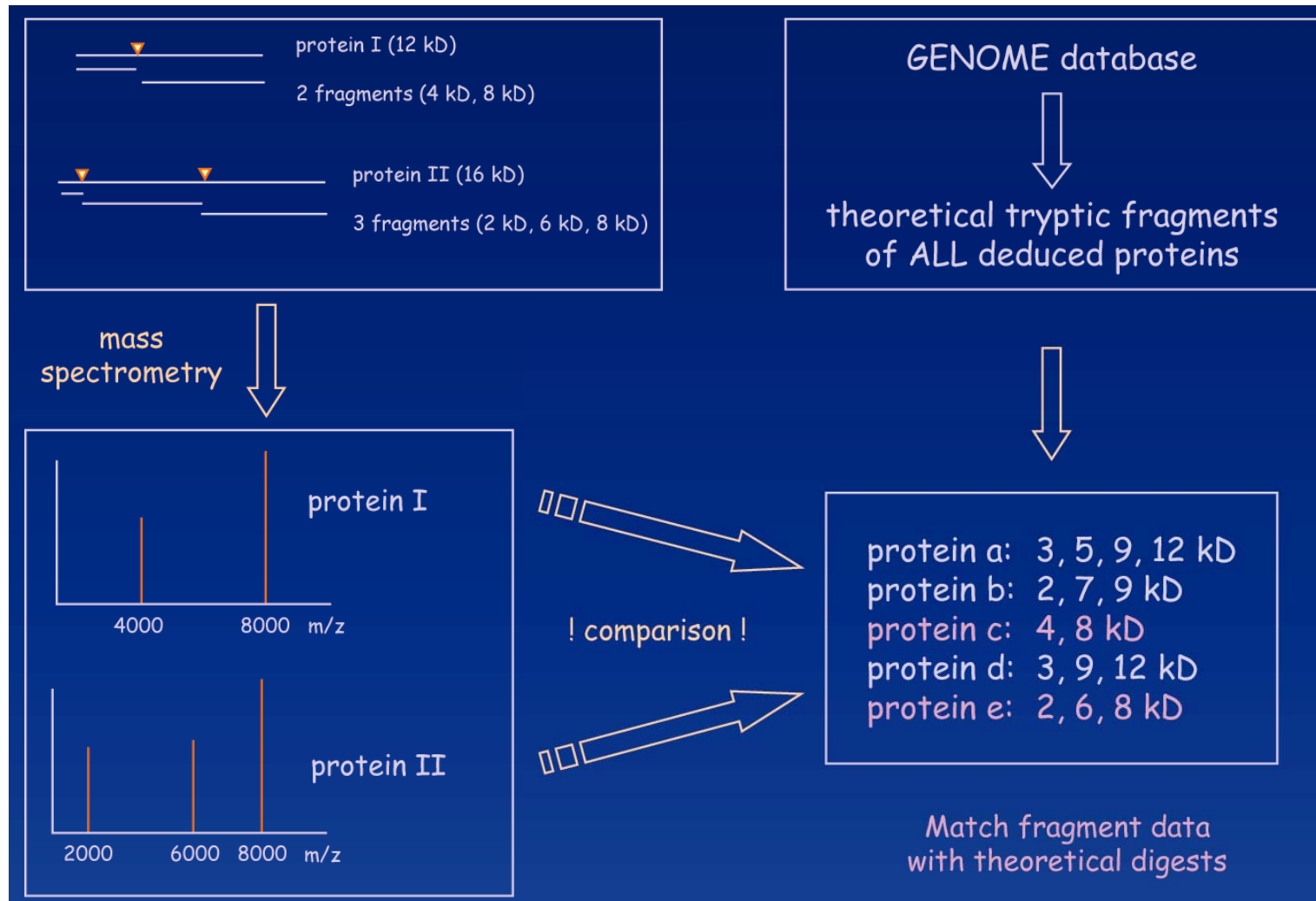
tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota,

le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica;

il diagramma che si ottiene, cioè la separazione degli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z), è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto.

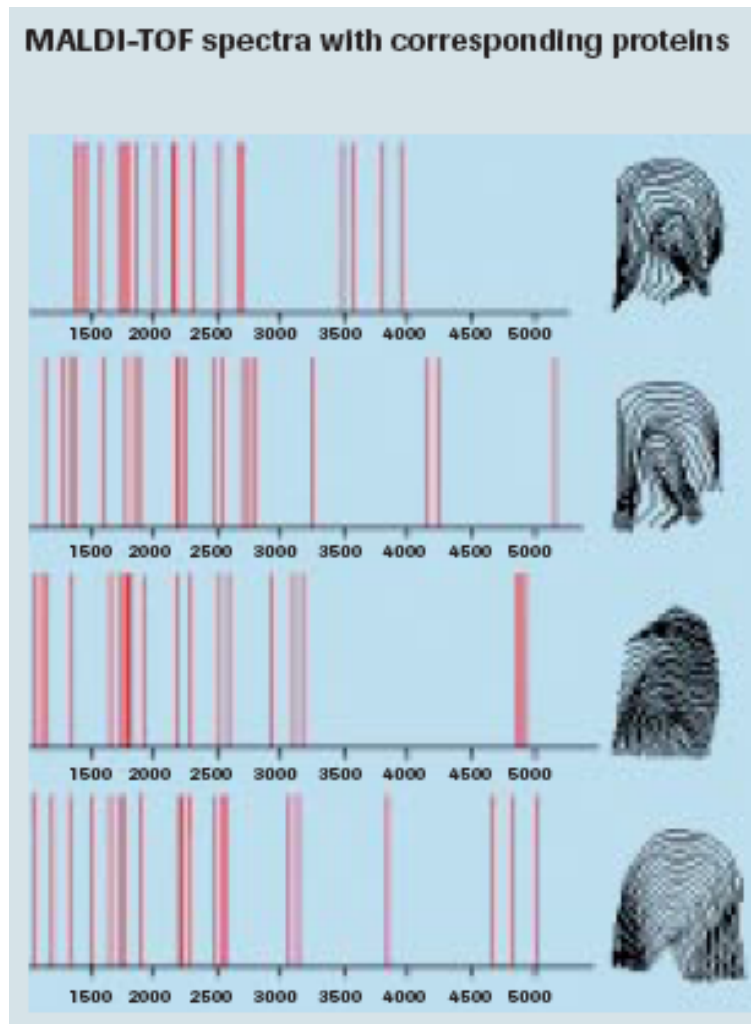
Identificazione di una Proteina

L'identificazione di uno spot richiede la digestione con enzimi proteolitici (tripsina) che generano frammenti della proteina che si vuole identificare.



Identificazione di una Proteina

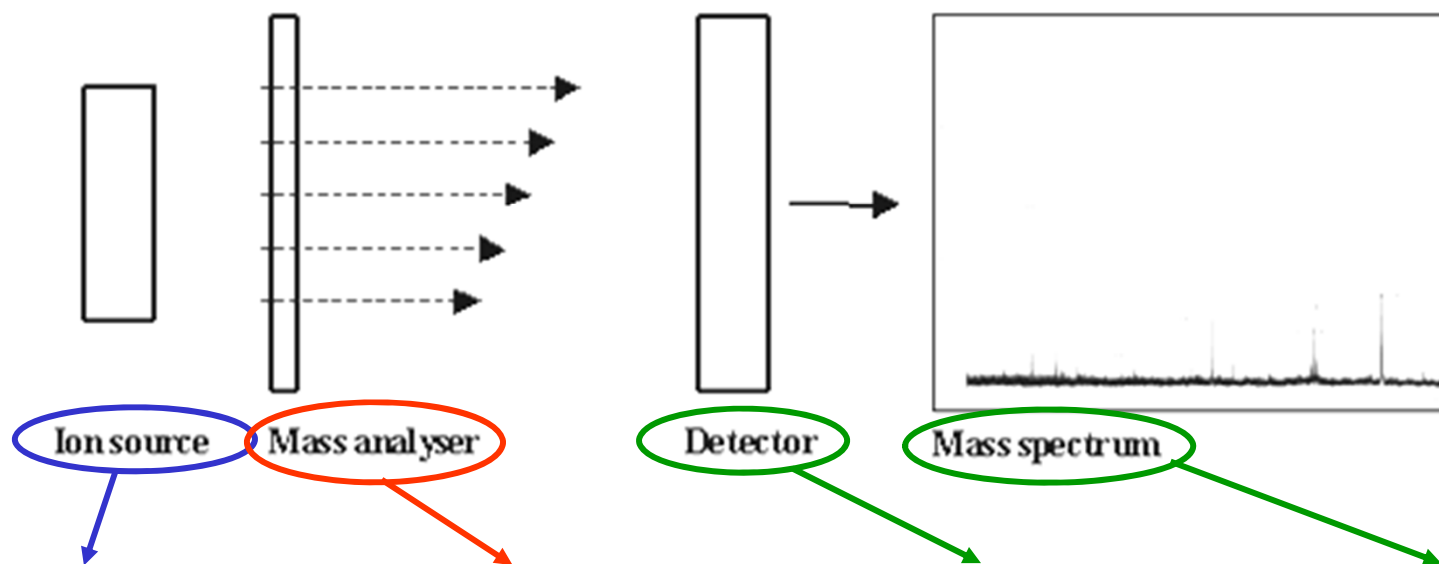
La digestione con tripsina della banda estratta dal gel bidimensionale permette di ottenere un'impronta (fingerprint), caratteristica ed unica per ogni proteina.



Spettrometria di Massa

Per separare i frammenti generati dalla digestione con tripsina si utilizza la spettrometria di massa (MS).

Gli spettrometri di massa permettono di misurare accuratamente la massa della maggior parte delle molecole che possono essere ionizzate in fase gassosa.



La sorgente di ioni permette di convertire le molecole in ioni in fase gassosa

L'analizzatore di massa permette di separare gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z)

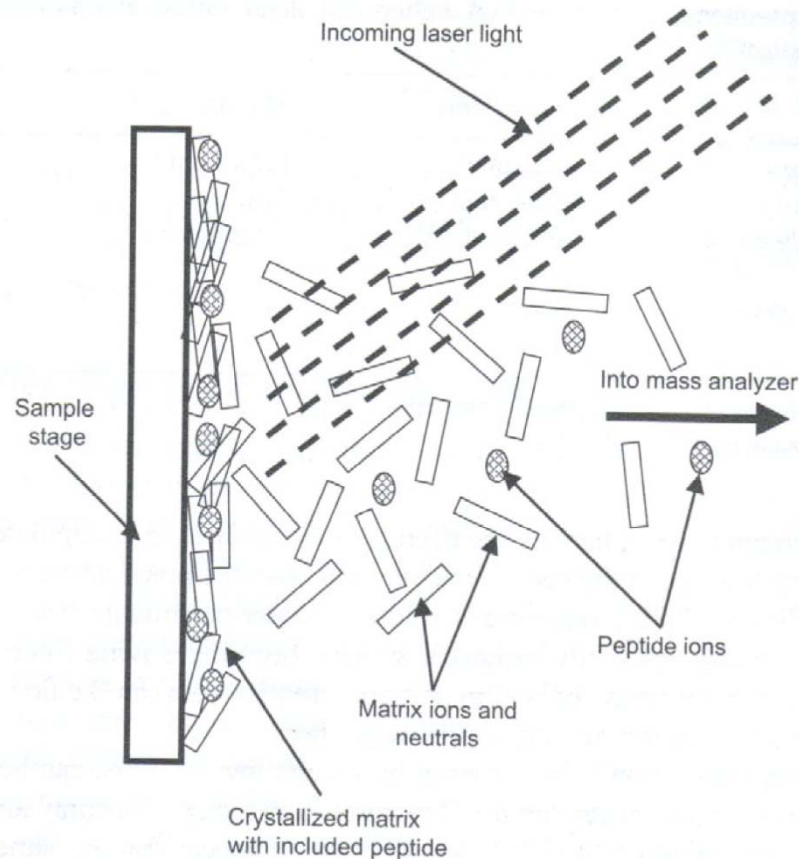
Il detector è un moltiplicatore di elettroni che permette di identificare i frammenti

Gli spettri ottenuti indicano l'intensità degli ioni rispetto al rapporto m/z

MALDI-TOF

Una variante della spettrometria di massa applicabile all'identificazione di frammenti proteici è la MALDI-TOF MS (MALDI = desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice).

Matrix
Assisted
Laser
Desorption
Ionization
-
Time
Of
Flight
Mass
Spectrometry



I peptidi triptici vengono co-cristallizzati con la cosiddetta matrice su un supporto in acciaio.

Il supporto con la matrice viene irradiato da un laser a 337nm.

La matrice con il peptide incluso viene vaporizzata.

I peptidi nello stato gassoso vengono protonati ed entrano nella MS.

Principio della MALDI-TOF

La tecnica consiste nell'assorbire il campione su di una matrice organica (es. glicerolo, acido succinico ecc.) e, portata in soluzione, nel bombardarla successivamente con un fascio laser (spesso un laser ad azoto).

La matrice deve possedere determinate caratteristiche chimico-fisiche:

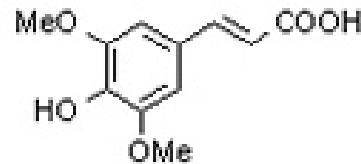
- 1) essere facilmente evaporabile,
- 2) avere un certo carattere acido, in modo da fungere da fonte di protoni incoraggiando la ionizzazione dell'analita,
- 3) possedere un forte assorbimento ottico nella regione UV tale che le permetta di assorbire la radiazione laser in modo efficiente,
- 4) possedere gruppi polari ed essere idrosolubile.

Principio della MALDI-TOF

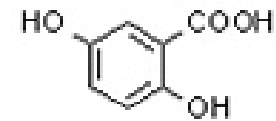
La matrice è formata da piccole molecole organiche che, aggiunte all'analita, evita la fotodissociazione dei campioni indotti dall'irradiazione laser diretta.



alpha-cyano-hydroxycinnamic acid (CHCA)



sinapinic acid (SA)



2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)

Queste molecole, in grado di assorbire la luce del laser utilizzato, sono mescolate con i campioni e lasciati asciugare in modo da formare un supporto cristallino su un supporto di acciaio.

Principio della MALDI-TOF

Tramite il desorbimento, il campione viene rilasciato in forma "clusterizzata", ovvero complessato con la matrice,

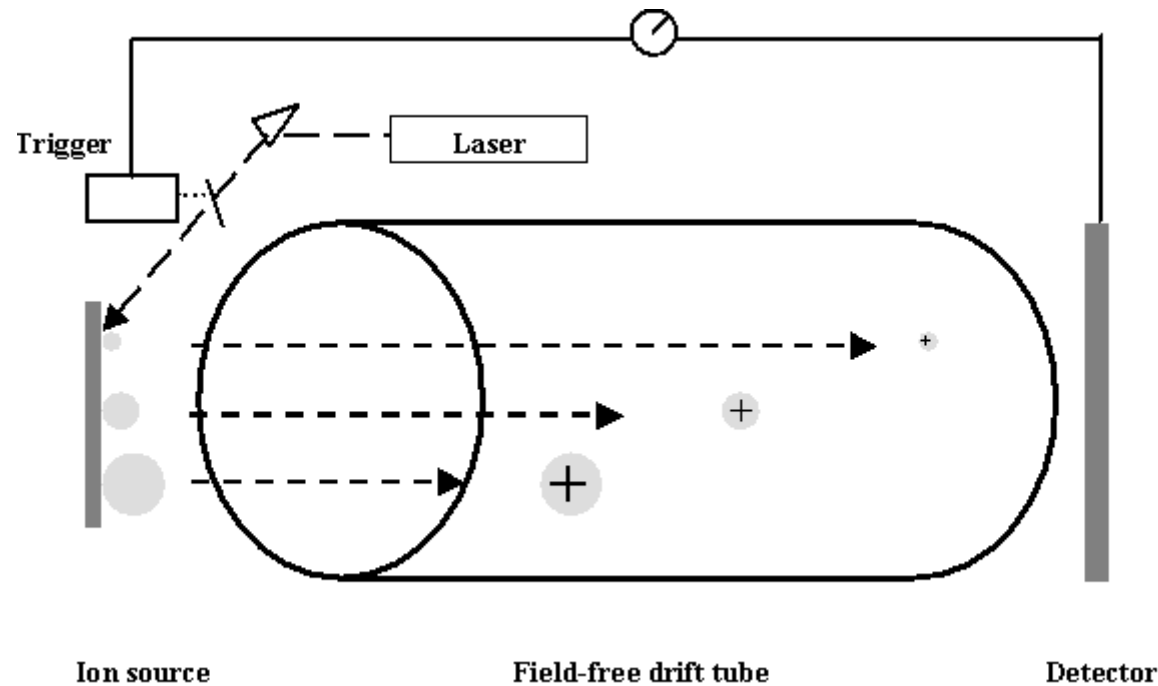
l'analita viene ionizzato e vaporizzato;

vengono così ottenuti ioni generalmente a singola carica.

Molto spesso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di analizzatore a tempo di volo (Time of flight, TOF).

Principio della MALDI-TOF

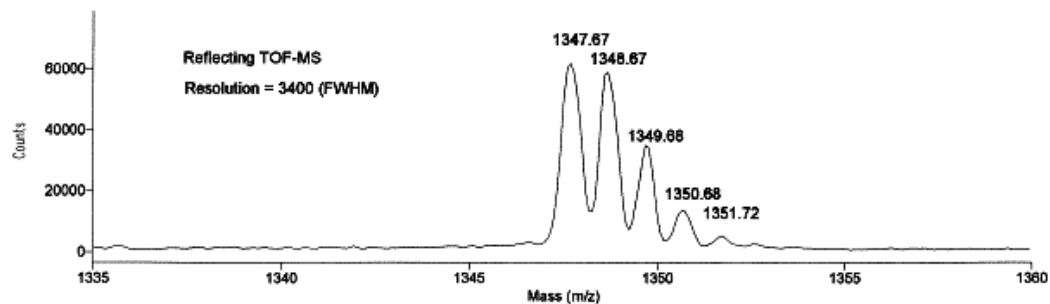
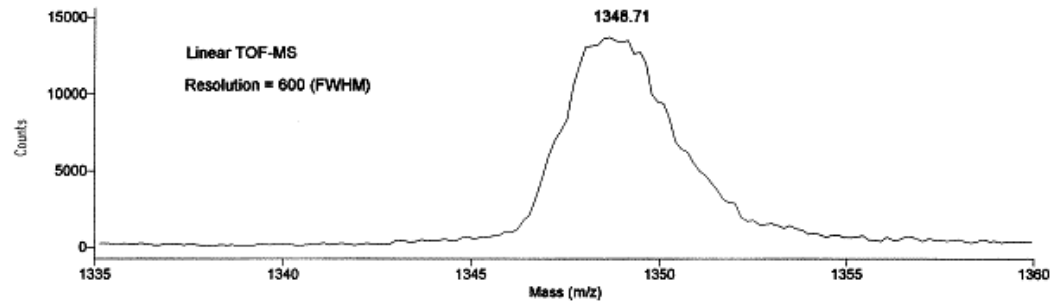
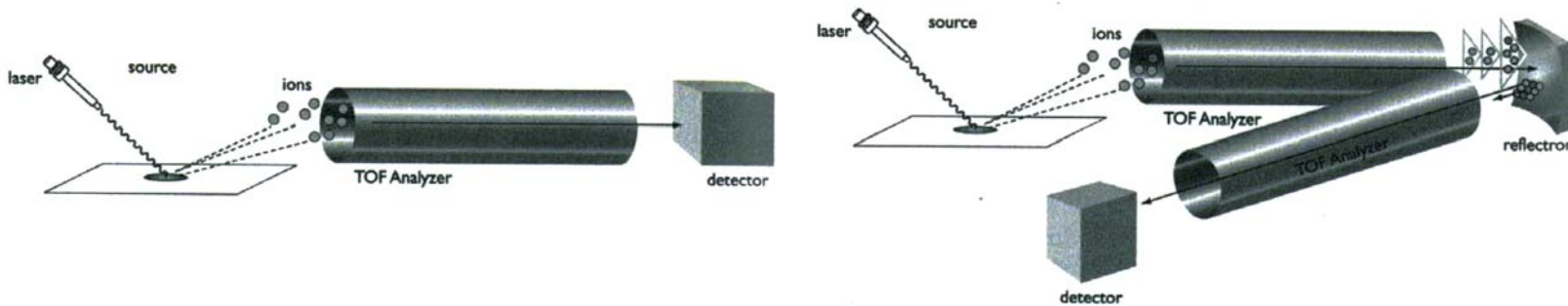
Gli ioni del campione ottenuti con il MALDI vengono dirottati in un tubo (tubo di volo) a cui viene applicato il vuoto e accelerati con un campo elettrico ad alto voltaggio fino al detector, che registrerà il “tempo di volo” (time-of-flight), cioè il tempo che impiegheranno per attraversare il campo.



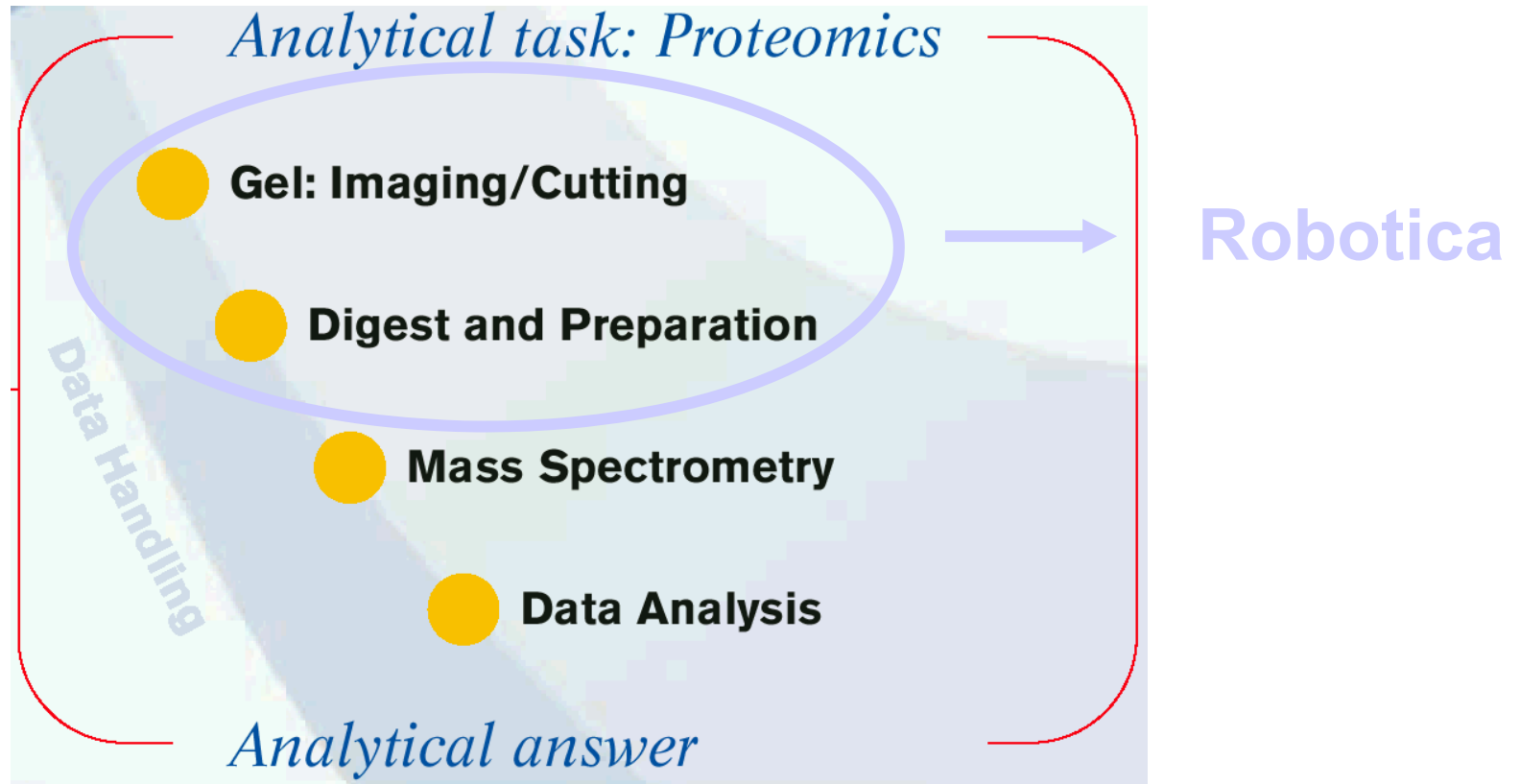
Frammenti più piccoli avranno tempi di percorrenza più brevi, mentre frammenti più grandi impiegheranno più tempo per attraversare il tubo. Attraverso il tempo di percorrenza sarà possibile risalire al rapporto m/z del frammento.

Principio della MALDI-TOF

Per aumentare la risoluzione dei picchi ottenuti con il MALDI-TOF è possibile usare un riflettore, che si comporta da specchio di ioni.



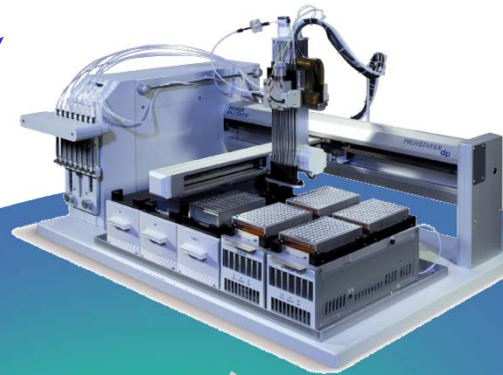
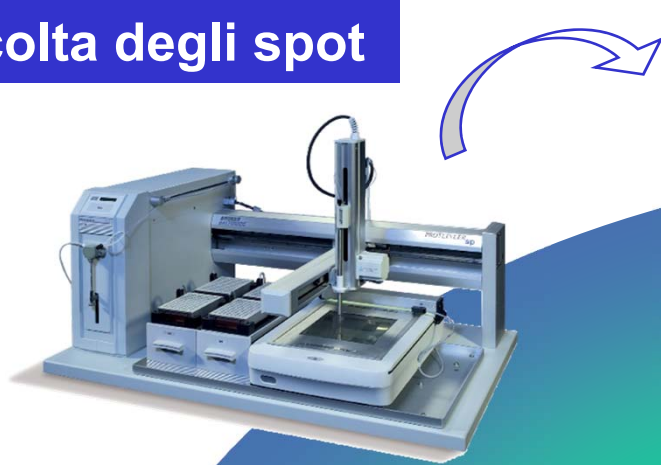
MALDI-TOF



MALDI-TOF

Strumentazione

Raccolta degli spot



Digestione



MALDI-TOF



Gli Usi della MALDI-TOF

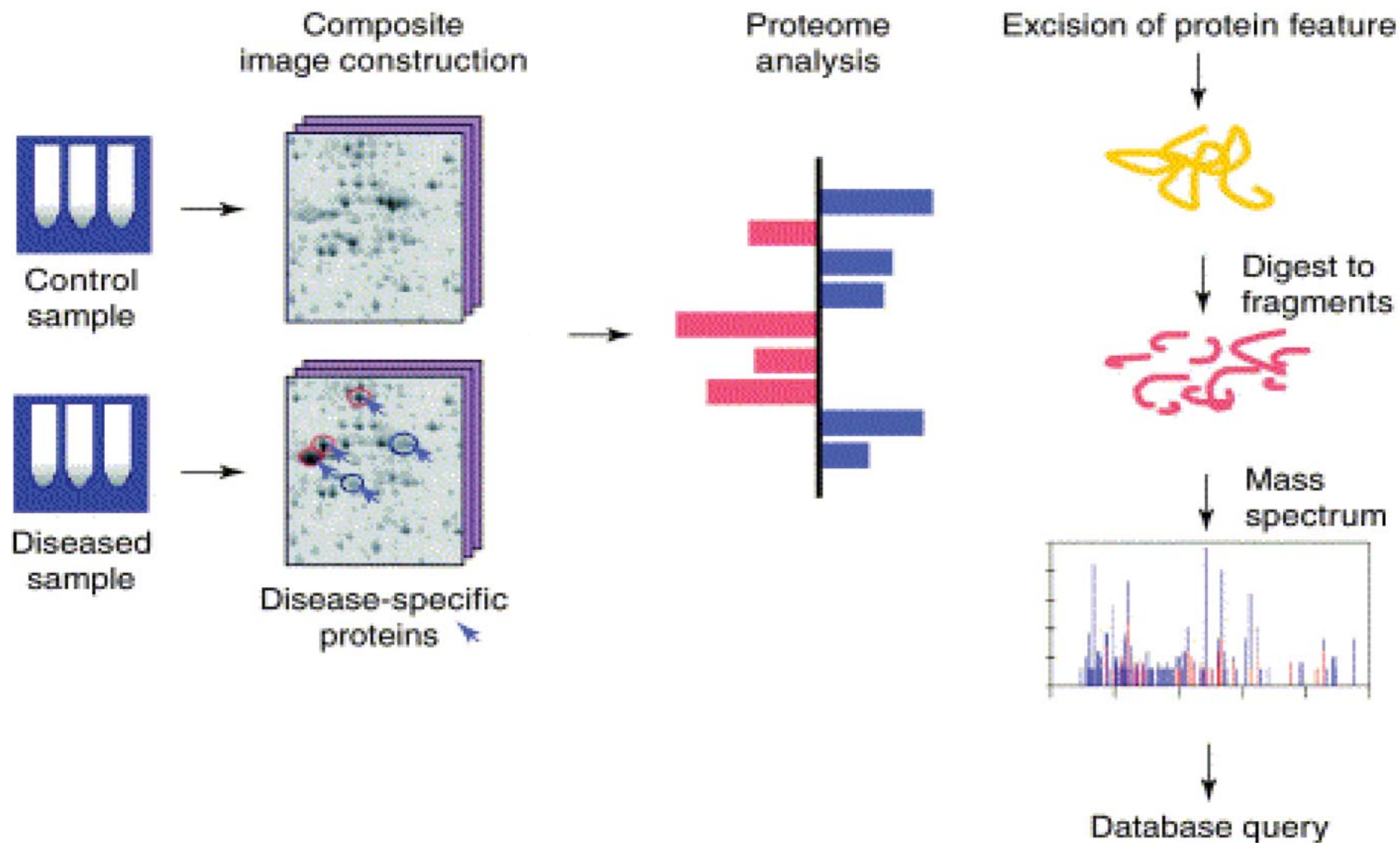
Questa tecnica è indicata per l'analisi di composti termolabili e ad alto peso molecolare, ad es. biopolimeri quali:

proteine,
peptidi,
zuccheri;

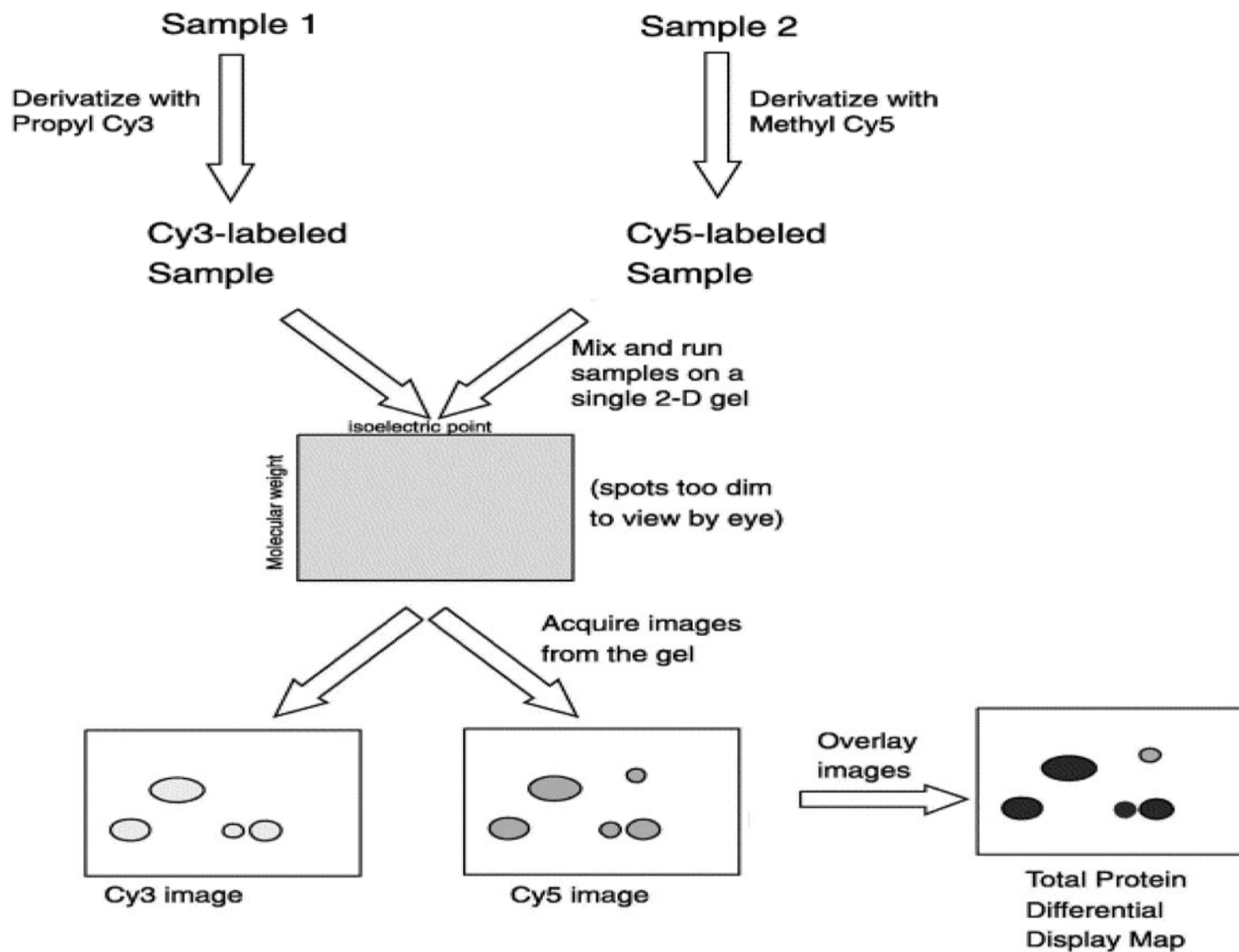
esse sono molecole particolarmente fragili e soggette a distruzione troppo rapida con le tecniche di ionizzazione convenzionali.

La MALDI-TOF viene comunemente utilizzata anche per la caratterizzazione dei farmaci.

Analisi del Profilo dell'Espressione Proteica



Analisi del Profilo dell'Espressione Proteica



Multiplexed Proteomics (MP)

La glicosilazione delle proteine è sempre più riconosciuta come una delle più importanti alterazioni biochimiche associate alla trasformazione maligna.

La Proteomica Multiplexed (MP) è una nuova tecnologia che permette di rilevare e quantificare, con tecniche fluorescenti, le variazioni dei livelli di glicosilazione delle proteine, sia nel gel bidimensionale (2-D), sia nel Western blotting.

Queste nuove informazioni permettono quindi di affrontare questioni fondamentali come quelle riguardanti lo studio dei tumori.

Analisi del Profilo dell'Espressione Proteica

Multiplexed Proteomics (MP)

