

# **Basi Molecolari delle Malattie**

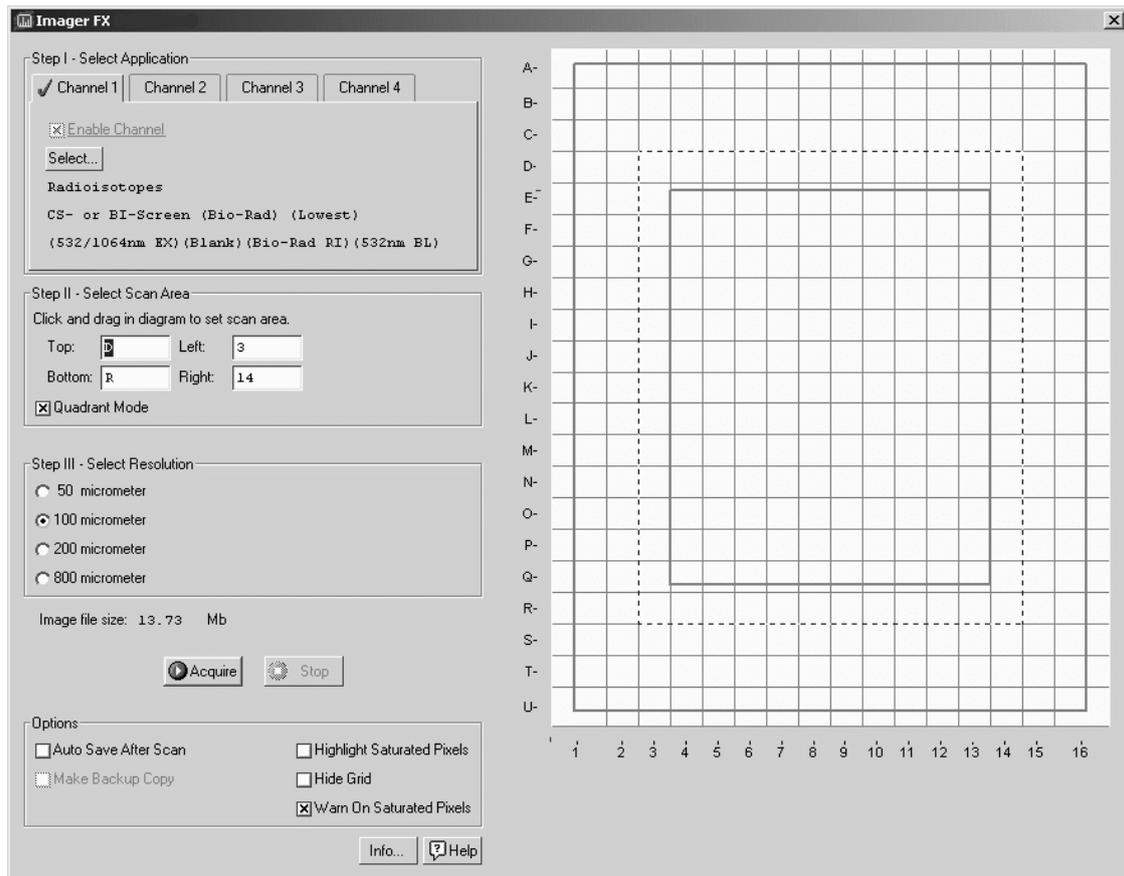
## ***Elettroforesi Bidimensionale (2D) Acquisizione, elaborazione e carotaggio dello spot***

### **Acquisizione dell'immagine**

Questo processo è indispensabile per ottenere una copia digitalizzata della mappa 2D precedentemente ottenuta in laboratorio.

### **Procedimento**

1. adagiare il gel sul piatto di acquisizione dello strumento (Pharos FX, BioRad);
2. avviare il software di acquisizione (Quantity One) e connettere lo strumento (dal menù "File"). In questo modo apparirà la finestra di acquisizione (figura);



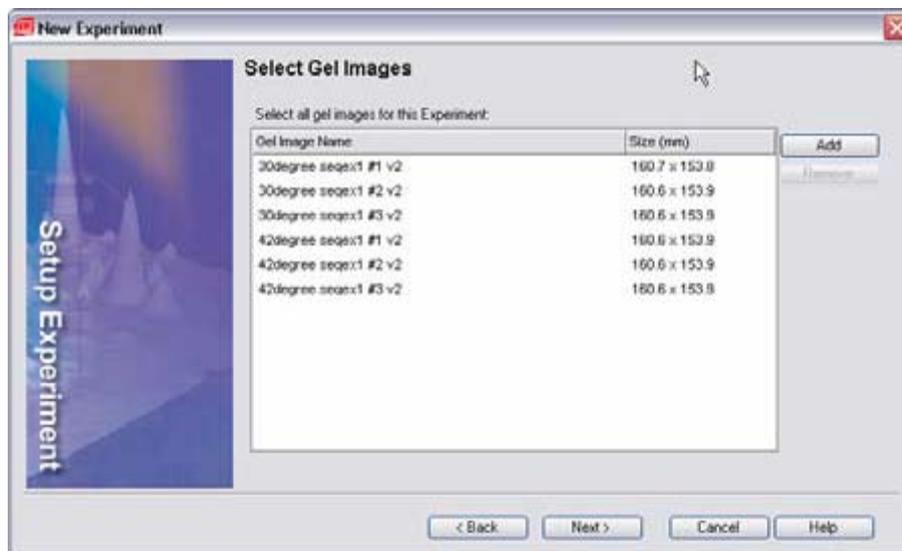
3. nello step I della finestra impostare il tipo di colorazione del gel e la sensibilità con cui lo strumento dovrà acquisire l'immagine (molto alta per mappe poco intense e viceversa);
4. nello step II è possibile circoscrivere l'area in base alla posizione del gel sul piatto;
5. nello step III selezionare in prima istanza una risoluzione bassa (800  $\mu\text{m}$ ) ed avviare una prima scansione grossolana; al termine è possibile valutare la sensibilità di acquisizione e circoscrivere meglio l'area della scansione;
6. eseguire una scansione fine a 100  $\mu\text{m}$ ;
7. sull'immagine ottenuta al termine della scansione è possibile modificare parametri quali la luminosità, il contrasto, le dimensioni e l'orientamento del gel. **Tutto ciò deve essere fatto scrupolosamente allo stesso modo per i gel che verranno confrontati poiché variazioni dovute all'operatore potrebbero essere interpretate in fase di elaborazione come variazioni quantitative non reali;**
8. salvare il file.

## Elaborazione dell'immagine

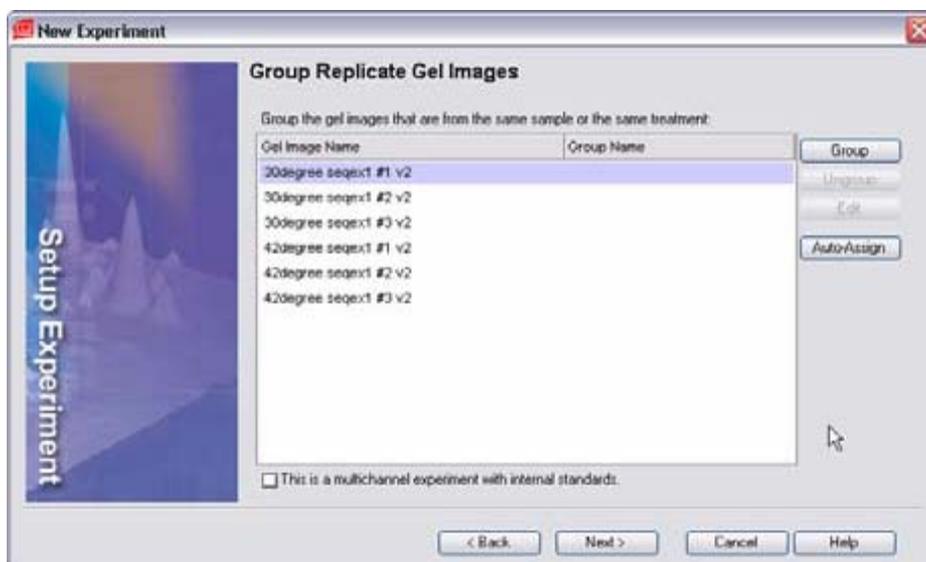
Questo processo è indispensabile per l'identificazione degli spot e l'analisi, in termini di variazioni quantitative e qualitative, degli spot appartenenti a mappe diverse.

## Procedimento

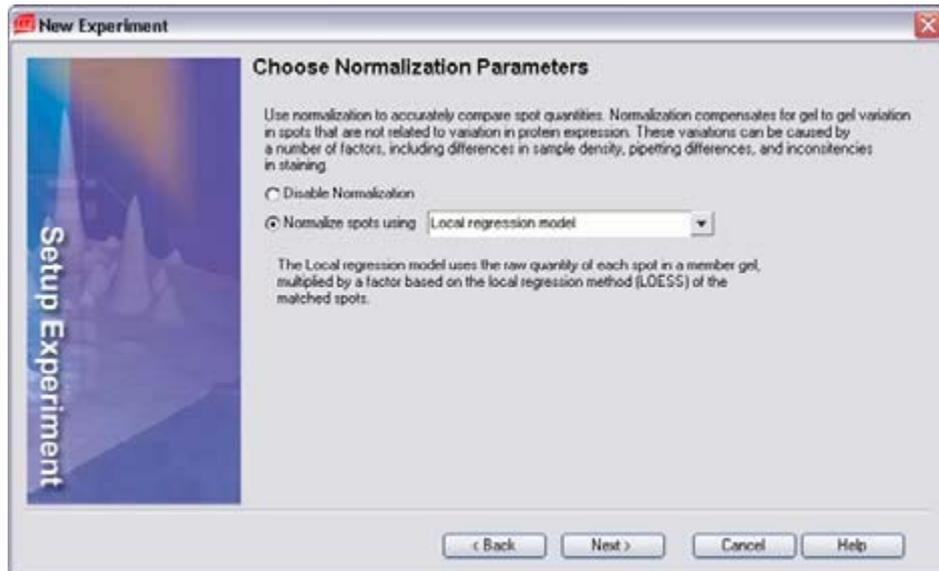
1. avviare il software di elaborazione (PD Quest);
2. aprire le immagini delle mappe da analizzare (**le mappe devono essere le più simili possibili per dimensione totale e separazione delle proteine nelle due dimensioni**);



3. assegnare a un gruppo specifico tutti i gel nei quali è stato caricato lo stesso campione (saranno i gruppi che verranno poi confrontati tra loro);

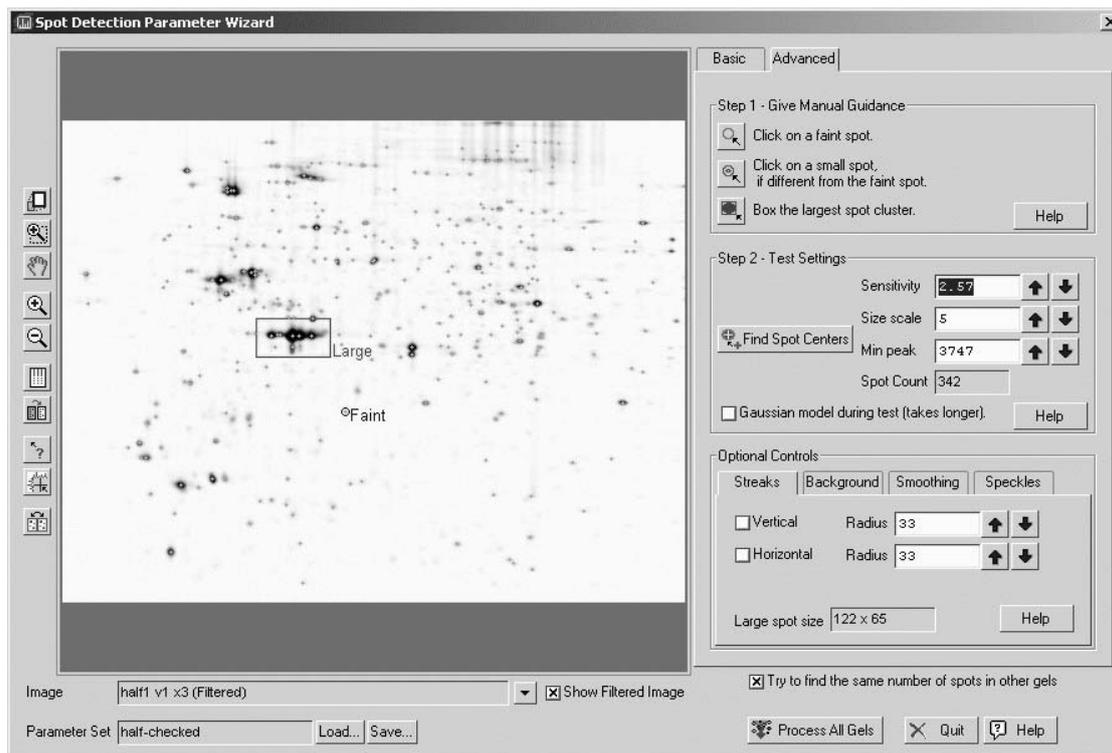


4. impostare la detection guidata degli spot e spuntare il WARP (con il Warp il software allinea il più possibile gli spot tra i diversi gel);
5. impostare il criterio di normalizzazione "total quantity in valid spot"; la normalizzazione è un passaggio molto importante poiché permette al software di azzerare le differenze dovute soprattutto al background tra gel diversi, a differenze minime di caricamento dei campioni, a pipettate non identiche, etc...



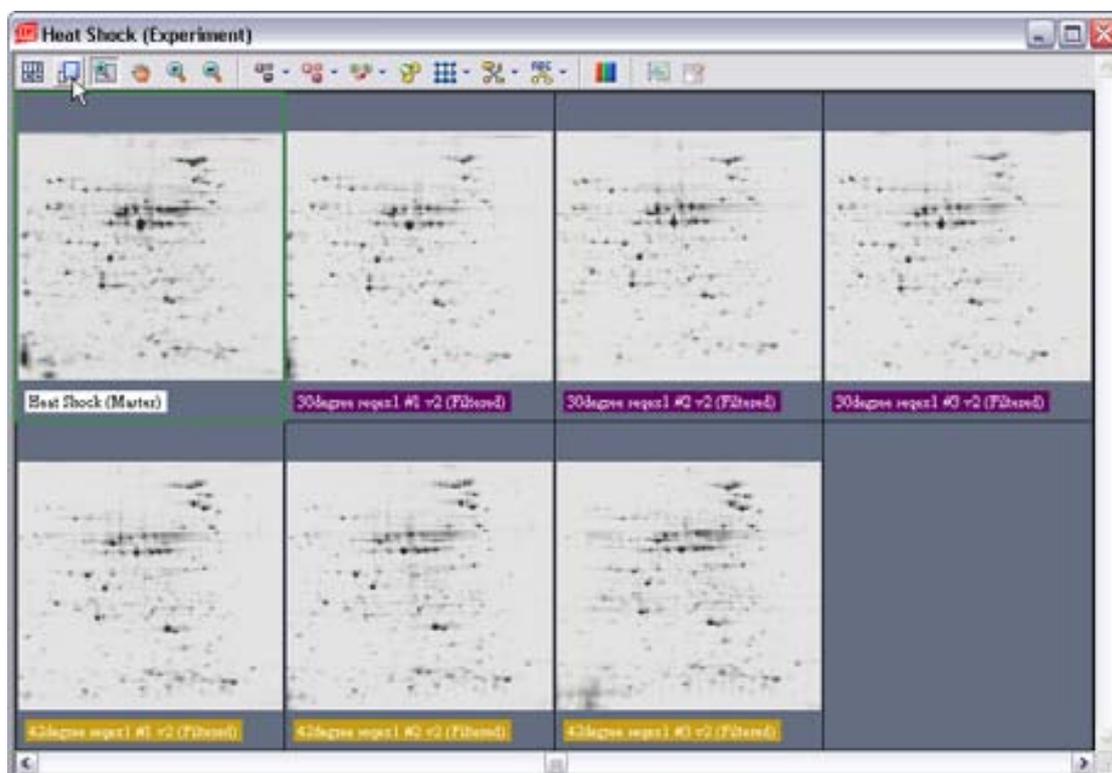
6. indicare al software alcuni parametri importanti per l'individuazione degli spot e le successive analisi quali:
  - lo spot meno intenso
  - lo spot più piccolo
  - lo spot più grande
  - la sensibilità

e verranno così marcati con una croce tutti gli spot che rispondono ai criteri da noi forniti, inclusi a volte anche gli artefatti.



**Pannello per la scelta dei riferimenti per l'identificazione degli spot**

- al termine della procedura appaiono tutti i gel messi a confronto e il master gel normalizzato (che può essere assegnato manualmente oppure automaticamente dal software); il master gel è il migliore in termini di quantità e risoluzione degli spot;

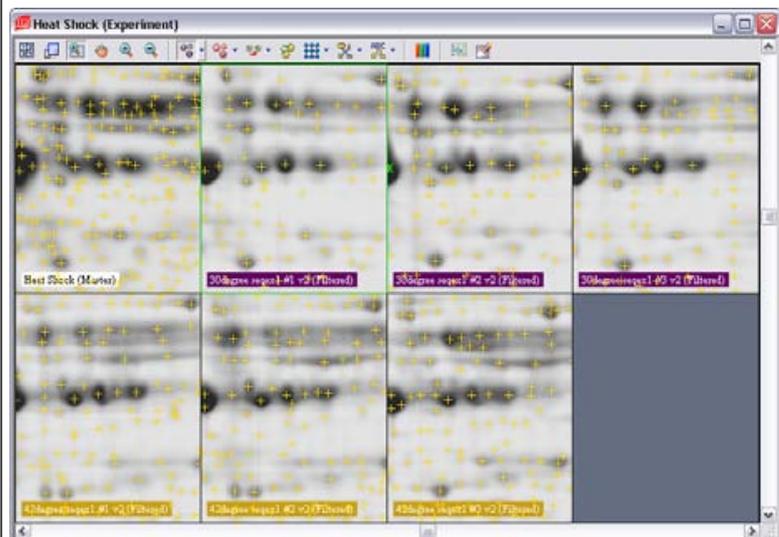
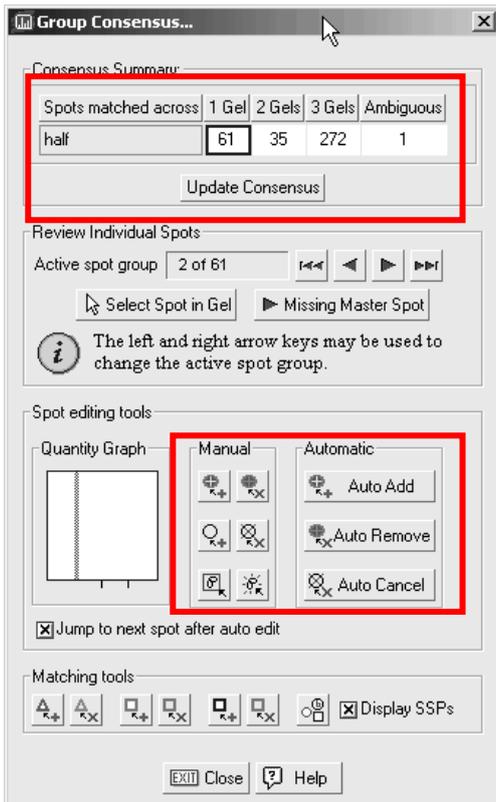


**Pannello riassuntivo dei gruppi a confronto e del master gel normalizzato**

8. attribuzione/eliminazione manuale degli spot: in questa fase l'operatore deve valutare ogni spot.

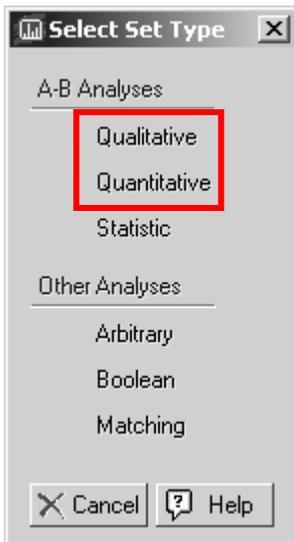
E' possibile procedere manualmente:

- all'eliminazione dei falsi spot
- all'aggiunta di nuovi spot che il software non aveva individuato
- alla valutazione degli spot presenti in tutti o in una parte ristretta dei gel

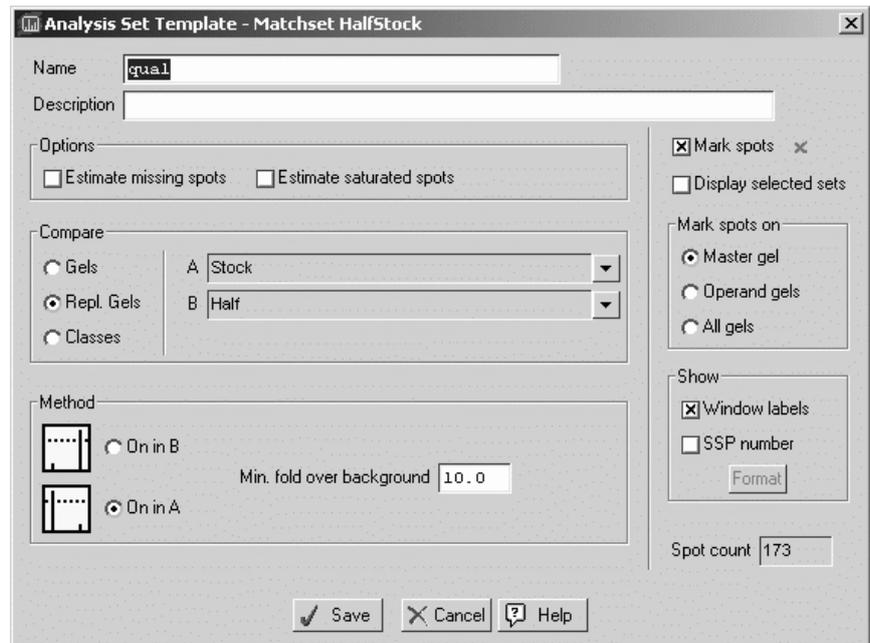


**Pannello di valutazione di ogni spot in cui è possibile aggiungere/togliere spot manualmente**

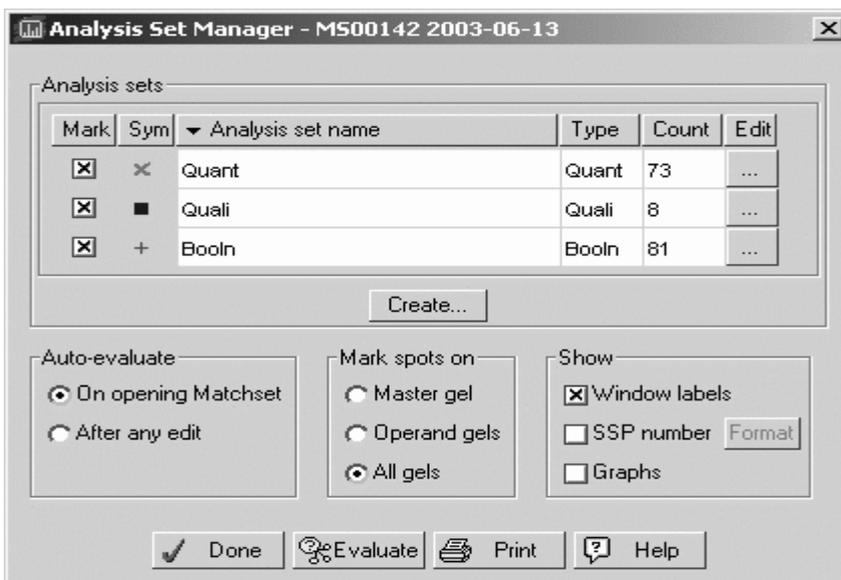
9. analisi delle variazioni quantitative o qualitative degli spot di un gruppo rispetto a quello di controllo; le variazioni possono essere evidenziate con simboli direttamente sulle mappe;



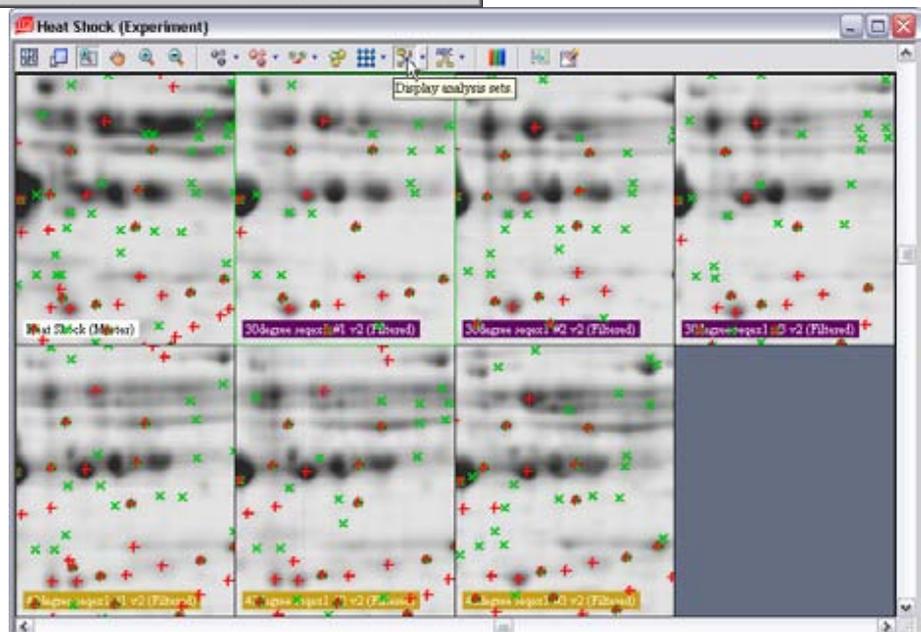
**Tipi di analisi più utilizzate**



**Esempio di analisi della variazione qualitativa del gel B rispetto al gel A preso come controllo**



**Pannello riassuntivo delle variazioni registrate per tipo di analisi impostata e visualizzazione delle variazioni direttamente sui gel**

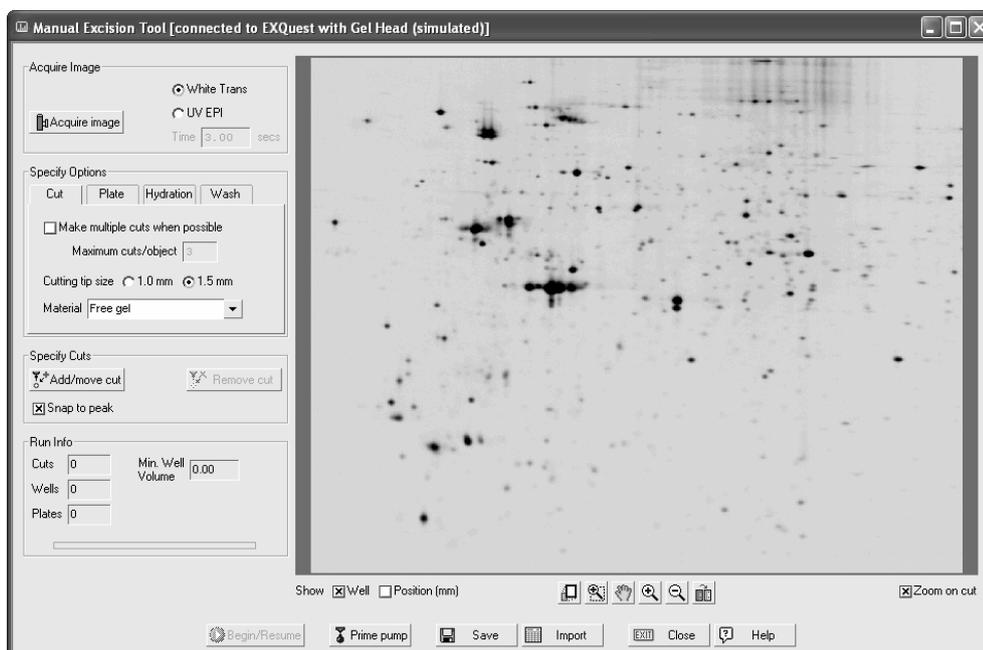


## Carotaggio dello spot

Questo processo è indispensabile per il prelievo degli spot di interesse dal gel e il successivo invio alla spettrometria di massa per l'identificazione della struttura amminoacidica e della quantità.

## Procedimento

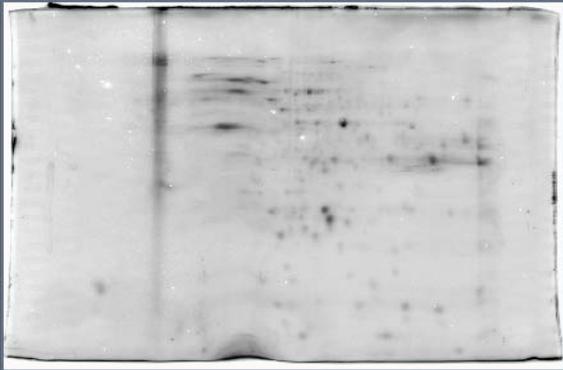
1. posizionare il gel da cui verranno prelevati gli spot sul piatto dello Spot Cutter (BioRad) e immobilizzarlo con le guide;
2. avviare il software (PD Quest) e visualizzare il pannello dell'excisione manuale (figura);
3. acquisire l'immagine del gel;
4. in "specify options" indicare:
  - se si desidera operare tagli multipli per spot di grandi dimensioni
  - il diametro della sonda di taglio che verrà impiegata
  - il materiale su cui verrà carotato lo spot
  - che tipo di piastra che verrà utilizzata per la raccolta dello spot
  - la porzione del gel che si vuole mantenere idratata
  - il volume di lavaggio (con acqua) della sonda dopo ogni taglio
5. indicare gli spot da carotare;
6. iniziare la procedura di taglio: la sonda preleverà lo spot indicato (o gruppi di spot per tagli multipli) e lo introdurrà in un pozzetto specifico della piastra di raccolta;
7. al termine del processo gli spot estratti verranno decolorati e inviati al massista per l'analisi alla spettrofotometria di massa.



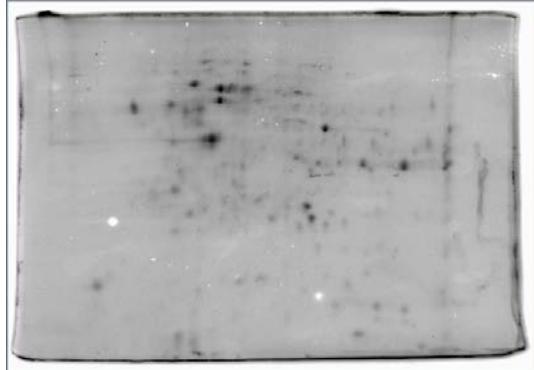
**Pannello di controllo con cui si gestisce interamente lo Spot Cutter**

# Risultati GRUPPO A (gel 1,2,3,5)

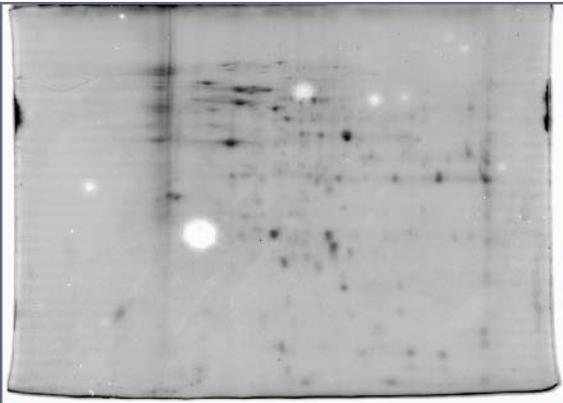
Gel 1



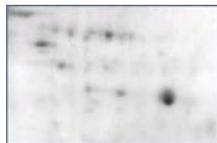
Gel 2



Gel 3



Gel 5



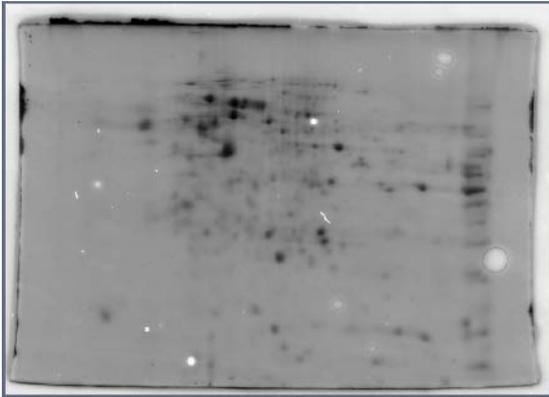
Gruppo A (Experiment, Modified)

Analysis Set Manager - Gruppo A

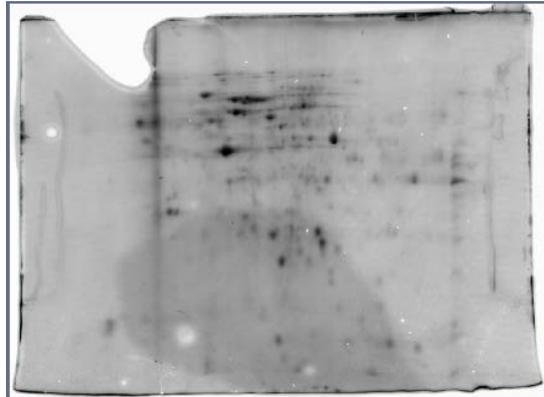
Mark	Sym	Analysis set name	Type	Count	Edit
<input checked="" type="checkbox"/>	●	Quali	Quali	2	...
<input checked="" type="checkbox"/>	□	Quant	Quant	4	...

# GRUPPO B (gel 6,7)

## Gel 6



## Gel 7



PDQuest Basic - 8.0.1

File Edit View Analyze Report Window Help

EXP00007 2010-05-20 (Experiment, Modified)

Draw spot offset from spot in Master. **BIO-RAD**

**Analysis Set Manager - EXP00007 2010-05-20**

Mark	Sym	Analysis set name	Type	Count
<input checked="" type="checkbox"/>	□	Quant 1 vs 2	Quant	10
<input checked="" type="checkbox"/>	●	Quali	Quali	4

Auto-evaluate:  On opening Experiment  Master gel

Mark spots on:  Master gel

Show:  Window labels