
ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
SECONDA FACOLTA' DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

MISURE DI SEGNALI FLUORESCENTI PER L'ANALISI IN MICROSCOPIA
DELL'ESPRESSIONE GENICA IN BIOLOGIA SINTETICA

Tesi in
BIOCHIMICA L-M

Relatore
Prof. Emanuele Domenico Giordano

Presentata da
Andrea Giorni

Co-relatori
Prof. Alessandro Bevilacqua
Ing. Alessandro Gherardi
Ing. Filippo Piccinini
Dott.ssa Francesca Ceroni

Sessione III

Anno Accademico 2010/2011

Indice

Introduzione

1	Biologia sintetica e DNA ricombinante	1
1.1	La biologia sintetica	2
1.2	Il DNA ricombinante	2
1.2.1	Estrazione di sequenze nucleotidiche	4
1.2.2	Assemblaggio e inserimento nel vettore di clonazione	5
1.2.3	Trasformazione e clonazione del DNA ricombinante	7
1.3	Elettroforesi su gel	10
1.4	Biobrick e Standard Assembly	12
2	Fluorescenza	15
2.1	Fenomeno fisico	15
2.2	Lo stokes shift	16
2.3	Quenching e photobleaching	18
2.4	Principali parametri utilizzati	20
2.5	Green Fluorescent Protein	21
2.6	Applicazioni della GFP	25
3	Misure di fluorescenza: spettrofluorimetria e microscopia ottica in fluorescenza	27
3.1	Spettrofluorimetria	27

3.2 Tecan Infinite® M200	30
3.3 Misure spettrofluorimetriche	33
3.4 Microscopia ottica in fluorescenza	34
3.5 Strategia di funzionamento	35
3.6 Filtri per fluorescenza	36
3.7 Spettrofluorimetria Vs Epifluorescenza	37
4 Protocolli e set-up sperimentale	41
4.1 Set-up sperimentale	41
4.1.1 Microscopio	41
4.1.2 Sistema di illuminazione	43
4.1.3 Fotocamera	45
4.1.4 Software di controllo	45
4.1.5 Software di acquisizione	47
4.1.6 Calibrazione del sistema	48
4.2 Preparazione dei campioni	49
5 Attività di laboratorio	54
5.1 Obiettivi	54
5.1.1 Curva di risposta	55
5.1.2 Rumore	56
5.1.3 Photobleaching	56
5.2 Materiale biologico utilizzato e preparazione dei campioni	56
5.3 Protocollo di acquisizione	58
5.4 Discussione e risultati	62
5.4.1 Specifiche del data-set	62
5.4.2 Caratterizzazione della funzione di risposta	63
5.4.3 Caratterizzazione del rumore	65

5.4.4 Caratterizzazione del photobleaching e riattivazione	66
5.4.5 Le sequenze 4c	68
5.5 Conclusioni e sviluppi futuri	68
Appendice	
Bibliografia	

Introduzione

Questa tesi si inserisce in un progetto di collaborazione tra il laboratorio di ingegneria molecolare e cellulare (ICM) “Silvio Cavalcanti” e il Computer Vision Group (CVG), diretto dal prof. Alessando Bevilacqua. L’obiettivo di questa collaborazione è la messa a punto di un sistema di misura di segnali di fluorescenza tramite elaborazione di immagini da microscopia ottica in epifluorescenza per applicazioni in biologia sintetica. Infatti, l’informazione morfologica del campione permessa dalla microscopia, accoppiata a misure della fluorescenza emessa, consente di ottenere importanti informazioni aggiuntive rispetto a una classica misura di popolazione in spettro fluorimetria, per esempio l’indagine della fluorescenza in singola cellula, il calcolo di numerosi parametri statistici del segnale fluorescente nella popolazione e l’informazione morfologica del campione. Il laboratorio ICM ha già a disposizione una postazione completa per l’acquisizione di immagini digitali qualitative da microscopia in epifluorescenza. L’obiettivo è quello di permettere a tale sistema di fornire misure quantitative. A tale scopo risulta indispensabile avere a disposizione un software per l’elaborazione delle immagini, che il CVG sta sviluppando, che permetta di ricavare l’informazione desiderata tramite algoritmi di riconoscimento automatico, segmentazione ed eliminazione del rumore. Non essendo l’attuale set-up per le acquisizioni in microscopia un sistema concepito per fare misure quantitative, per lo sviluppo di un software dedicato risulta indispensabile ottimizzare e caratterizzare al meglio la catena di misura. A tale scopo gli obiettivi che per ora la collaborazione si è preposta nello specifico sono:

- Caratterizzare la funzione di risposta della fotocamera per le acquisizioni.
- Caratterizzare il rumore di fondo del set-up
- Valutare la realizzabilità e la robustezza della misura caratterizzando l’influenza che le nuove condizioni di osservazione hanno sul fenomeno fluorescente del campione biologico.

La funzione di risposta della fotocamera è la relazione che intercorre tra il livello di impressione dei pixel, letto dal sistema di misura, e l'informazione della radianza della scena osservata. Per poter condurre misure di radianza di un campione con questo sistema è dunque necessario la conoscenza di tale funzione, che in genere non è lineare. La caratterizzazione del rumore di fondo risulta indispensabile per la sua eliminazione all'atto dell'elaborazione numerica. Lo studio delle condizioni del campione risulta utile al fine di quantificare, per quanto possibile, l'influenza delle condizioni di osservazione sulla misura. Il fenomeno studiato in questo contesto è il photobleaching. Questo fenomeno, che nei capitoli a seguire verrà meglio descritto, altera direttamente il fenomeno fluorescente ed ha origine dalla modificazione chimica che le sostanze fluorescenti subiscono quando vengono illuminate. Risulta quindi indispensabile mettere in luce l'entità di questo fenomeno che le condizioni di osservazione inducono nel campione. Questo con il proposito anche di eliminarne l'influenza sulla misura, quando non trascurabile, tramite algoritmi di elaborazione di immagini. Questi tre problemi sono stati affrontati in questo lavoro tramite elaborazioni e misure fatte su immagini di batteri trasformati con circuiti genetici per conferire loro le caratteristiche di fluorescenza di interesse. L'obiettivo e il frutto del mio lavoro di tesi svolto nel laboratorio ICM è stato quello di preparare il materiale biologico con caratteristiche favorevoli agli scopi menzionati, quello di testare le funzionalità del set-up sperimentale per le acquisizioni e di partecipare attivamente al delineamento dei protocolli di acquisizione.

Capitolo 1

Biologia sintetica e DNA ricombinante

1.1 La biologia sintetica.

La biologia sintetica è una nuova area di ricerca sviluppatasi negli ultimi due decenni, essa può essere vista come il prodotto dell'integrazione tra ingegneria e biologia molecolare. Questa disciplina utilizza parti biologiche naturali, le isola, le caratterizza funzionalmente e le usa come "componenti" modulari per la sintesi di sistemi biologici nuovi. Sintesi volta sia allo scopo di creare nuovi sistemi con funzionalità utili, sia allo studio di processi biochimici su scala molecolare e cellulare come espressione genica e sua regolazione trascrizionale e post-trascrizionale. In biologia sintetica avviene quindi lo studio e la manipolazione di materiale biologico proprie della biologia molecolare unite a tecniche proprie dell'ingegneria, come la standardizzazione dei set up sperimentali, la caratterizzazione delle parti biologiche utilizzate e la creazione di librerie di componenti modulari, lo studio e la messa a punto di modelli matematici predittivi su scala molecolare e cellulare.

Nel 1974 il genetista polacco Waclaw Szybalski introdusse il termine "biologia sintetica" scrivendo [2]:

"Discutiamo ora del seguente problema, ovvero che c'è di nuovo? Fino ad ora abbiamo lavorato sulla fase descrittiva della biologia molecolare. Ma la vera sfida partirà quando entreremo nella fase della sintesi biologica. Potremo elaborare nuovi elementi di controllo e aggiungere questi nuovi moduli ai genomi esistenti o costruire interamente nuovi genomi. Questo dovrebbe essere un campo con un potenziale di espansione

illimitato e quasi nessuna limitazione alla costruzione di nuovi circuiti di controllo e [. . .], alla lunga, di organismi sintetici, come un nuovo topo migliore. Io non credo che esauriremo idee nuove ed eccitanti [. . .] nella biologia sintetica.”[1]

In questo contesto la cellula viene vista come un elaboratore organico in grado di esprimere e attuare *tasks* codificati in materiale genetico esogeno, progettato e realizzato dai biologi sintetici anche grazie a modelli predittivi, e poi inserito all'interno della cellula. Il DNA quindi rappresenta il substrato che realizza la memoria fisica dove vengono codificati “software” genetici, che l’“hardware” cellulare esegue. Il tutto realizzato con un approccio di tipo bottom-up volto all’astrazione dell’osservazione funzionale dei componenti in gioco, e alla progettazione di sistemi come assemblaggio di componenti complesse; approccio da sempre proprio all’ingegneria. La fiducia riposta nelle tecniche di biologia sintetica e la sua espansione negli ultimi due decenni sono giustificabili nei grandi progressi delle tecniche di manipolazione del DNA acquisiti. Dagli inizi degli anni '70 infatti la molecola di DNA era ancora molto difficile da manipolare a causa della sua lunghezza e della sua carica, quindi la sintesi di parti biologiche presentava molte difficoltà e alti costi. Negli ultimi vent’anni i progressi in quest’ambito sono stati impressionanti, con un balzo di produttività anche di 5 ordini di grandezza e costi in forte calo [3]. Oggi è possibile isolare determinati tratti di DNA da genomi, riprodurre un numero praticamente illimitato di copie, sequenziarlo (cioè leggere tutta la sequenza di basi azotate), comporre catene di DNA da sequenze provenienti da diversi organismi e inserirle in cellule ospiti conferendogli nuove caratteristiche.

1.2 Il DNA ricombinante.

Con il termine *DNA ricombinante* ci si riferisce ad una sequenza di DNA non presente in natura, ma assemblata sinteticamente da diverse sequenze provenienti da diversi organismi o comunque da diversi geni. Si usa anche definire *proteina ricombinante* ogni proteina prodotta trascrivendo e traducendo DNA ricombinante. Tutte le tecniche messe

in atto per produrre tale materiale vengono dette *tecniche del DNA ricombinante*. L'avvenimento che ha dato vita alla nascita della tecnica del DNA ricombinante è stata la scoperta degli enzimi di restrizione, per la quale Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith nel 1978 ricevettero il premio Nobel per la medicina. Gli enzimi di restrizione sono proteine in grado di riconoscere in modo molto specifico delle sequenze, chiamate *siti di restrizione*, all'interno di molecole di DNA e tagliare il doppio filamento in corrispondenza di queste sequenze. La scoperta di tali enzimi avvenne grazie ad una osservazione sperimentale, si notò infatti che introducendo in batteri *E. coli* DNA di un ceppo diverso questo veniva frammentato in piccoli segmenti, la

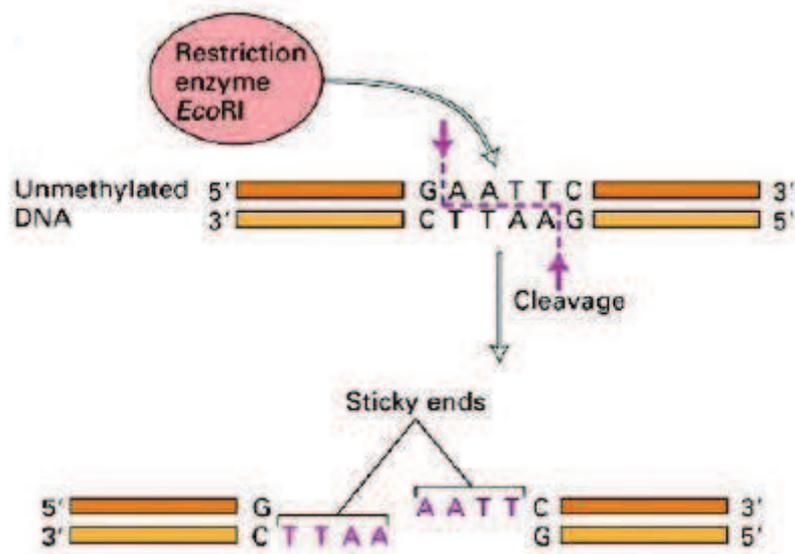


Figura 1: Sito di restrizione e sequenza di taglio di EcoRI

stessa cosa avveniva se veniva introdotto DNA virale, il risultato era che il materiale genetico introdotto nel batterio veniva inattivato. Si affermò in seguito che tale processo avvenisse ad opera di alcuni enzimi prodotti dal batterio e furono chiamati enzimi di restrizione. Tali enzimi furono considerati, e lo sono ancora oggi, una forma di sistema immunitario del batterio, il quale, si è scoperto, che protegge il proprio materiale genetico modificandolo chimicamente in corrispondenza dei siti di restrizione non rendendolo riconoscibile ai propri enzimi di restrizione. Fino ad ora sono stati

individuati e purificati più di mille enzimi di restrizione, provenienti da batteri diversi ed ognuno caratterizzato dalla propria sequenza di taglio. In Figura 1 è illustrato il sito di restrizione dell'enzima di restrizione EcoRI (isolato da E.coli RY13) GAATTC e il punto dove tale enzima taglia il doppio filamento. Il genere di enzimi di restrizione utilizzati per produrre DNA ricombinante tagliano il doppio filamento in modo che il materiale tagliato presenti delle estremità adesive a singolo filamento chiamate *sticky ends*, come è visibile in (figura 1). Siccome ogni enzima di restrizione taglia sempre il filamento in corrispondenza del proprio sito di restrizione le sticky ends di ogni filamento tagliato con lo stesso enzima risulteranno complementari. La disponibilità di un così grande numero di enzimi di restrizione può permettere di frammentare un intero genoma creando una vera e propria libreria di sequenze, chiamate *frammenti di restrizione*, ognuna con sticky ends note.

La produzione di DNA ricombinante può essere suddivisa nelle seguenti fasi:

1. Estrazione di sequenze di interesse da genoma o selezione di frammenti di restrizione da libreria.
2. Assemblaggio dei frammenti di restrizione e inserimento del programma genetico nel vettore di clonazione
3. Inserimento del programma genetico legato al vettore di clonazione nella cellula ospite e amplificazione del DNA ricombinante attraverso la duplicazione cellulare.

1.2.1 Estrazione di sequenze nucleotidiche

Il processo di estrazione del materiale genetico di interesse viene fatto in vitro tramite l'azione degli enzimi di restrizione. La conoscenza della sequenza dalla quale si vuole estrarre il frammento permette di individuare il sito o i siti di taglio e quindi scegliere gli enzimi di restrizione adatti. I frammenti prodotti sono separabili e purificabili attraverso tecniche di laboratorio che discriminano le molecole di DNA per peso molecolare, come l'elettroforesi su gel.

1.2.2 Assemblaggio e inserimento nel vettore di clonazione

Come detto, frammenti di restrizione tagliati con lo stesso enzima presentano le terminazioni a singolo filamento complementari, questo permette di ligare sequenze che siano state tagliate dallo stesso enzima a prescindere dalla provenienza del materiale genetico. La reazione di ligazione viene fatta avvenire in vitro utilizzando un altro

enzima chiamato DNA-ligasi. La DNA-ligasi è l'enzima che in vivo catalizza la formazione dei legami fosfodiesterici tra i segmenti di DNA durante la replicazione. Per creare DNA ricombinante vengono aggiunte DNA-ligasi e ATP ad una soluzione contenente frammenti di restrizione con estremità adesive. A temperatura ambiente le estremità complementari a singolo filamento dei frammenti di restrizione formano temporaneamente legami a idrogeno creando molecole chimeriche, la DNA-ligasi in presenza di ATP è in grado di catalizzare la formazione di un legame fosfodiesterico in direzione 3' → 5' tra il gruppo ossidrilico in posizione 3' di un frammento e il gruppo fosfato al 5' del frammento contiguo. Tramite l'utilizzo di enzimi di restrizione e ligazione, attraverso reazioni successive, è possibile così creare programmi genetici assemblando sequenze di DNA. Allo stesso modo tale programma genetico viene inserito in un vettore di clonazione che verrà amplificato da una cellula ospite. Il vettore di clonazione più usato in biologia sintetica è il plasmide. Il plasmide è una molecola di DNA circolare non genomica naturalmente presente nei batteri, lieviti e in alcune cellule eucariotiche che convive con la cellula ospite in forma parassitica o simbiotica, queste molecole hanno dimensioni che variano da poche migliaia di basi a oltre 100 kilobasi. Le molecole plasmidiche hanno la capacità di auto replicarsi

all'interno della cellula ospite utilizzando il suo apparato proteico anche indipendentemente dalla duplicazione cellulare. Le molecole plasmidiche hanno ridotte dimensioni, che facilitano il loro inserimento nelle cellule e presentano al loro interno siti di restrizione. Per queste caratteristiche i plasmidi sono stati scelti come vettori di clonaggio in biologia sintetica. Per queste tecniche non vengono usati plasmidi naturali ma sequenze ingegnerizzate che meglio si prestano a tutti i processi coinvolti in quest'area di ricerca. La struttura classica di un plasmide usato come vettore di clonazione, Figura 2, è composta da:

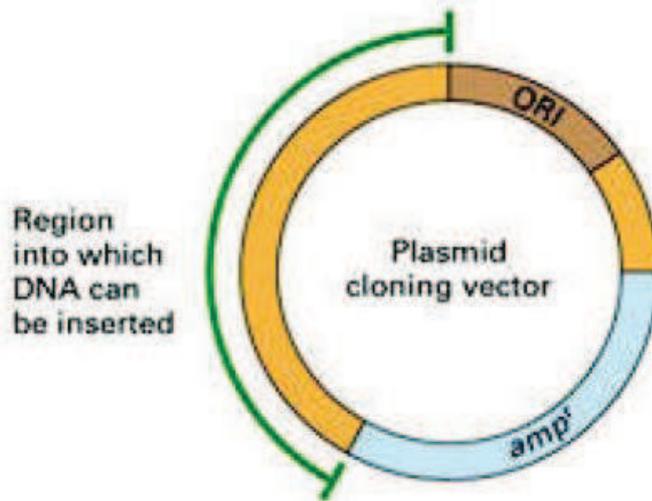


Figura 2: Schema di plasmide per clonaggio.

- Una sequenza detta origine di replicazione (ORI)
- Una sequenza dove è codificata la resistenza ad un determinato antibiotico
- Un sito di clonaggio dove viene inserito il programma genetico o il DNA da amplificare.

L'origine di replicazione, che è presente in tutti i plasmidi, sia quelli naturali che quelli ingegnerizzati per clonaggio, è una sequenza che viene riconosciuta dalla cellula ed è dove si attaccano i complessi proteici che danno inizio alla replicazione. Replicazione che una volta partita procede qualsiasi siano le sequenze che seguono la ORI, così che ogni frammento inserito nel plasmide viene replicato con questo. La ORI determina in parte anche le caratteristiche di *copy number* del plasmide, cioè il numero medio di copie presenti nella cellula ospite, determinando quindi l'efficienza con cui si replica. Il *copy number* è un parametro molto importante nel progetto di un programma genetico. Tipici valori di *copy number* vanno dalle poche unità al migliaio.

Di fondamentale importanza nel processo di clonazione è la sequenza dov'è codificato il corredo proteico per la resistenza ad un antibiotico, questa serve da strumento di selezione delle cellule per le quali l'inclusione del plasmide ha avuto successo. Coltivando infatti le cellule in presenza di nutrienti e antibiotico, solo quelle che

avranno internalizzato il plasmide sopravvivranno e daranno origine a colonie di cellule con il plasmide.

Nella sequenza di clonaggio invece sono presenti alcuni siti di restrizione che permettono l'inserimento del programma genetico.

1.2.3 Trasformazione e clonazione del DNA ricombinante

Per trasformazione si intende inserimento nel citoplasma di cellule batteriche di materiale genetico. In natura pochi ceppi di batteri sono spontaneamente permeabili al DNA, quindi per i batteri utilizzati in laboratorio per la clonazione sono necessari dei trattamenti che li rendano permeabili al plasmide, un batterio con queste caratteristiche viene detto *competente*. Una tecnica molto usata per rendere cellule batteriche competenti è esporle ad alte concentrazioni di cationi bivalenti, ad esempio per E.coli viene usato CaCl₂. Le tecniche di trasformazione vera e propria sono diverse, una tipico esempio è lo shock termico. In questa procedura vengono creati dei pori sulla parete

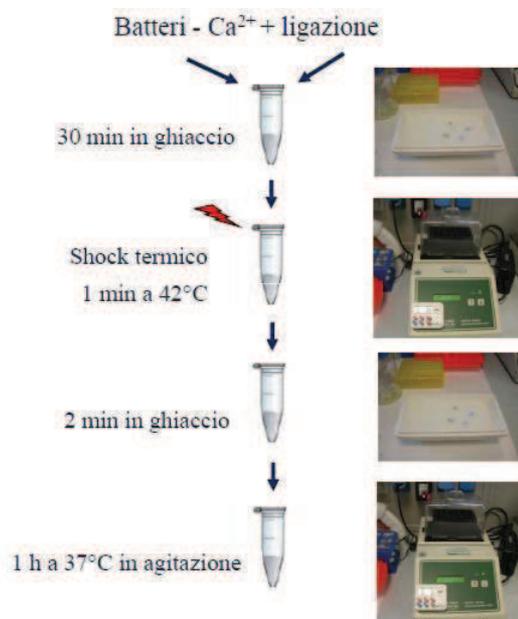


Figura 3: Protocollo di trasformazione per shock termico

cellulare di batteri competenti attraverso uno sbalzo termico. In Figura 3 riporto un esempio di protocollo di trasformazione per shock termico per E.coli: una soluzione di batteri in un buffer contenente calcio e la ligazione di DNA vengono messi prima 30 minuti in ghiaccio, poi 1 minuto a 42° nel termo mixer dove per shock termico avviene la porazione della parete cellulare e l'ingresso dei plasmidi nelle cellule, poi di nuovo due minuti in ghiaccio. In fine dopo lo shock termico viene aggiunto terreno di coltura senza antibiotico e la miscela viene messa in crescita a 37° in agitazione per un'ora. In questa fase le cellule per le quali la trasformazione ha avuto successo duplicano il plasmide e traducono il corredo proteico per la resistenza all'antibiotico. Dopo questi

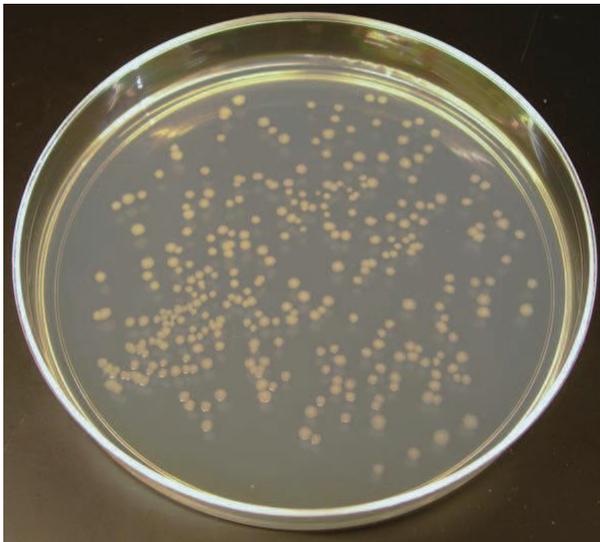


Figura 4: Colonie di E.coli trasformati.

passaggi inizia il vero e proprio clonaggio del DNA ricombinante. La soluzione di cellule trasformate viene messa in crescita in piastre con nutrienti e antibiotico, lo stesso antibiotico del quale è presente il gene di resistenza sul plasmide inserito nelle cellule. Questo permetterà la selezione delle cellule per le quali la trasformazione è effettivamente avvenuta con successo, infatti solo le cellule trasformate potranno sviluppare resistenza al farmaco, sopravvivere e dare vita duplicandosi a colonie di batteri farmaco-resistenti ognuno dei quali avrà al suo interno una copia identica del plasmide. In Figura 4 è visibile una piastra di Petri con delle colonie di E.coli.

Per l'amplificazione vera e propria del DNA si procede prelevando una colonia dalla piastra e inoculandola in terreno di coltura ed antibiotico, l'inoculo andrà fatto crescere in incubatore a 37° in agitazione O/N. La presenza di antibiotico anche in questa fase è indispensabile perché le cellule vanno sempre forzate con il farmaco per far sì che mantengano il plasmide contenente la resistenza, altrimenti lo espelleranno. Grazie alla

crescita O/N sarà possibile ottenere un gran numero di cellule contenenti plasmide, dalle quali si estrarrà il DNA amplificato. Per l'estrazione e la purificazione del materiale genetico prodotto sono disponibili in commercio kit di purificazione molto pratici ,

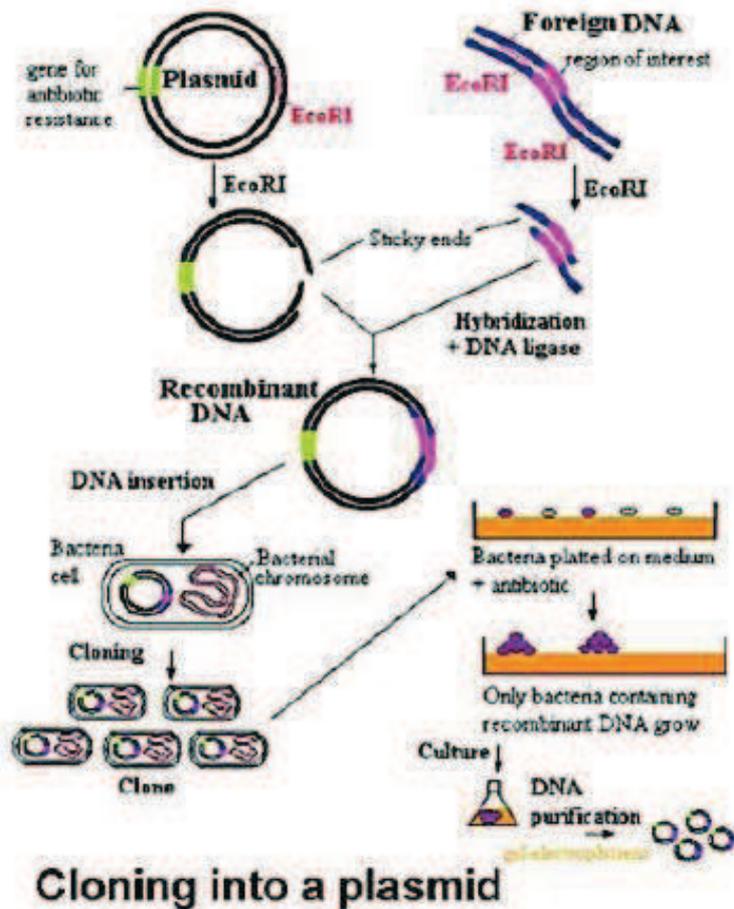


Figura 5: principali passaggi del clonaggio di DNA ricombinante.

veloci e relativamente economici. In Figura 5 sono illustrati i vari passaggi della clonazione di DNA ricombinante in plasmide.

1.3 Elettroforesi su gel

L'elettroforesi su gel rappresenta una tecnica fondamentale per poter manipolare materiale genetico e non in biologia sintetica. Si tratta di una procedura che ha lo scopo di separare molecole lineari come DNA e proteine denaturate in base al loro peso molecolare, e quindi alla loro lunghezza. Questa tecnica è capace di risoluzioni che arrivano alle poche paia di basi per in DNA, questo risultato ha permesso di sviluppare procedure di sequenziamento che si basano su questo metodo. L'elettroforesi risulta indispensabile quando è necessario separare dei frammenti di restrizione diversi in una soluzione, per esempio dopo una reazione di taglio del DNA. Infatti conoscendo la lunghezza di ogni frammento con questa tecnica è possibile isolarli. L'apparecchiatura

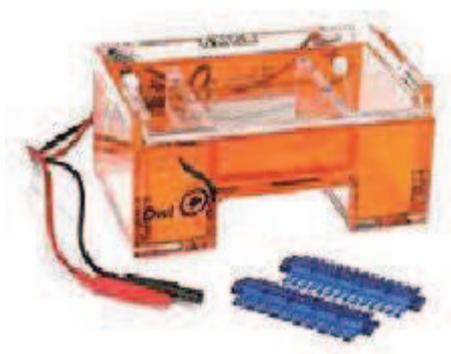


Figura 6: Cella per elettroforesi con elettrodi e pettini per ricavare i pozzetti nel gel.

per l'elettroforesi e composta da un generatore di tensione ed una cella elettroforetica. La cella, Figura 6, contiene in gel dove verranno fatte correre le molecole. Il generatore di tensione fornisce tensione alle estremità del gel nella cella. Le molecole di DNA e RNA per valori di Ph vicini alla neutralità presentano forte carica negativa dovuta ai gruppi fosfati presenti in ogni nucleotide, il risultato quindi dell'applicazione di un campo elettrico sarà la loro "corsa" verso il polo positivo della cella.

La proprietà che permette di discriminare molecole con diverso peso molecolare è la loro mobilità all'interno del gel, infatti molecole più lunghe avranno meno mobilità e

quindi si muoveranno più lentamente. Il gel utilizzato in questo genere di tecniche è generalmente composto da agarosio o poliacrilammide, a seconda del tipo e della concentrazione del gel è possibile realizzarlo con maglie più o meno fitte, a seconda della risoluzione in lunghezza che si desidera ottenere. Ad esempio se si vuole far correre piccole molecole sarà necessario usare gel più densi. Le molecole da discriminare vengono caricate in pozzetti ricavati nel gel nel lato a polarità negativa, quando viene applicata la differenza di potenziale le molecole inizieranno a migrare verso il polo positivo lungo il gel. Al termine della corsa le molecole dello stesso peso molecolare, e quindi stessa velocità di migrazione, saranno presenti in bande ben distinte. Per poter rendere visibile i campioni e quindi le bande, il gel viene preparato aggiungendo bromuro di etidio, un cromoforo sensibile agli UV. Questa molecola a geometria planare si intercala tra le coppie di basi del DNA, e in questa configurazione

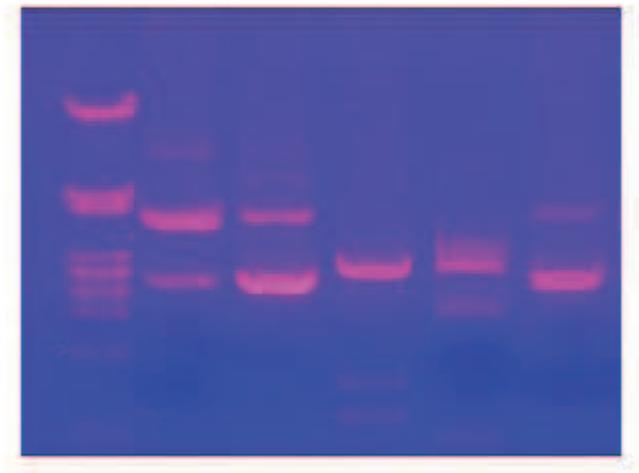


Figura 7: Bande di DNA marcate con etidio bromuro dopo una corsa elettroforetica.

la sua fluorescenza aumenta così da rendere visibili le bande di DNA quando sottoposte a radiazione UV. In Figura 7 si vede una foto di gel di agarosio dove è stato fatto correre DNA marcato con etidio bromuro.

1.4 Biobrick e standard assembly

I componenti modulari usati in biologia sintetica per l'assemblaggio di programmi genetici vengono anche detti *biobricks*. Esse sono sequenze di DNA con funzionalità note progettate per essere assemblate con le normali tecniche di ingegneria genetica. Ogni biobrick è contenuto in un plasmide, a valle e a monte della sequenza funzionale sono presenti dei siti di restrizione, uguali per tutti i biobricks, Figura 8.

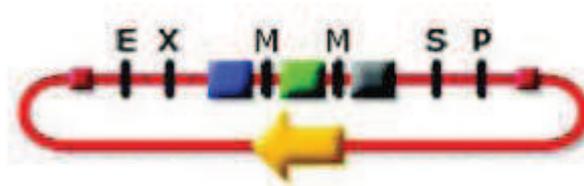


Figura 8: Schema di un biobrick

I siti di restrizione sono, da sinistra verso destra: EcoRI, XbaI, SpeI, PstI.

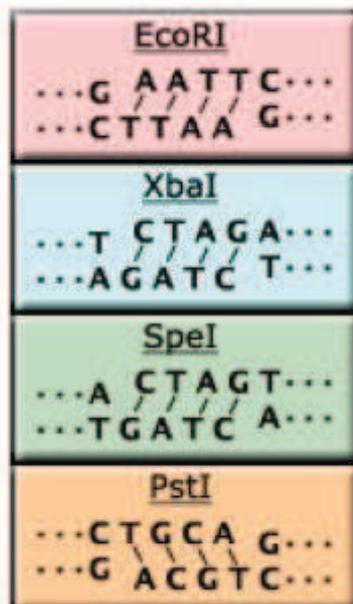


Figura 9: Siti di restrizione e taglio nel plasmide per biobrick.

In figura sono illustrate le sequenze di riconoscimento e di taglio dei siti di restrizione di un plasmide per biobrick. E' importante notare che gli enzimi SpeI e XbaI riconoscono due sequenze diverse ma producono sticky ends identiche e quindi complementari. Perciò l'ibridazione di due filamenti tagliati con questi due enzimi produrrà una sequenza non più riconoscibile da nessuno dei quattro enzimi di restrizione Figura 10.

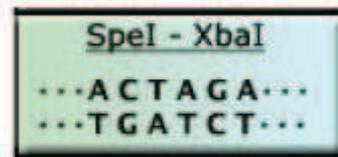


Figura 10: Sequenza ibrida

Queste caratteristiche dei siti di restrizione hanno portato alla definizione di un processo standardizzato di assemblaggio dei biobricks, grazie al quale è possibile assemblare due o più biobricks in un plasmide per ottenere un nuovo biobrick con gli stessi identici siti di restrizione. Ad esempio in Figura 11 sono illustrati i passaggi di assemblamento di due biobrick secondo lo standard chiamato *standard assembly 10*.

Si vuole unire i due biobricks (blu e verde) come in figura. A tale scopo lo standard prevede di tagliare il biobrick di sinistra in EcoRI e SpeI, quello di destra in EcoRI e XbaI. Ligando poi le sequenze di taglio di EcoRI si appieranno e andranno a formare un nuovo sito EcoRI mentre SpeI si ibriderà con XbaI andando a formare una sequenza non riconoscibile. Il risultato è quindi un nuovo biobrick.

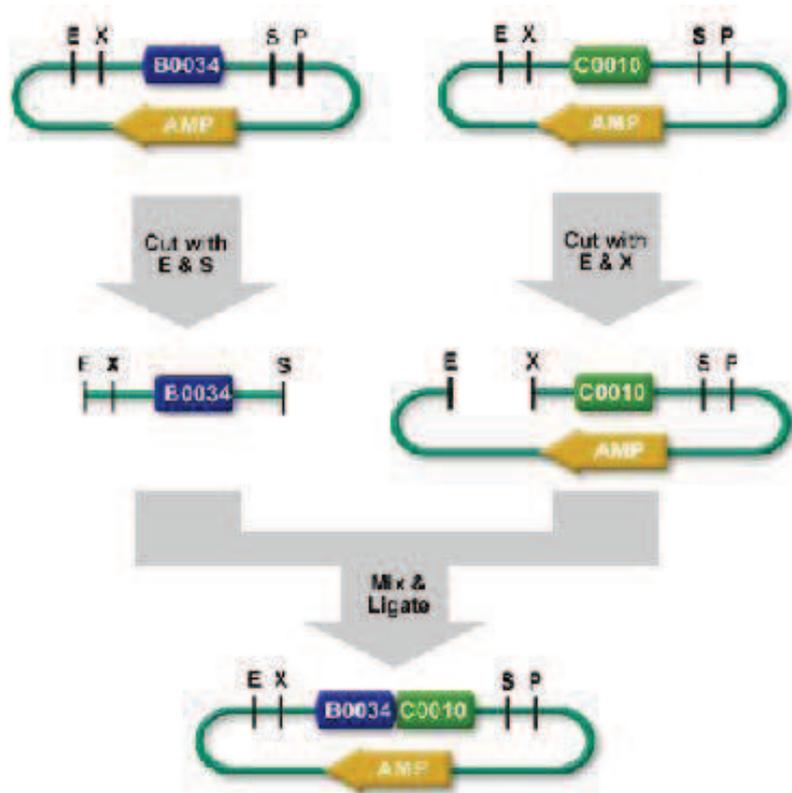


Figura 11: Esempio di standard Assembly 10

Dal 2003 presso il Massachusetts Institute of Technology vengono raccolte parti genetiche, tutte rispettanti lo standard biobrick, caratterizzate da datasheet. Quest'archivio, chiamato *registry of standard biological parts*, è *open source* e contiene ad oggi più di 5000 Biobricks.

Capitolo 2

Fluorescenza

2.1 Fenomeno fisico

Il fenomeno della fluorescenza è un caso particolare della fotoluminescenza. Si dice che un corpo è fotoluminescente quando, se colpito da radiazione elettromagnetica, emette un'altra radiazione elettromagnetica a diversa lunghezza d'onda, tipicamente maggiore. In particolare, se terminata l'eccitazione, l'emissione avviene e cessa entro tempi brevissimi, dell'ordine di 10^{-8} sec, si parla di fluorescenza. Se invece si verifica emissione anche dopo tempi più lunghi, anche dell'ordine dei minuti, si parla di fosforescenza.[1]

Il fenomeno fisico che sta alla base dei due fenomeni è lo stesso, ma nei materiali che manifestano comportamenti di fosforescenza la radiazione emessa da sistemi molecolari eccitati è in grado di eccitare a sua volta altre molecole, potendosi così innescare un fenomeno di fotoluminescenza di maggior durata, che si estingue comunque all'esaurirsi di tutta l'energia di eccitazione.

Il fenomeno della fluorescenza ha origine dalla perturbazione che una radiazione elettromagnetica esercita sullo stato energetico di un atomo del sistema molecolare fluorescente, detto anche *fluoroforo* o *fluorocromo*. [2] Allo stato energetico di un atomo contribuiscono il livello energetico associato agli orbitali dove sono presenti elettroni e le energie vibrazionale e rotazionale dei nuclei. Quando un atomo viene investito da energia elettromagnetica generalmente tutti e tre gli stati energetici vengono perturbati.

Il fenomeno della fluorescenza però può avvenire solo quando si ha *transizione*

elettronica, cioè quando l'energia di eccitazione causa un salto di un elettrone da un orbitale ad energia più bassa ad uno caratterizzato da energia più alta. A questo punto, con ottime probabilità, si assisterà in tempi brevissimi al ritorno (*decadimento*) dell'elettrone al livello energetico più basso, configurazione assai più probabile di quella eccitata. Se durante il decadimento parte dell'energia assorbita durante l'eccitazione viene emessa tramite radiazione elettromagnetica, si dice che l'atomo ha esibito fluorescenza. Si può avere transizione elettronica però solo quando l'energia associata ad un quanto di radiazione luminosa, detto *fotone*, è pari al *gap* energetico tra i livelli entro i quali è avvenuta la transizione. Essendo l'energia del fotone direttamente legata alla frequenza della radiazione tramite l'equazione di Plank:

$$E = h\nu$$

un determinato fluoroforo esibirà fluorescenza solo se irradiato entro una determinata banda di lunghezze d'onda detto *spettro di assorbimento*, in corrispondenza delle quali saranno più o meno probabili transizioni elettroniche. La banda di frequenza della radiazione emessa invece viene detta *spettro di emissione* del fluoroforo.

2.2 Lo stokes shift

Lo spettro di assorbimento e quello di emissione di un fluoroforo sono in generale diversi. Qualitativamente lo spettro di emissione presenta una forma simile a quello di assorbimento, ma risulta spostato a lunghezze d'onda maggiori. Questo fenomeno prende il nome di *stokes shift* e viene quantificato come la distanza tra le lunghezze d'onda in corrispondenza delle quali si osservano il massimo nello spettro di assorbimento e di emissione. L'entità di questo fenomeno dipende dalla struttura molecolare del fluoroforo e dalle caratteristiche dell'ambiente in cui questo viene osservato, può andare da alcuni a qualche centinaia di nanometri. In Figura è illustrato un esempio di andamento dello spettro di emissione e assorbimento del fluoroforo Alexa Fluor 555.[13]

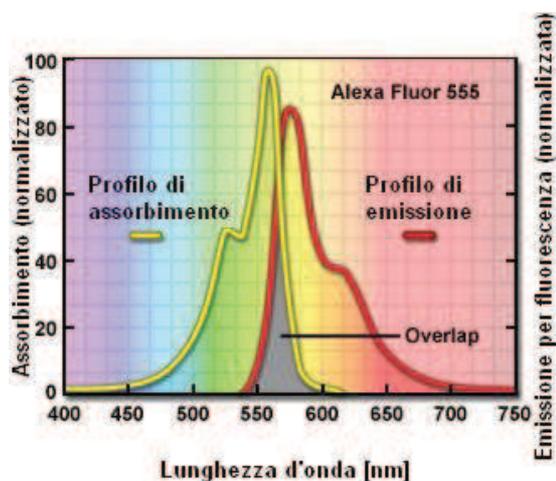


Figura 1: caratteristiche spettroscopiche del fluoroforo Alexa Fluor 555.

Lo *stokes shift* è manifestazione del fatto che con grande probabilità in una transizione elettronica, il cui decadimento risulti radiativo, l'energia associata al fotone emesso è minore di quella del fotone assorbito. Quindi la radiazione emessa, essendo meno energetica, avrà lunghezza d'onda maggiore; questo, macroscopicamente, determina uno "*shift*" dello spettro di emissione rispetto a quello di assorbimento. La differenza di energia tra le radiazioni assorbite ed emesse viene dissipata sotto forma di calore. Non tutta l'energia trasportata dal fotone viene impiegata per la transizione elettronica, infatti l'assorbimento causa anche un innalzamento dell'energia vibrazionale e rotazionale del nucleo che viene dissipata di solito prima che avvenga il decadimento elettronico. Inoltre il decadimento stesso dell'elettrone porta la molecola ad un sottolivello vibrazionale e rotazionale più energetico. La potenza emessa rispetto a quella assorbita sarà quindi minore e distribuita a lunghezze d'onda maggiori.

Nella pratica di osservazione della fluorescenza lo *stokes shift* viene sfruttato per separare la radiazione di eccitazione riflessa dal campione e quella di fluorescenza emessa, che generalmente è consistentemente più debole. Grazie invece a questa distanza tra gli spettri di emissione ed assorbimento è possibile, con sistemi di filtri ottici, separare queste due componenti portando il rapporto segnale rumore a valori che permettano l'osservazione e/o la quantificazione del segnale di fluorescenza.

2.3 Quenching e photobleaching

Questi due fenomeni comportano una complessiva riduzione del numero di fluorofori capaci di emettere fluorescenza all'interno di un campione e quindi una perdita di fluorescenza. Possono considerarsi in generale dei fenomeni indesiderati nelle misure di fluorescenza, di solito quindi si procede in modo da limitarne l'entità o, dove possibile, tenerne conto.

Con il termine *quenching* possono essere definiti come tutti quei fenomeni che causano una diminuzione dell'efficienza quantica di un sistema fluorescente. Con efficienza quantica si intende il rapporto tra i fotoni emessi per fluorescenza e quelli assorbiti, nell'unità di tempo. In particolare, i fenomeni di quenching sono quasi sempre reversibili e non si assiste al deterioramento del fluoroforo.

Si possono individuare due tipi di quenching:

- Il quenching statico ha origine quando la molecola contenente il fluoroforo, allo stato fondamentale, forma un complesso stabile non fluorescente con un'altra molecola, detta "*quencher*". Questo ha il risultato di diminuire la concentrazione di fluoroforo attivo.
- Il quenching collisionale consiste in un decadimento non radiativo di un fluoroforo eccitato a seguito di una collisione con un'altra molecola, il "*quencher*". L'energia scaturita dal decadimento viene dissipata sotto forma di calore. Questo fenomeno è favorito dalla temperatura, che è indice infatti dell'energia cinetica delle molecole.

Si fa riferimento al *photobleaching*, invece, quando si parla di “fotodistruzione” del fluoroforo, cioè quando si assiste ad un cambiamento della struttura molecolare a seguito dell’eccitazione luminosa, la quale nuova struttura non è più in grado di emettere fluorescenza. Questo fenomeno è quindi direttamente collegato all’intensità e alla durata dell’eccitazione del campione. Il photobleaching è causato dalla tendenza di alcune molecole fluorescenti a formare complessi molecolari non fluorescenti stabili con altre molecole, quando si trovano nella stato eccitato. Questa caratteristica risulta essere dipendente dalla struttura molecolare del fluoroforo e dall’ambiente in cui si

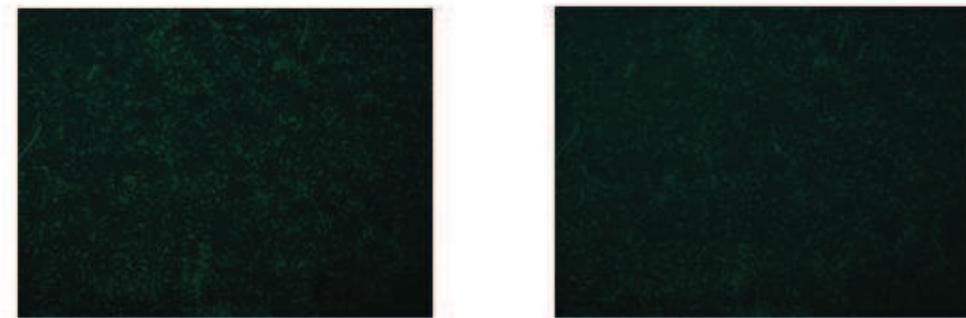


Figura2: E.coli in fluorescenza prima(sinistra) e dopo(destra) alcuni minuti di eccitazione. E' visibile la perdita di fluorescenza dovuta a photobleaching.

trova, può essere inoltre modulata da sostanze che variano la reattività del fluoroforo allo stato eccitato con altri composti. In Figura sono riportate due immagini relative ad una colonia batteri marcati con una proteina fluorescente di colore verde (GFP) , acquisite al microscopio in fluorescenza all’inizio e dopo 15 minuti di eccitazione. Si può notare un calo di fluorescenza dovuto a photobleaching nella foto di destra. Le caratteristiche di foto distruzione dei fluorofori possono però essere sfruttate in alcuni saggi. Uno di questi è la FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). La FRAP può essere applicata allo studio di caratteristiche diffusive di determinate molecole all’interno di *layer* fluidi come membrane biologiche. Questa tecnica prevede la marcatura con *marker* fluorescenti di molecole di interesse all’interno del *layer*: attraverso una forte sorgente di eccitazione si induce photobleaching in una determinata regione della membrana. Al termine della fotodistruzione, che deve avvenire con tempi

relativamente brevi rispetto a quelli coinvolti nelle dinamiche di diffusione, si interrompe l'eccitazione e si osserva in fluorescenza il recupero di emissione della zona foto distrutta. Queste dinamiche di recupero sono dirette conseguenze delle caratteristiche diffusive delle molecole marcate.

2.4 Principali parametri utilizzati

I principali parametri utilizzati per caratterizzare le prestazioni di un fluoroforo sono:

- Spettro di emissione
- Spettro di assorbimento
- Coefficiente di estinzione molare
- Resa quantica o Quantum Yield

Il coefficiente di estinzione molare di un fluoroforo viene calcolato misurando l'assorbanza di una soluzione 1 molare di tale fluoroforo ad una determinata lunghezza d'onda attraverso un cammino ottico unitario (generalmente misurato in centimetri). In genere la lunghezza d'onda scelta per la misura del coefficiente di estinzione molare è quella in corrispondenza del picco di assorbimento. Questo coefficiente è indice della capacità del fluoroforo di assorbire radiazione e quindi della probabilità di esibire fluorescenza. Viene indicato di solito con la lettera ϵ .

La resa quantica di un fluoroforo è definita come il rapporto tra i fotoni emessi e i fotoni assorbiti. Rappresenta quindi la probabilità che un fluoroforo allo stato eccitato emetta un fotone nel suo decadimento. Il valore della resa quantica spazia da 0 a 1 e dipende dalle particolari condizioni di lavoro del fluoroforo, come Φ , temperatura e concentrazione dello stesso.

2.5 Green Fluorescent Protein

La GFP è una proteina prodotta naturalmente dalla medusa *Aequorea victoria* [2] ed scoperta da Shimomura et.al [3] nel 1962, come proteina associata all'equorina, un'altra proteina chemiluminescente della *Aequorea victoria*. La GFP fu purificata e cristallizzata da Morise et. Al [4]. Il contributo cruciale per l'utilizzazione della GFP fu dato da Prasher et.al [5] con il clonaggio del gene. In fine, Chalfie et al [6] e Inouye & Tsuji [7] dimostrarono che l'espressione del gene della GFP produceva fluorescenza anche in altri organismi, concludendo che tale sequenza conteneva tutte le informazioni per la sintesi del cromoforo senza la necessità di enzimi specifici della medusa.

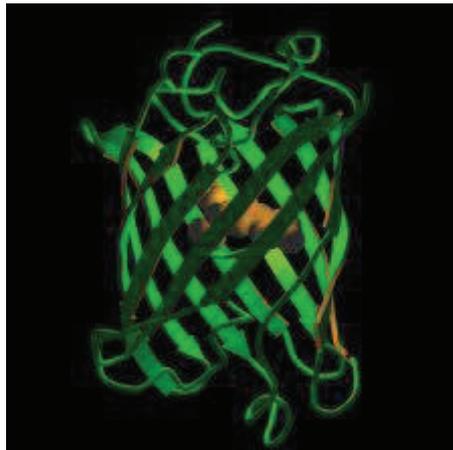


Figura3: struttura terziaria della GFP

La struttura terziaria della GFP è costituita da 11 foglietti beta disposti a formare un così detto barile- β Figura. Alla sua base e lungo il suo asse centrale sono presenti due α -eliche, quest'ultima contiene il fluoroforo. Questa particolare struttura consente al fluoroforo, contenuto all'interno del β -barile, di essere meno esposto a reagenti che potrebbero causarne la disattivazione, presentando quindi caratteristiche di quenching e photobleaching relativamente più blande. La GFP negli ultimi anni è diventata un marker molto utilizzato in biologia molecolare per le sue caratteristiche di stabilità, modeste dimensioni e per la possibilità che offre di modificarne entro certi limiti le proprietà spettroscopiche. Sono stati prodotti diversi tipi di GFP tramite mutazioni del

gene della GFP naturale, chiamata *wild type*. Le diverse mutazioni della GFP, oltre a presentare diverse caratteristiche spettroscopiche reagiscono in maniera diversa a differenti condizioni di lavoro, come ph e temperatura; fornendo così una più ampia scelta per le specifiche condizioni sperimentali. Le modificazioni nelle diverse mutazioni sono a carico del fluoroforo e possono essere suddivise in sette classi principali. In Tabella 1 riporto le caratteristiche spettrali di alcuni tipi di GFP raggruppate secondo le rispettive classi di appartenenza. I dati sopracitati sono stati presi dal riferimento bibliografico[8].

Classe	Nome	$\lambda_{Ass} (\epsilon)^a$	$\lambda_{Em} (QY)^b$
Class 1, Wild type	Wild type	395-397(25-30) 470-475(9.5-14)	504(0.79)
	Cycle 3	397(30) 475(6.5-8.5)	506(0.79)
Class 2, Phenolate anion	EGFP	488(55-57)	507- 509(0.60)
	Emerald	487(57.5)	509(0.68)
Class 3, neutral phenol	H9	399(20)	511(0.60)
	H9-40	399(29)	511(0.64)
Class 4, phenolate anion with stacked π -electron system (yellow fluorescet proteins)			
	10C Q69K	516(62)	529(0.71)
	10C	514(83.4)	527(0.61)
	Topaz	514(94.5)	527(0.60)
Class 5, indole in chromophore (cyan fluorescent proteins)			
	W7	434(23.9)	476(0.42)
	W1B	434(32.5)	476(0.4)
	ECFP	452	505
	W1C	435(21.2)	495(0.39)
Class 6, imidazole in chromophore (blue fluorescent proteins)			
	BFP	384(21)	448(0.24)
	P4-3	382(22.3)	446(0.3)
	EBPF	380-383(26.3-31)	440- 447(0.17- 0.26)

Tabella 1: caratteristiche spettroscopiche di alcuni tipi di GFP raggruppate per le rispettive classi di appartenenza.

- a. I valori di λ sono le lunghezze d'onda del picco di assorbimento in nm. I valori tra parentesi tonde sono i valori dei coefficienti di estinzione molare ϵ espressi in $[M^{-1}cm^{-1}10^3]$ relativi ai picchi a fianco. I Valori separati da trattino si riferiscono a valori stimati da diversi autori
- b. in simili condizioni sperimentali. I valori su righe diverse si riferiscono a diversi picchi di assorbimento. I valori di λ sono le lunghezze d'onda del picco di emissione in nm. I valori tra parentesi tonde sono i valori di resa quantica relativi ai picchi a fianco. I Valori separati da trattino si riferiscono a valori stimati da diversi autori in simili condizioni sperimentali. I valori su righe diverse si riferiscono a diversi picchi di assorbimento.

In Figura sono presenti diversi spettri di emissione ed assorbimento(emissione in linea tratteggiata) di sei tipi di GFP facenti riferimento alle sei principali classi di mutazioni.

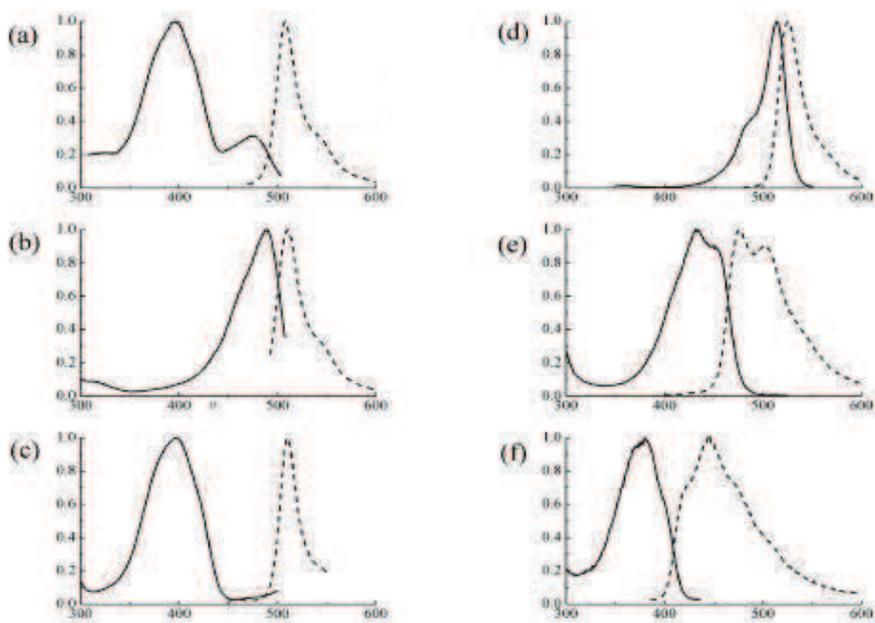


Figura4: spettri di emissione(in tratteggiato) e di assorbimento(in linea continua) normalizzati di alcune delle più comuni GFP relative alle sei principali classi di mutazione. a)Wild type b)Emerald, c)H9-40, d)Topaz, e)W1B, f)P4-3.

2.6 Applicazioni della GFP

Le potenzialità della GFP come marcatore biologico negli anni sono state sfruttate in numerose applicazioni. La GFP è stata utilizzata con successo principalmente come *tag* di fusione ad altre proteine. In questo genere di applicazioni il gene che codifica la GFP viene fuso al gene che codifica la proteina di interesse e il nuovo gene viene fatto esprimere in cellule procarioti o eucarioti. L'idea è quella di far produrre alla cellula una proteina che mantenga le stesse funzionalità di quella selvatica ma che esibisca fluorescenza. Lo scopo è quello di quantificare o anche localizzare la proteina "taggata" attraverso la rilevazione e quantificazione del segnale di fluorescenza. Moltissimi studi di espressione genica in eucarioti e procarioti sono stati condotti mediante osservazioni dinamiche dei segnali di fluorescenza delle proteine taggate. Allo stato dell'arte la GFP è stata fusa con successo a praticamente tutti i maggiori organelli cellulari, compreso la

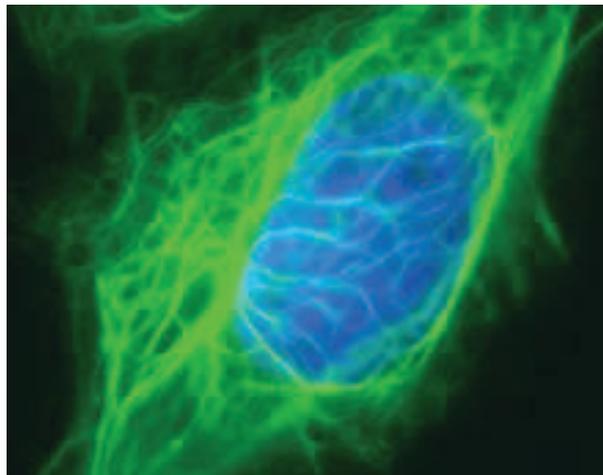


Figura 5: foto al microscopio in fluorescenza di citocheratine(in verde) marcate con GFP espresse da una cellula umana.

membrana plasmatica, il nucleo, il reticolo

endoplasmatico, l'apparato del Golgi, vescicole secretorie, mitocondri, perossisomi e vacuoli.[8] In Figura è possibile vedere un esempio di imaging cellulare al microscopio in fluorescenza, i filamenti in verde sono citocheratine taggate con GFP espresse da una cellula umana [9]. Inoltre sono state create alcune mutazioni di GFP che modulano la loro fluorescenza a seconda dell'ambiente in cui si trovano, che vengono utilizzate come indicatore attivo di determinati parametri dell'ambiente cellulare. Per esempio la sensibilità al Ph delle caratteristiche spettrometriche di alcuni tipi di GFP viene utilizzata per misurare tale parametro di organelli cellulari taggati. E' possibile anche ingegnerizzare la GFP in modo da creare dei siti di fosforilazione che possano modulare la fluorescenza. Grazie alla fusione di GFP con il canale potassio di Shaker è stato creato il primo sensore ottico di potenziale di membrana codificato geneticamente [10]. Nel quale sistema il potenziale di membrana causa una diminuzione di fluorescenza della GFP-tag. Un metodo molto diffuso per rendere biochimicamente sensibile un sistema fluorescente è il FRET, acronimo di: *Fluorescent Resonance energy Transfer*. IL FRET è un fenomeno quantomeccanico che si verifica quando due fluorofori si trovano sufficientemente vicini ($<100\text{\AA}$) e quando lo spettro di emissione di uno, il donatore, presenta una sovrapposizione in frequenza con lo spettro di emissione dell'altro, l'accettore. Eccitando, preferenzialmente, solo il donatore la fluorescenza da esso esibita ecciterà il fluoroforo accettore il quale emetterà fluorescenza a spese dell'emissione del donatore. In base a questo principio, ogni segnale biochimico che modifica la mutua distanza dei due fluorofori modifica l'entità del fenomeno FRET e quindi la fluorescenza emessa[11] [12].

Capitolo 3

Misure di fluorescenza: spettrofluorimetria e microscopia ottica in fluorescenza.

3.1 Spettrofluorimetria

Lo spettrofluorimetro è uno strumento che permette la determinazione sperimentale

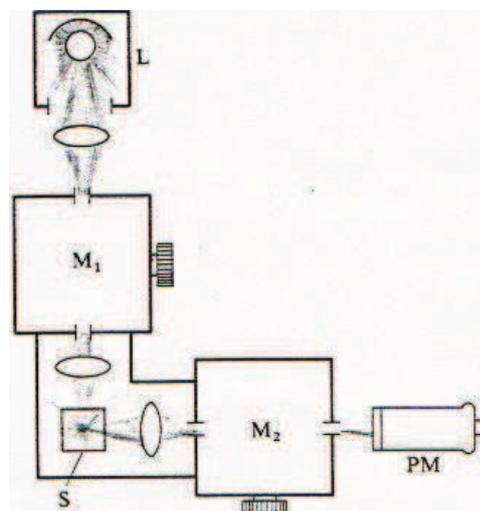


Figura 1: schema di uno spettrofluorimetro

dello spettro di fluorescenza di una sostanza emittente. Schematicamente la struttura funzionale di uno spettrofluorimetro può essere riassunta come in Figura. Lo spettrofluorimetro è costituito da una sorgente di radiazione elettromagnetica (L), da un primo monocromatore di selezione della lunghezza d'onda di eccitazione (in alcune soluzioni tecniche la selezione viene fatta attraverso filtri ottici) (M1), dall'alloggiamento del campione (S), da secondo monocromatore (M2) per selezionare una lunghezza d'onda dello spettro di emissione, e da un sistema di rilevazione e quantificazione della radiazione in uscita (PM). Il campione viene quindi eccitato da una sorgente di luce monocromatica, di lunghezza d'onda selezionata dall'operatore, il segnale di fluorescenza emesso dal campione viene elaborato dal monocromatore (o da un sistema di filtri ottici) di uscita che seleziona la banda e la lunghezza d'onda della luce che arriverà all'elemento fotosensibile del sistema, che la quantificherà. In questo modo viene ricostruito lo spettro di fluorescenza del campione esaminato. Molto frequentemente in questi apparecchi la lettura della luce emessa viene fatta con un angolo di 90° rispetto alla direzione di eccitazione, per far sì che la radiazione di eccitazione si sovrapponga il meno possibile al segnale di fluorescenza.

- Sorgenti di luce.

Gli spettrofluorimetri utilizzano sorgenti di luce molto forti per saturare tutti i fluorofori del campione così da ottenere emissione contemporanea da tutte le molecole fluorescenti. L'eccitazione viene fatta in genere con numerosi e brevissimi flash. Le sorgenti di luce più utilizzate negli spettrofluorimetri sono: laser, fotodiodi o lampade ai vapori di mercurio o ad arco xenon e deuterio.

- Selezionatore di lunghezze d'onda.

la selezione della lunghezza d'onda sia in eccitazione che in emissione nella spettrofluorimetria può essere ottenuto o con l'utilizzo di monocromatori o con sistemi di filtri ottici. Un monocromatore è un dispositivo che riceve in ingresso una sorgente luminosa con un certo spettro e trasmette in uscita solo la componente alla lunghezza d'onda selezionata, con una larghezza di banda ed un errore propri dell'architettura dello strumento. L'utilizzo di filtri ottici garantisce una selezione migliore della

lunghezza d'onda con lo svantaggio però della non modularità del sistema di selezione, rendendo necessario un set di filtri per ogni fluoroforo saggiato.

- Rilevatore di luce.

I principali rilevatori utilizzati in queste applicazioni sono: CCD, fotodiodi e fotomoltiplicatori. I CCD sono formati da una griglia di elementi fotosensibili a semiconduttore, capaci di accumulare carica elettrica proporzionale alla potenza della radiazione che li colpisce. Tramite un apposito sistema è possibile leggere la quantità di carica accumulata da ogni elemento sensibile. I fotodiodi sono giunzioni p-n a semiconduttore polarizzati in maniera che conducano una corrente proporzionale alla potenza della luce che li colpisce. I fotomoltiplicatori infine sono dispositivi di rilevamento di luce estremamente sensibili, riescono a rilevare anche un singolo fotone. Si basano sull'effetto fotoelettrico e sono costituiti da un tubo a vuoto entro il quale sono presenti: un fotocatodo rivestito di un materiale che favorisce l'effetto

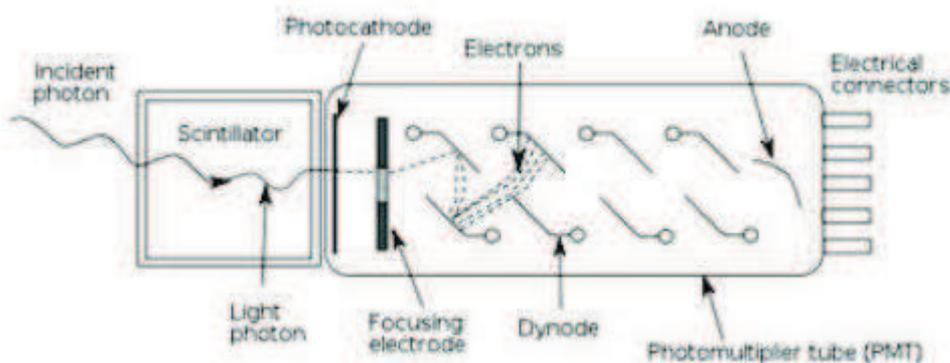


Figura2: schema di un fotomoltiplicatore

fotoelettrico, un anodo e degli elettrodi intermedi chiamati *dinodi*, Figura. I fotoni in arrivo colpiscono il fotocatodo generando emissione di elettroni che attraverso un elettrodo di focalizzazione vengono collimati verso il sistema di dinodi. La collisione degli elettroni con questi elettrodi genera emissione di un numero maggiore di elettroni a minore energia che vengono accelerati verso il dinodo successivo, fino al

raggiungimento dell'anodo. Questo fenomeno a cascata fa sì che un singolo fotone generi un flusso di moltissimi elettroni.

3.2 Tecan Infinite[®] M200

Nel laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare (ICM) della Seconda Facoltà di Cesena, lo strumento principalmente utilizzato per effettuare misure in fluorescenza è il lettore Tecan Infinite[®] M200. L'architettura di questo strumento è un po' diversa da quella descritta nel paragrafo precedente per gli spettrofluorimetri classici. Infatti esso



Figura3: piastre multi pozzetto per fluorimetro.

permette la lettura sequenziale automatizzata di più campioni, alloggiati in delle piastre multi pozzetto (Figura), tipicamente disposte a in matrici 8x12 di 96 pozzetti con volumi di lettura dai 100 μ L ai 200 μ L. All'operatore spetta la preparazione dei campioni e l'impostazione dei parametri di lettura. Questo tipo di architettura ovviamente non permette la lettura a 90°. Questo strumento permette anche letture di assorbanza dei campioni, strumento molto utile in misure di colture cellulari per valutare la densità cellulare in soluzione e quindi la fase di crescita della popolazione.



Figura4: il Tecan Infinite® M200

Il Tecan Infinite® 200M permette la lettura della fluorescenza in due modalità: *top reading* e *bottom reading*. In Figura e Figura è riportato lo schema dei sistemi per i due tipi di lettura.

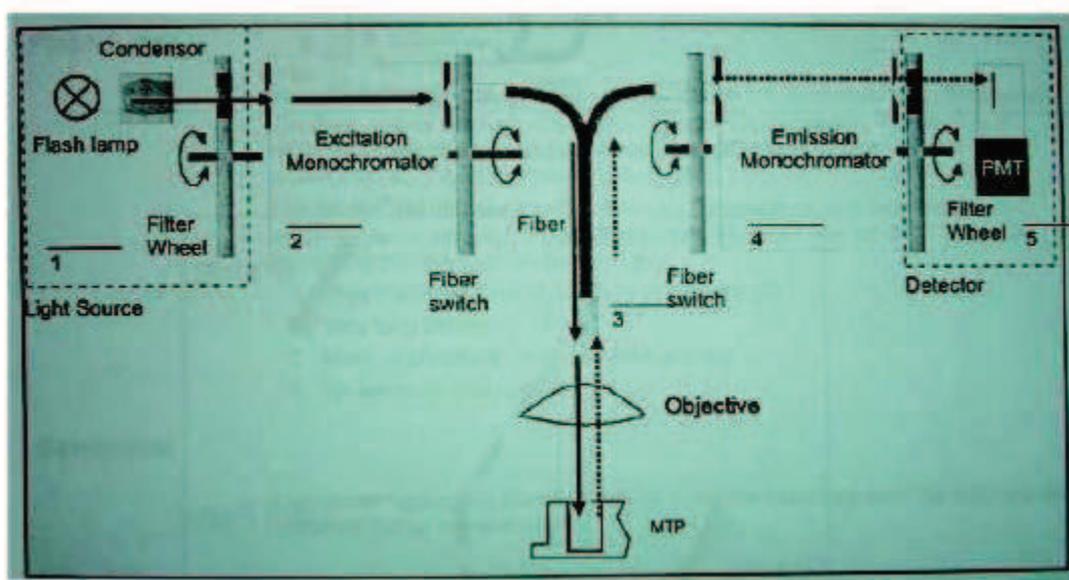


Figura5: schema del sistema di lettura Top Reading

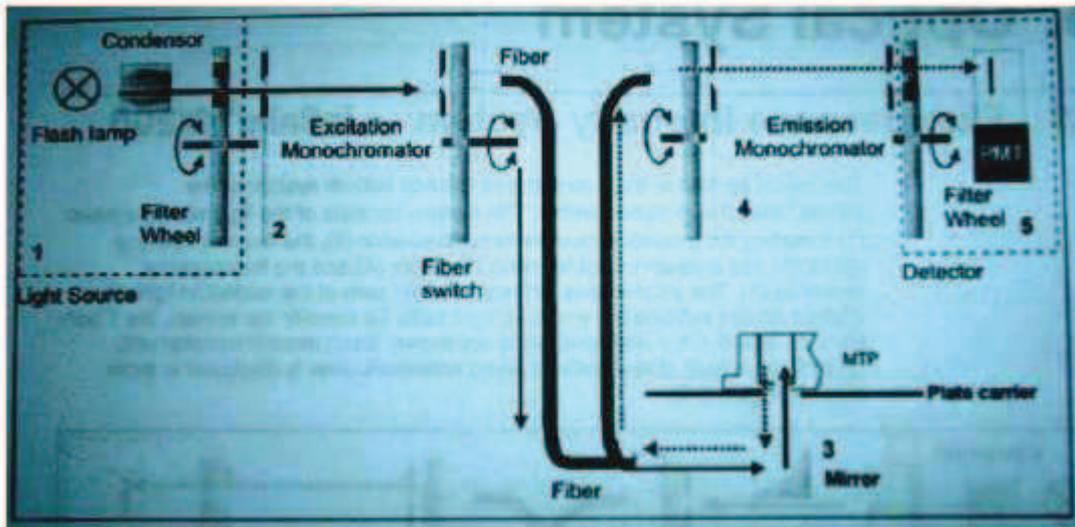


Figura6: schema del sistema di lettura Bottom Reading. Copia tratta da BLA BLA

Il sistema per la lettura in fluorescenza è così composto:

- 1 Sorgente di luce
 - Lampada ad arco allo xenon
 - Condensatore
 - Filtri
- 2 Monocromatore di eccitazione
- 3 Fibre ottiche di eccitazione ed emissione
- 4 Monocromatore di emissione
- 5 Sistema detector
 - Filtri
 - Fotomoltiplicatore

Come già detto la lettura della piastra multi pozzetto avviene automaticamente ed in pochissimo tempo (minuti o secondi a seconda della lettura) e l'impostazione dei parametri viene fatta via software attraverso un PC connesso al fluorimetro. Questo strumento per le letture in fluorescenza in modalità *top* e *bottom reading* permette di impostare i seguenti parametri:

- Lunghezza d'onda di eccitazione
- Banda di eccitazione
- Lunghezza d'onda di emissione
- Banda di emissione
- Gain del fotomoltiplicatore: il gain è possibile anche impostarlo in automatico, si adatterà alla quantità di segnale emesso dal campione.
- Il numero di flash per pozzetto: cioè il numero di misure eseguite per pozzetto sulle quali poi verrà calcolata la media
- Il tempo di integrazione
- La temperatura di termostatazione

3.3 Misure spettrofluorimetriche

La misura della fluorescenza di una soluzione può essere impiegata per la stima della concentrazione della molecola fluorescente in soluzione, i fotoni emessi sono infatti proporzionali alla quantità di fluoroforo presente. Questa relazione presenta caratteristiche lineari però solo a basse concentrazioni di fluoroforo ($<10^{-5}$ M). La relazione che lega la concentrazione del fluoroforo alla fluorescenza emessa dal campione può essere modellata nel modo seguente:

$$F = K * QY * I_0 * (1 - 10^{-\epsilon * b * c})$$

dove F è l'intensità della fluorescenza, K una costante geometrica propria dello

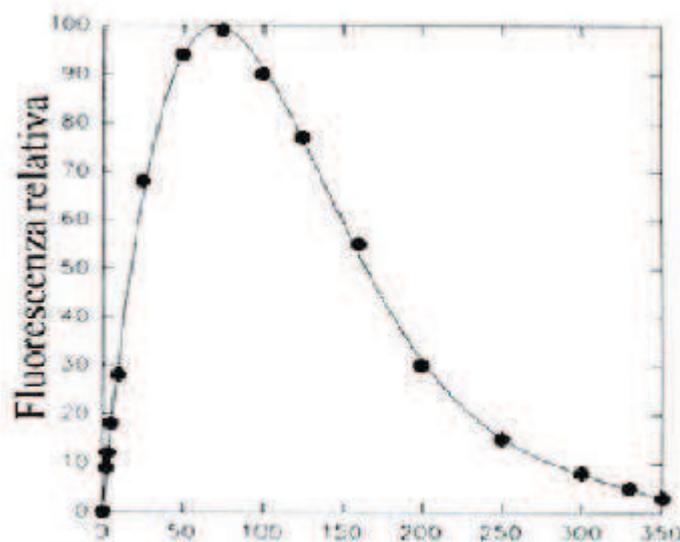


Figura7: relazione tra intensità di fluorescenza e concentrazione del fluoroforo

strumento, QY è l'efficienza quantica del fluoroforo (fotoni emessi/fotoni assorbiti), I₀ è l'intensità della luce incidente, ε il coefficiente di estinzione molare, b è la lunghezza del percorso ottico e c la concentrazione del fluoroforo. In Figura è graficata tale relazione.

A concentrazioni minori di 10⁻⁵ M però questa relazione può essere approssimata con la seguente relazione lineare:

$$F = K * QY * I_0 * 2.303 * \epsilon * b * c$$

Misure quantitative assolute risultano quindi possibili anche se spesso risultano più accurate misure quantitative relative, cioè riferite ad una misura standard di un campione definito unitario ed espresse in unità arbitrarie di fluorescenza.

3.4 Microscopia ottica in fluorescenza

Un altro strumento di osservazione e misura di fenomeni fluorescenti è il microscopio ottico. Il principio fisico è sempre lo stesso, ovvero il campione viene eccitato con una sorgente di luce monocromatica e se ne raccoglie la fluorescenza. L'osservazione però in questo caso avviene tramite un microscopio ottico equipaggiato per tali applicazioni. Il segnale utile per la costruzione dell'immagine è rappresentato solo dalla fluorescenza emessa dal campione, il risultato sarà un'immagine a sfondo scuro dove saranno visibili

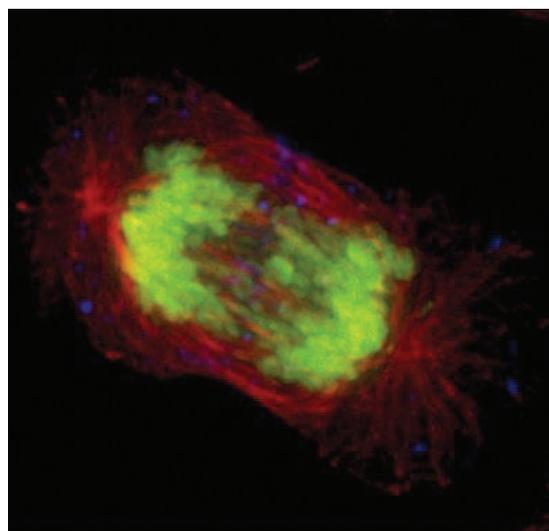


Figura8: foto al microscopio in fluorescenza

solo le strutture fluorescenti del campione. Questo permette di realizzare un *imaging* della distribuzione di una singola specie molecolare all'interno di una cellula o di un tessuto. In questo modo si possono ottenere informazioni ad esempio di ubicazione di strutture cellulari marcate con un fluoroforo oppure osservarne fenomeni di trasporto. In Figura vi è un esempio di fotografia al microscopio in fluorescenza.

Il problema principale dell'osservazione della fluorescenza in microscopia è che la potenza emessa per fluorescenza da un campione è sempre di diversi ordini di grandezza inferiore alla luce riflessa dal campione necessaria a generare tale emissione, quindi per ottenere un rapporto segnale-rumore tale da permettere l'*imaging* risulta indispensabile riuscire a separare queste due componenti. A tale scopo si sfrutta il fenomeno dello *Stokes shift* della fluorescenza, infatti le caratteristiche spettrometriche dei fluorofori utilizzati in queste applicazioni permettono, tramite sistemi di filtri ottici, l'isolamento e la raccolta del segnale di fluorescenza.

3.5 Strategia di funzionamento

In Figura è illustrato il percorso ottico che compie la luce all'interno di un tipico

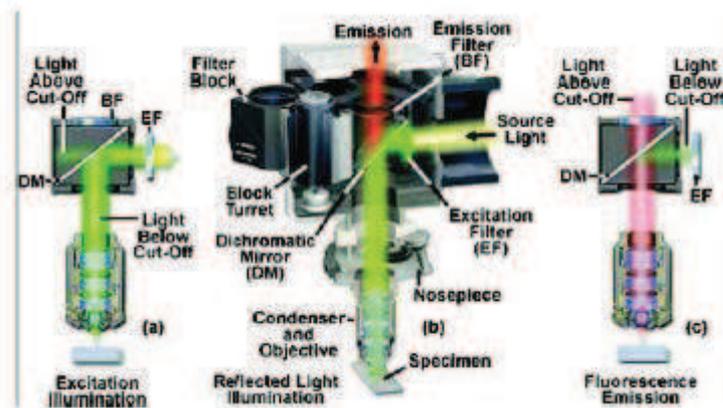


Figura9: percorso ottico della luce in un sistema ad epifluorescenza

microscopio operante in fluorescenza a luce riflessa o epifluorescenza. In queste applicazioni l'illuminazione del campione avviene in episcopia, cioè dalla stessa parte da dove avviene l'osservazione ed attraverso le stesse ottiche adibite all'osservazione.

A sinistra è illustrato il percorso della luce di eccitazione, a destra della luce di emissione del campione ed al centro l'intero percorso della luce di emissione ed eccitazione. L'illuminazione in questo genere di microscopi è prodotta all'esterno tramite lampade, a volte accoppiate a monocromatori, o laser monocromatici. Attraverso una fibra ottica tale luce viene portata in ingresso al microscopio, una volta all'interno verrà poi condotta attraverso un percorso ottico su cui sono posti numerosi filtri, sistemi di lenti ed altri dispositivi deputati ad eliminare tutte le componenti della luce non necessaria all'indagine da eseguire. Tale percorso ottico in fine conduce la luce all'obiettivo che funge anche da illuminatore. La frazione fluorescente del campione così eccitata emetterà fluorescenza. La debole luce emessa verrà raccolta dall'obiettivo e grazie ad un apposito sistema di filtri separata dalla luce riflessa e trasmessa all'osservatore. Molti sistemi per epifluorescenza, grazie a deviatori del percorso ottico, permettono oltre all'osservazione tramite oculari anche l'utilizzo di detettori per quantificare il segnale, come fotocamere o fotomoltiplicatori.

3.6 Filtri per fluorescenza

Come detto, ogni sistema di microscopia in fluorescenza è dotato di filtri ottici che permettono di eccitare il campione alla lunghezza d'onda desiderata e di separare efficacemente il segnale utile di emissione e la luce di eccitazione riflessa dal campione.

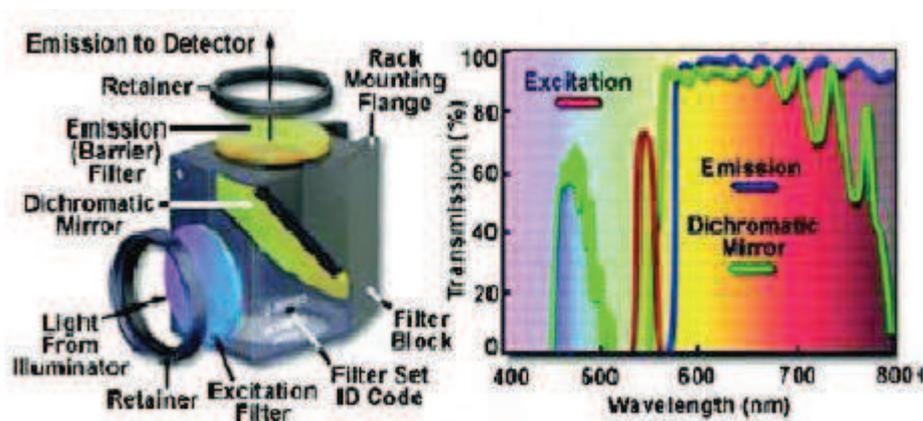


Figura10: pacchetto di filtri per microscopia in fluorescenza(sinistra) e spettri di trasmissione(destra)

I filtri comunemente usati in microscopia sono filtri a vetri colorati, ad interferenza o anche combinazioni delle due tipologie. Un tipico blocco di filtri per fluorescenza è illustrato in Figura, con i rispettivi spettri. Come è visibile il sistema è composto da tre tipi di filtri: il filtro di eccitazione (in azzurro) lo specchio dichroico (in verde, inclinato) e il filtro di emissione o filtro barriera. Il filtro di eccitazione riceve la luce di eccitazione ed ha su di essa un'azione passabanda molto selettiva (spettro rosso in figura()), questo serve per eccitare il campione ad una precisa lunghezza d'onda ed a garantire la corretta azione del dichroico; questo filtro potrebbe essere superfluo se si usano sorgenti di luce monocromatiche. Lo specchio dichroico è posto nel percorso ottico tra il campione e l'osservatore, inclinato di 45° (Figura, Figura). Esso, come si vede dal suo spettro di trasmissione, riflette sul campione la luce proveniente dal filtro di eccitazione, mentre è trasparente alle lunghezze d'onda della fluorescenza emessa dal campione, che può quindi attraversarlo e raggiungere il filtro barriera che rappresenta un ulteriore filtraggio passa alto per la luce che arriverà al sistema di acquisizione. Il filtro barriera risulta utile ad esempio per un eventuale fluorescenza di fluorofori diversi da quello indagato. Per ottenere un corretto *imaging* in fluorescenza sarà quindi indispensabile conoscere bene le caratteristiche spettroscopiche del fluoroforo utilizzato al fine di scegliere il pacchetto di filtri più adatto alle sue proprietà di eccitazione ed emissione. Il sistema di filtri viene alloggiato nel cammino ottico subito prima dell'obiettivo, generalmente in un roller di selezione rapida che permette di cambiarlo facilmente così da poter osservare campioni contenenti più fluorofori diversi.

3.7 Spettrofluorimetria Vs Epifluorescenza.

Ad oggi l'approccio più usato per le misure di fluorescenza su scala cellulare è quello spettrofluorimetrico, sicuramente grazie ai vantaggi che queste tecniche avanzano sulla microscopia per quanto riguarda studi di popolazione. Si assiste però ad un'espansione dell'utilizzo di tecniche di elaborazione di immagini da microscopia ottica per misurazioni di fluorescenza, soprattutto per la maggiore eterogeneità dell'informazione ricavabile unita anche al progredire di soluzioni tecniche che in parte stanno colmando

alcuni limiti delle misure in microscopia. Si potrebbero schematizzare i principali vantaggi e svantaggi dei due approcci come segue:

-Spettrofluorimetria:

Vantaggi

- La processazione del campione per queste misure è ridotta al minimo, infatti si tratta generalmente di prelevare un'aliquota di soluzione dalla popolazione e trasferirla nell'alloggiamento per la misura che è semplicemente un pozzetto sterile. Questo, lavorando per esempio con cellule, permette la loro osservazione in condizioni molto vicine a quelle ideali di crescita evitando di arrecare alterazioni del campione.
- Molti spettrofluorimetri, in Tecan Infinite[®] M200 ad esempio, permettono anche misure di assorbanza. Questo strumento risulta molto utile perché permette di stimare la fase di crescita cellulare contestualmente alla misura di fluorescenza. Questa informazione è importantissima quando si fanno studi di espressione genica.
- La possibilità di mantenere il campione in condizioni molto vicine a quelle ideali di crescita dà la possibilità di condurre misurazioni dinamiche. Cioè di misurare sempre lo stesso campione in crescita a diversi istanti di tempo in maniera automatica. Ad esempio alcuni spettrofluorimetri sono termostatati e consentono anche l'agitazione del campione.
- Le misure al fluorimetro si compongono di procedure completamente automatizzate. Questo garantisce un'altissima ripetibilità delle misure oltre a minimizzare l'occorrenze dell'errore umano.

Svantaggi:

- Per come è concepita questo genere di misura non può che dare solo informazioni medie del campione analizzato. Infatti il dato ricavato è rappresentativo solo della fluorescenza media e, se si tratta di colture cellulari, della stima della fase di crescita.

-Microscopia in fluorescenza:

Svantaggi:

- La processazione del campione cellulare necessaria per la realizzazione di un vetrino è sicuramente più laboriosa e traumatica per le cellule rispetto al semplice caricare un pozzetto del fluorimetro. Questo potrebbe arrecare danni al campione ed inficiare la misura. Come per esempio la sollecitazione meccanica dovuta allo schiacciamento delle cellule nel vetrino.
- Le condizioni di vita di cellule in un classico vetrino da microscopio sono molto lontane da quelle ottimali di crescita. Questo, limitando il tempo utile di osservazione di un vetrino, impedisce qualsiasi misura dinamica.
- Queste misure sono più difficilmente automatizzabili, e di fatto allo stato dell'arte lo sono. Questo influisce sulla loro ripetibilità oltre che sull'occorrenza dell'errore umano.

Tuttavia nuovi progressi tecnici hanno consentito di creare set-up di osservazione in microscopia tali da garantire migliori condizioni di vita dei campioni. Ad esempio sono

stati realizzati sistemi microfluidici che permettono vita, crescita e duplicazione cellulare in condizioni controllabili contestualmente ad un buon imaging in microscopia.[2]

Vantaggi:

- Il grande vantaggio che le misure di fluorescenza tramite microscopia introducono sono la possibilità di osservare il fenomeno su singola cellula. Infatti accoppiando queste tecniche ad algoritmi di elaborazioni di immagini come ad esempio segmentazione e riconoscimento automatico, eliminazione del rumore viene aperta a quest'era di ricerca la possibilità di ottenere informazioni molto più eterogenee sulla popolazione cellulare. La possibilità infatti di osservare in poco tempo un gran numero di cellule permette di ricavare informazioni di media, varianza e qualsiasi altro parametro statistico che molto probabilmente cela nuova informazione biologica. Un altro tipo di informazione che l'osservazione su singola cellula fornisce è quella, propria della microscopia, morfologica, utile ad esempio per indagare l'influenza di costrutti genetici nella morfologia cellulare, correlando ad esempio morfologia della cellula e segnale fluorescente. Un altro vantaggio che potrebbe derivare dall'elaborazione di immagini è la possibilità di ottenere segnale di fluorescenza proveniente solo dalla cellula eliminando per esempio fenomeni di disturbo a volte difficilmente controllabili come l'emissione del terreno di coltura.

Capitolo 4

Protocolli e set-up sperimentale

4.1 Set-up sperimentale

4.1.1 Microscopio.

Il microscopio usato per le acquisizioni è il Nikon ECLIPSE 2000-U [1] Figura

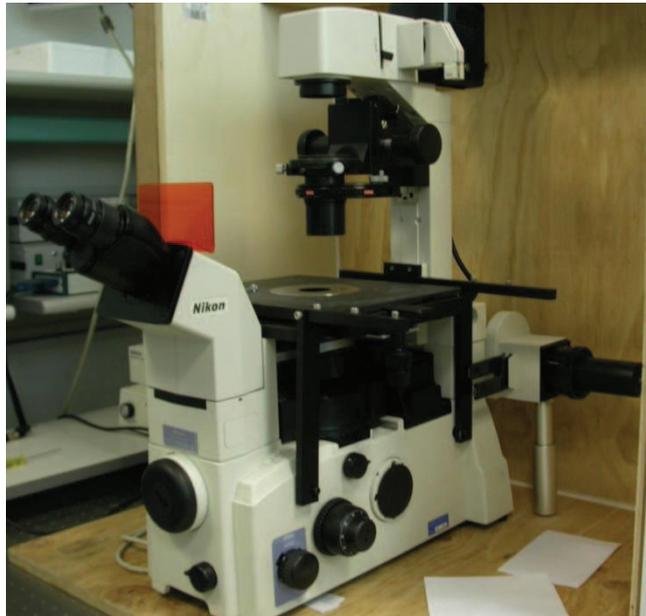


Figura1: Nikon TE2000-U

utilizzato in modalità campo chiaro e epifluorescenza.



Figura2: obiettivo per fluorescenza

L'obiettivo usato è un Nikon 40x con NA di 0,90 per fluorescenza Figura

Il blocco filtri per fluorescenza è il B-2A, è un filtro adatto a fluorofori con una banda di eccitazione di media grandezza. In Figura sono illustrati gli spettri di trasmissione dei

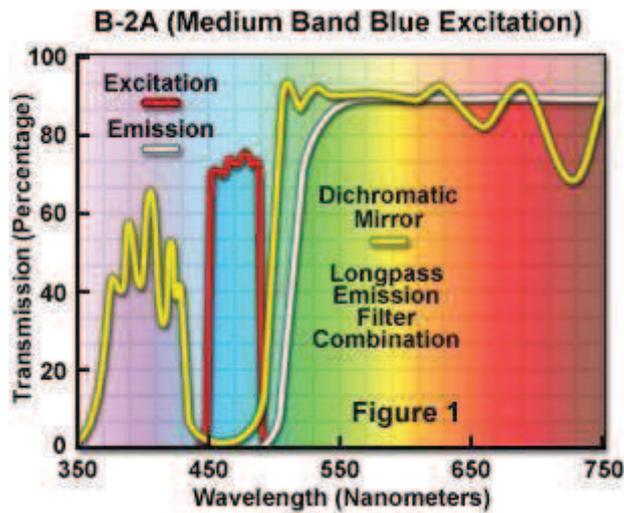


Figura3: caratteristiche di trasmissione dei filtri del B2-A

filtri ottici che lo compongono.

Il campione è isolato dalla luce esterna tramite un'involucro di legno che contiene



Figura4: case per la schermatura del microscopio dalla luce esterna

completamente il microscopio (Figura).

4.1.2 Sistema di illuminazione

La luce per l'eccitazione dei campioni è fornita da un sistema esterno composto da lampada ad arco e monocromatore Figura.

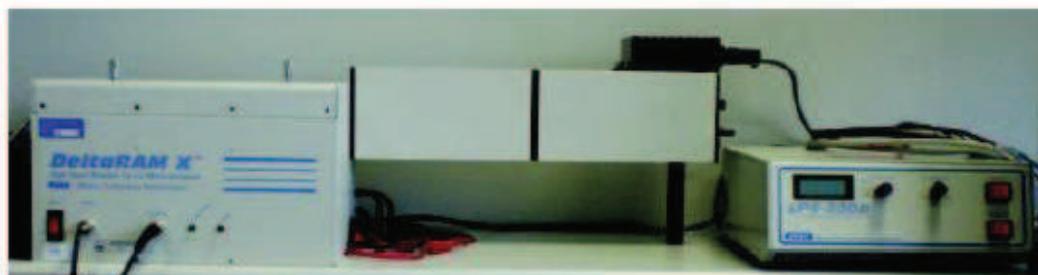


Figura6: sistema di illuminazione, (da sinistra) monocromatore, lampada ad arco, alimentatore della lampada

Il primo dispositivo sulla destra è l'alimentatore della lampada. La lampada è alloggiata nell'involucro sospeso al centro. E' una lampada ad arco allo xenon da 75 Watt con elettrodi in grafite.[data sheet]. Il monocromatore è un DeltaRAM X della Photon Technology Instrument(sulla sinistra). Esso è connesso direttamente alla lampada ad arco e funziona da selezionatore di lunghezza d'onda: riceve in ingresso la luce della lampada la scompone in fasci monocromatici e trasmette solo quella alla lunghezza d'onda desiderata. In Figura è illustrata una schematizzazione del percorso ottico all'interno del monocromatore. La luce proveniente dalla lampada entra nel monocromatore attraverso la fessura B, tramite un sistema di specchi viene indirizzata verso un prisma o reticolo di diffrazione D che la scompone in più fasci monocromatici, un'altra fessura F seleziona il fascio a lunghezza d'onda desiderata. Il prisma ha un'inclinazione regolabile, questo permette la selezione del fascio che attraverserà la fessura F e quindi la lunghezza d'onda in uscita da sistema. Tale inclinazione è controllata da un ingresso in tensione fornito da un calcolatore tramite un software di controllo implementato in Labview. Il software per il controllo della lunghezza d'onda

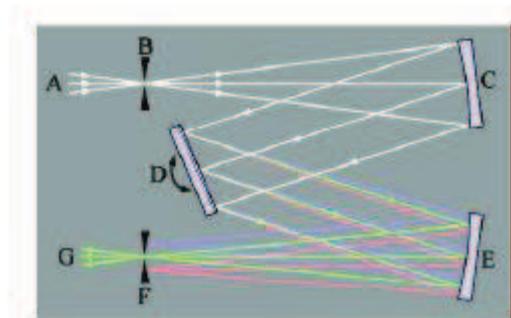


Figura5: Schema del percorso ottico della luce nel monocromatore

fornisce un intervallo di tensione da -4,87V a 4,87V, il monocromatore ha la seguente caratteristica tensione-lunghezza d'onda lineare:

$$V = 10.95 - \frac{3.65}{150} * \lambda$$

Dove V è la tensione imposta in Volt e λ la lunghezza d'onda in nm. Lo strumento può quindi fornire luce monocromatica dai 250nm ai 650nm. Un altro connettore in ingresso al monocromatore, sempre controllato dal software di controllo, fornisce un segnale di tensione TTL. Tale segnale aziona uno *shutter* che occlude l'uscita della luce dal sistema, interrompendo l'eccitazione del campione. La luce prodotta dal monocromatore viene portata in ingresso al sistema di illuminazione episcopico del microscopio tramite fibra ottica.

4.1.3 Fotocamera

La fotocamera utilizzata è una Nikon DS-5Mc dotata di un controller Nikon DS-U1. E' connessa al microscopio tramite un adattatore ed al controller tramite connessione seriale. Il controller è collegato al computer tramite USB.

4.1.4 Software di controllo

Il software di controllo, implementato in ambiente LabView fornisce due segnali di tensione al monocromatore uno per il controllo dello *shutter* e uno per la selezione della lunghezza d'onda. In Figura è visibile l'interfaccia del software per il controllo del monocromatore.

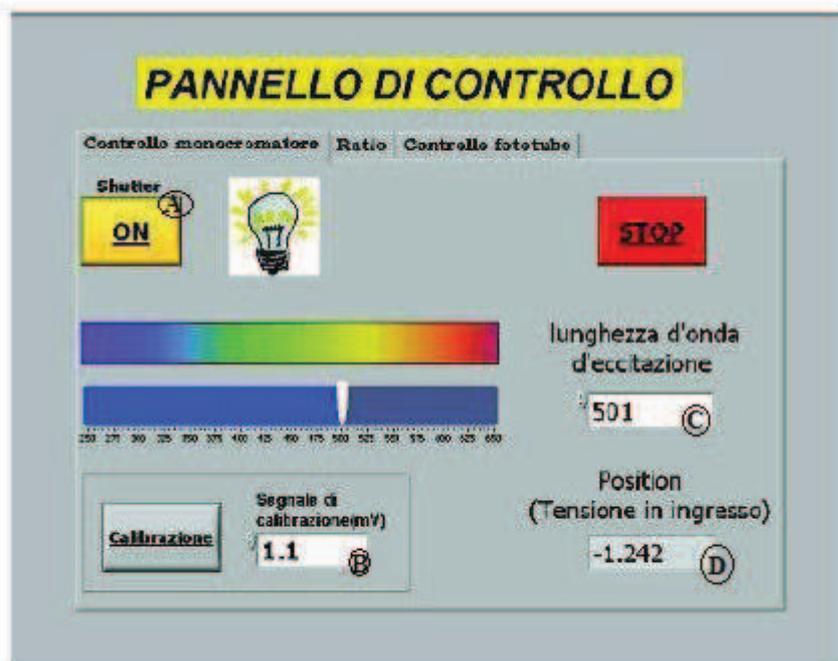


Figura7: interfaccia di controllo del monocromatore

Si può vedere: (A) Il pulsante che controlla lo *shutter* ,(B) il campo dove inserire il segnale di calibrazione per regolare l'off-set ,(C) il campo dove inserire la lunghezza d'onda di eccitazione desiderata, (D) il segnale di tensione in ingresso al monocromatore relativo alla lunghezza d'onda desiderata. I segnali di tensione sono forniti al monocromatore tramite due connettori BNC connessi ad un'(interfaccia elettronica?) connessa al computer tramite (cavo seriale?).

4.1.5 Software di acquisizione

MyAct3 è un software di acquisizione di immagini tramite microscopio realizzato da Alessandro Gherardi del Computer Vision Group dell'Università di Bologna rilasciato in versione Beta e sviluppato in un progetto di collaborazione con il modulo di Rigenerazione Tissutale Ossea dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna diretto dal Dott. Enrico Lucarelli. Attualmente il software è stato concesso in utilizzo gratuito al Laboratorio ICM della Seconda Facoltà di Ingegneria di Cesena e al Laboratorio di Bioscienze dell'IRST di Meldola. In Figura è visibile l'interfaccia di tale software.

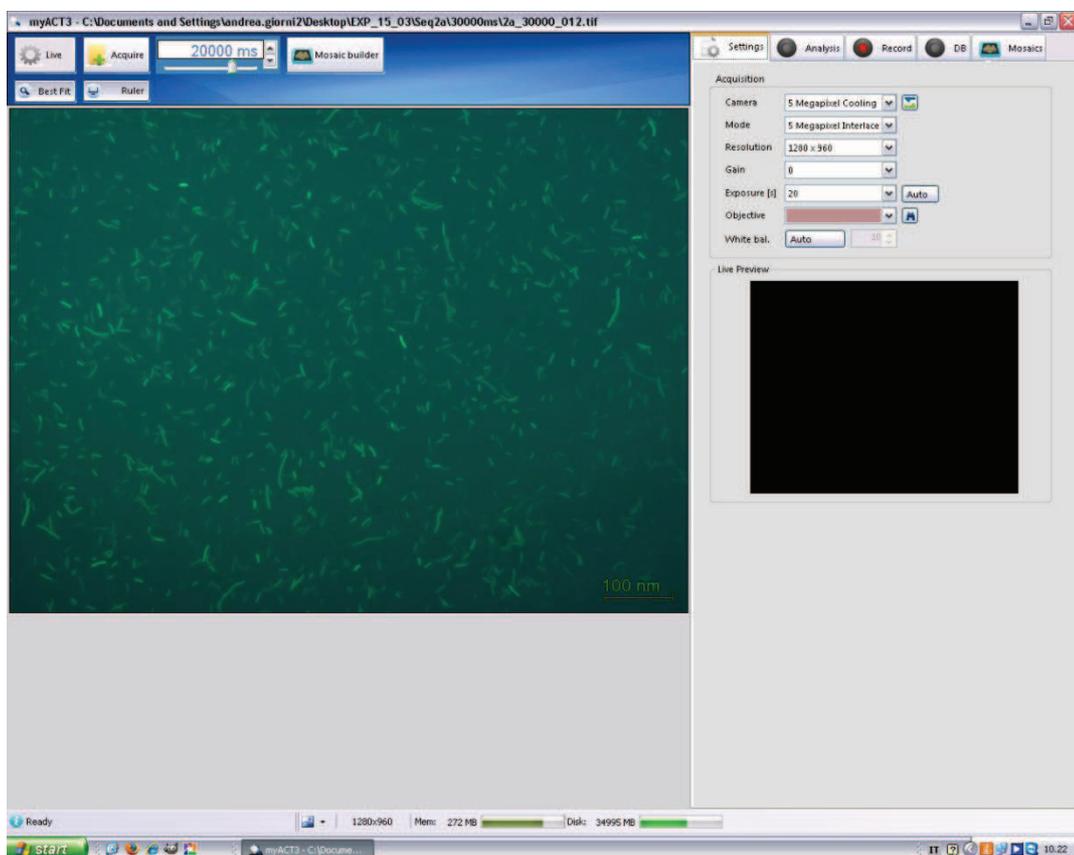


Figura8: software di acquisizione MyAct3, nella finestra live un esempio di foto di E.coli fluorescenti

Il software permette di settare:

- Modalità di funzionamento della fotocamera
- Risoluzione.

- Gain del sensore
- Tempo di esposizione
- Formato di salvataggio dell'immagin

MyAct3 permette la visualizzazione *live* del campione, fedele con i parametri impostati. E' possibile acquisire singole foto manualmente, in modalità Timelapse o RecLive. La modalità Timelapse acquisisce una serie di foto automaticamente, di cui l'operatore imposta, oltre che i parametri della foto, il numero e l'intervallo temporale tra l'una e l'altra. In modalità reclive invece vengono acquisiti più *frame* al secondo e l'operatore comanda tramite un pulsante l'inizio e la fine della Reclive. E' possibile inoltre visualizzare l'istogramma dell'immagine, sia di foto archiviate sia dell'immagine live. MyAct3 mette a disposizione anche altri strumenti che però non sono stati utilizzati per questa tesi.

4.1.6 Calibrazione del sistema

Allo scopo di calibrare l'off-set del segnale di tensione che controlla la lunghezza d'onda di eccitazione, prima di acquisire è necessario eseguire una procedura di calibrazione:

Tramite un collegamento a T si preleva il segnale di tensione da calibrare e lo si collega ad un oscilloscopio o ad un multimetro. Dal software di controllo si imposta una lunghezza di eccitazione a 450 nm che è la lunghezza d'onda corrispondente ai 0 Volt. Se nel multimetro non si legge 0 Volt si inserisce il valore di tensione nel campo di calibrazione del software di controllo(figura()) e si preme il pulsante "calibrazione". A questo punto si controlla di nuovo il valore nel multimetro, se non è 0 si reitera l'operazione fino a che non si raggiunge il valore più prossimo a zero. Solitamente si riesce a calibrare l'off-sett fino a leggere un valore di zero di qualche decimo di mVolt, che rappresenta un valore ben al di sotto del valore di tensione relativo alla risoluzione del monocromatore. Un variazione di un nanometro(che è la risoluzione dello strumento) corrisponde infatti ad una variazione di tensione pari a circa 24 mV.

4.2 Preparazione dei campioni

Terreno LB

Composizione per 1 litro di terreno:

- 10 gr di triptone
- 5 gr di estratto di lievito
- 10 gr di NaCl
- Acqua purificata milli-Q fino a raggiungere il volume di 1 litro
- 200 μ l di NaOH 5M

Preparazione:

In un cilindro graduato da un litro si mette il triptone l'estratto di lievito e l'NaCl; si aggiunge poi l'acqua milli-Q e i 200 μ l di NaOH. Mescolando si sciolgono tutti i componenti. Si versa il terreno in una bottiglia di vetro che andrà poi sterilizzato in autoclave ad 1 bar per circa 40 minuti.

Piastra di Petri per coltura con LB, agar e antibiotico.

Composizione della miscela di LB, agar e antibiotico:

- Terreno LB
- Agar in polvere all'1,5%
- Antibiotico

Preparazione:

In una bottiglia di vetro si mette l'agar in polvere in quantità tali da essere diluito all'1,5% in peso nel terreno, poi si aggiunge l'LB. Si sterilizza in autoclave ad 1 bar per

circa 40 minuti. Terminata la sterilizzazione si deve raffreddare la miscela per evitare di esporre l'antibiotico a temperature troppo alte che potrebbero danneggiarlo. Non bisogna comunque ancora far raffreddare la miscela per evitare che l'agar polimerizzi. Si tenga presente che l'agar gelifica a circa 40°. Con questi accorgimenti si aggiunge l'antibiotico, si chiude e si mescola. Subito dopo abbiamo messo con l'aiuto del pipettatore 25 ml di miscela per ogni piastra. Si attende poi qualche minuto che il terreno polimerizzi e si conserva in frigo a 4°.

Trasformazione mediante shok termico di E.Coli con DNA plasmidico e piastratura.

Necessario:

- Miniprep con il DNA plasmidico
- Aliquota di batteri competenti
- Terreno LB
- Piastra di terreno con agar e antibiotico
- Vaschetta con ghiaccio
- Tubo da 1,5 ml per la trasformazione

Presi i batteri dal congelatore a -80° e la miniprep dal -20° si mettono subito in ghiaccio a scongelare insieme al tubo da 1,5 ml per raffreddarlo in modo da evitare di esporre poi i batteri competenti a sbalzo termico. Scongelati batteri e costruito, si mette nel tubo per la trasformazione prima 1 µl di costruito poi da 50 a 100 µl di batteri. In questa operazione bisogna aver cura di risospendere con la micropipetta sia al momento del prelievo dei batteri che quando li si mette insieme al costruito. A questo punto il

tubo va rimesso subito in ghiaccio per c.a. 30 minuti per raffreddare i batteri prima dello shock termico.

Trascorsi 30 minuti in ghiaccio si mettono nel termo mixer, preriscaldato a 42°, per un minuto; poi subito in ghiaccio per 2 minuti.

A questo punto i batteri dovrebbero aver internalizzato il plasmide e si procede mettendoli in crescita senza antibiotico in LB. A questo scopo si mette 1ml di terreno LB nel tubo e si mette in crescita nel termomixer, presettato, in agitazione a 37° per un'ora. Qui i batteri si moltiplicano e traducono il corredo proteico per la resistenza all'antibiotico.

Per evitare ulteriori sbalzi termici ai batteri la piastra dove spatoleremo i batteri è stata portata a 37° in incubatore. Dopo un'ora di crescita si centrifuga il tubo a 10000 rpm per 1 minuto per far sedimentare i batteri e si toglie quasi tutto il soprannatante (noi abbiamo tolto c.a. 980 µl): questo per evitare che nella piastra con agar andasse troppo terreno allungando i tempi di asciugatura. A questo punto si risospendono i batteri sedimentati, si prelevano e si mettono al centro della piastra. Subito, con l'aiuto di una spatola sterile, si spalma la miscela di batteri e terreno su tutta la superficie dell'agar fino a parziale asciugatura (si sente sulla spatola della resistenza allo strisciamento). La piastra va poi capovolta e messa in crescita in incubatore a 37° O/N.

Terreno M9

Necessario:

- 100 ml di soluzione autoclavata di M9 minimal salts 5X
- 372 ml di soluzione autoclavata di caseina idrolizzato al 2%
- 17ml di Tiamina idrocloride al 1% sterilizzata per filtrazione
- 10ml glucosio 1M sterilizzato per filtrazione
- 1ml MgSO₄ 1M sterilizzato per filtrazione

-50µl di CaCl₂ 1M sterilizzato per filtrazione

Unire il tutto sotto cappa sterile in una bottiglia autoclavata. Aliquotare sempre sotto cappa in tubi da 50 ml e conservare al buio.

Miniprep

Protocollo del kit QIAGEN per miniprep.

Inoculo per miniprep

Necessario:

- tubo sterile da 15 ml
- terreno LB
- piastra di colonie batteriche
- antibiotico
- puntale per micropipetta da 10µl

Con il pipettatore si mette 5ml di terreno LB, assicurandosi che non sia contaminato, nel tubo da 15 ml. Si aggiunge con la micropipetta l'antibiotico alla giusta concentrazione. Si preleva una sola colonia dalla piastra strisciando il puntale sull'agar e inserendolo nel tubo. Si tappa e si mette in incubazione a 37° in agitazione O/N.

Inoculo per misure

Necessario:

- beuta da 25ml
- terreno M9
- antibiotico

-piastra di colonie batteriche

-eventuale induttore

-puntale per micropipetta da 10 μ l

Si mette in beuta con il pipettatore l'M9, sincerandosi che non sia contaminato, in quantità desiderata(ho fatto inoculi da 5 a 8 ml). Si aggiunge l'antibiotico con la micro pipetta alla corretta concentrazione. Si aggiunge l'induttore se necessario. Si preleva una sola colonia dalla piastra strisciando il puntale sull'agar e si inserisce il puntale nella beuta. Si chiude con stagnola e si mette in incubatore a 37° in agitazione O/N. Essendo l'M9 fotosensibile l'incubazione va fatta al buio, a questo scopo abbiamo coperto con un panno opaco l'incubatore.

Preparazione dei vetrini

Necessario:

-vetrino

-copri-oggetto

-tubo da 1,5ml

Si preleva la miscela di batteri dall'inoculo(io ho utilizzato da 500 μ l a 1ml per vetrino) e la si mette nel tubo. Si centrifuga per un minuto a 4400rpm. Si elimina il soprannatante lasciando un po' di terreno per risospendere il pellet(io ho lasciato dai 20 μ l ai 40 μ l a seconda della quantità di batteri). Si pulisce vetrino e copri-oggetto con un apposito panno di carta. Si sospendono i batteri con la micropipetta e si mette 20 μ l di miscela al centro del vetrino. Si pone sopra il copri-oggetto e con l'aiuto di un foglio di carta assorbente si preme dal lato del copri-oggetto per fermare i batteri all'interno del vetrino. Se dall'osservazione al microscopio i batteri risultano muoversi si preme ulteriormente.

Capitolo 5

Attività di laboratorio

5.1 Obiettivi

L'attività sperimentale è stata svolta nel laboratorio ICM di ingegneria molecolare e cellulare per lo studio dei bionanosistemi, circa da Novembre 2011 a Marzo 2012. Il mio lavoro si inserisce nel progetto messo in atto dalla collaborazione tra il laboratorio ICM e il Computer Vision Group(CVG) volto alla messa a punto di un sistema di acquisizione per misure di fluorescenza da elaborazione di immagini di microscopia ottica.

Gli obiettivi dell'acquisizione sono:

- Caratterizzazione della curva di risposta della telecamera
- Caratterizzazione del rumore
- Caratterizzazione del photobleaching del campione in condizioni di osservazione proprie di quel set-up

Per poter svolgere questi tre punti fondamentali si è deciso di acquisire, tramite il set-up di acquisizione da caratterizzare, delle sequenze di immagini di batteri E.coli modificati geneticamente in modo che esibissero fluorescenza. L'obiettivo del mio lavoro di tesi è stato quello di preparare il materiale biologico e partecipare attivamente al delineamento dei protocolli sperimentali per produrre tali immagini con caratteristiche il più possibile utili agli scopi dell'acquisizione e testare le funzionalità del sistema di acquisizione.

5.1.1 Curva di risposta

Per poter condurre delle osservazioni quantitative di fenomeni fluorescenti attraverso la microscopia ottica è necessario conoscere come la radianza della scena osservata, che è il dato che si intende misurare, e mappata nella matrice di impressione dei pixel del sensore ottico. Questa caratteristica, chiamata appunto funzione di risposta, molto spesso non è lineare per i sensori che si trovano in commercio, quindi per poter ottenere delle informazioni quantitative sulla radianza della scena è necessario conoscere la funzione di risposta della fotocamera. Purtroppo non si ha sempre a disposizione dei campioni a radianza nota con i quali costruire tale funzione, per questo i ricercatori del CVG hanno deciso di affrontare questo problema con un metodo analitico. E' possibile infatti caratterizzare questa funzione di risposta con un'immagine costante a radianza sconosciuta presa a diversi tempi di esposizione. E' stato deciso di modellare la curva di risposta con una funzione polinomiale di ordine con coefficienti c_n e ordine N da stimare:

$$I = F(M) = \sum_{n=0}^N c_n M^n$$

Dove M è la matrice dei valori dei pixel, I l'energia luminosa raccolta dai pixel, F la funzione di risposta della fotocamera. Per la stima dei parametri è stato scelto di procedere minimizzando la seguente funzione costo:

$$\varepsilon = \sum_{q=1}^{Q-1} \sum_{p=1}^P \left[\sum_{n=0}^N c_n M_{p,q}^n - R_{q,q+1} \sum_{n=0}^N c_n M_{p,q+1}^n \right]^2$$

Dove, detti e_q ed e_{q+1} sono due diversi tempi di esposizione, $R_{q,q+1}=e_q/e_{q+1}$ P è l'indice del p -esimo pixel e Q è il numero di immagini usate ed $M_{p,q}$ è il valore del p -esimo pixel della q -esima immagine presa con tempo di esposizione e_q . Una volta ricavato
Figura Figuratramite le relazioni

$$E = L * g * e_f$$

$$I = E * t_{exp}$$

Dove E è la potenza luminosa che impressiona il sensore e g ed e_f sono due parametri geometrici delle ottiche facilmente calcolabili.[1]

Questo procedimento permette, a partire dalla conoscenza di M e del tempo di esposizione, di risalire ai valori di radianza della scena e da la possibilità quindi anche di confrontare misure su immagini prese ad esposizioni diverse.

Per questo punto è stato dunque necessario acquisire sequenze di immagini ad esposizioni diverse di radianza il più possibile costante. In particolare si è deciso di acquisire due sequenze di immagini, ognuna delle quali ripetuta per i due costrutti utilizzati.

5.1.2 Rumore

Il sistema in dotazione al laboratorio non è stato concepito per condurre osservazioni quantitative, occorre dunque valutare e caratterizzare la componente di rumore che tale set-up produce sull'immagine. Caratterizzare il rumore del sistema di misura risulta infatti indispensabile per mettere a punto la parte di elaborazione delle immagini volta all'eliminazione di tale rumore.

5.1.3 Photobleaching

L'obiettivo di questo punto è quello di valutare quanto e come le condizioni di osservazione, richieste dal tipo di indagine, producessero photobleaching nel campione. Il photobleaching, come detto in precedenza è un fenomeno di foto-distruzione del fluoroforo che si manifesta in misura proporzionale all'entità dell'eccitazione luminosa subita. Risulta quindi indispensabile caratterizzarlo al fine di valutare la realizzabilità della misura ed anche, dove non trascurabile, considerarlo e renderne la misura immune tramite elaborazione delle immagini.

5.2 Materiale biologico utilizzato e preparazione dei campioni

Sono stati utilizzati due ceppi di batteri E.coli:

- E.coli DH5 α competenti per la clonazione dei costrutti genetici
- E.coli CSH126 competenti per le misurazioni

Sono stati utilizzati due programmi genetici per trasformare i batteri al fine di ottenere due popolazioni con caratteristiche fluorescenti diverse, in modo che le due popolazioni coprissero range di esposizione della fotocamera diversi.

Costrutto “2547-GFP”

Questo costrutto ha permesso di ottenere una popolazione batterica che presentasse emissione di fluorescenza molto forte. Era già stato precedentemente assemblato nel laboratorio ICM con componenti genetici modulari del *registry of standard biological parts*. E' composto da un promotore costitutivo e da un gene che codifica per la proteina reporter, la GFP. Questo programma è inserito in un plasmide per biobrik anch'esso standard dove è codificata la resistenza all'ampicillina.

Costrutti “2547-O1-GFP” e “1429-O1-LacI”

La cotrasformazione dei batteri con questi costrutti ha permesso di ottenere bassa emissione di GFP. Anche questo era già stato assemblato nel laboratorio ICM con componenti provenienti dal *registry of standard biological parts*. Si tratta di un programma genetico il cui valore di espressione di GFP è modulabile tramite l'induzione con IPTG. L'IPTG è un dimero analogo del lattosio non metabolizzabile dalla cellula che viene messo nell'inoculo in piccole concentrazioni. Il costrutto “2547-O1-GFP” è inserito in un plasmide con un gene per la resistenza all'ampicillina mentre il “1429-O1-LacI” in un plasmide con un gene per la resistenza alla Kanamicina.

Trasformazione batterica.

Il protocollo di trasformazione per la clonazione dei programmi genetici e per la produzione di batteri per le misure è lo stesso. Ho trasformato i batteri secondo la procedura dello shock termico (vedi capitolo sui protocolli). I batteri sono stati poi seminati in piastre di agar, LB ed antibiotico e conservati a 4° (vedi capitolo sui protocolli). Per la purificazione del DNA prodotto per clonazione ho utilizzato il kit per miniprep Qiagen.

Preparazione dei campioni

I vetrini per le acquisizioni sono stati prodotti secondo il protocollo descritto nel relativo capitolo.

5.3 Protocollo di acquisizione

L'intervallo di esposizione con il quale sono state acquisite le due sequenze è stato scelto in modo che gli istogrammi delle immagini prese con i valori estremi di esposizione fossero contenuti tutti dentro il range dinamico dei valori del sensore. In modo che nessuna foto risultasse sovraesposta o sottoesposta.

Ad ogni preparazione e acquisizione di un vetrino contenente batteri è stata fatta contemporaneamente una lettura di fluorescenza e assorbanza al fluorimetro di un campione della stessa popolazione, con il seguente protocollo:

Letture di fluorescenza Top Reading

- Lettura di tre pozzetti da 200 μ l per campione
- Lunghezza d'onda di eccitazione: stessa utilizzata per l'acquisizione al microscopio (501 e 497)
- Lunghezza d'onda di emissione: 535 nm
- Banda di eccitazione: 9 nm
- Banda di emissione: 20 nm
- Gain: 62, 60, 58, 56, 68
- Numero di flash: 20
- Integration time: 20 μ s
- Settle time: 0 ms
- Lag time: 0 μ s

Letture di assorbanza

- Lunghezza d'onda: 600 nm, 595 nm

- Banda: 9 nm
- Numero di flash: 16
- Settle time: 0 ms

Acquisizione 1

- Costrutto ad alta fluorescenza “2547-GFP”
- Lunghezza d’onda di eccitazione: 501 nm
- inoculo h:18:00 del giorno prima in 7 ml di M9 e ampicillina

Sequenza 1_Alta

Acquisizione di almeno 50 immagini in modalità RecLive per ogni esposizione nell’intervallo di acquisizione con illuminazione accesa e senza campione.

Sequenza 3a_Alta (vetrino 1)

Acquisizione di tre immagini per ogni esposizione nell’intervallo di acquisizione, con campione di batteri e sempre dello stesso campo di vista.

Sequenza 3b_Alta (vetrino 2)

Tre immagini del campione in cinque campi diversi mai eccitati a cinque tempi di esposizione che coprono tutto l’intervallo di esposizioni.

Sequenza 4a_Alta (vetrino 3)

Time lapse in tre campi diversi mai eccitati a tre esposizioni che coprono l’intervallo. 30 immagini, una ogni 30 sec.

Sequenza 4b_Alta (vetrino 3)

Al termine ogni sequenza 4a spegnere l'eccitazione e controllare la riattivazione ad intervalli di c.a. 10 min acquisendo un'immagine e spegnendo subito dopo l'illuminazione. Se viene notata riattivazione acquisire un'altra time lapse di 10 immagini.

Sequenza 4c_Alta (vetrino 3)

Time lapse su un punto non eccitato di 50 immagini, una ogni 30 sec., ad un'esposizione media.

Sequenza 5b_Alta (vetrino 4)

Tre immagini per ogni esposizione nell'intervallo, del terreno di crescita dei batteri.

Sequenza 5c (vetrino 5)

Tre immagini per ogni esposizione nell'intervallo del terreno di crescita dove non sono mai stati batteri.

Sequenza 6_Alta (vetrino 6)

Acquisire immagini di batteri senza costrutto per alte esposizioni

Acquisizione 2

-Costrutti per bassa fluorescenza: co-trasformazione con "1429-O1-GFP" e "2547-O1-GFP"

-Lunghezza d'onda di eccitazione: 497 nm

-Inoculo 1: h:18:00 del giorno prima in 8 ml di M9, Ampicillina, Kanamicina e IPTG 100 μ M

-Inoculo 2: h:18:00 del giorno prima in 8 ml di M9, Ampicillina, Kanamicina

Sequenza 1_Bassa

Acquisizione di almeno 50 immagini in modalità RecLive per ogni esposizione nell'intervallo di acquisizione con illuminazione accesa e senza campione.

Sequenza 2a_Bassa (vetrino 1)

Acquisizione di tre immagini per ogni esposizione nell'intervallo di acquisizione, con campione di batteri e sempre dello stesso campo di vista.

Sequenza 2b_Bassa (vetrino 2)

Tre immagini del campione in cinque campi diversi mai eccitati a cinque tempi di esposizione che coprano tutto l'intervallo di esposizioni.

Sequenza 4a_Bassa (vetrino 3)

Time lapse in tre campi diversi mai eccitati a tre esposizioni che coprano l'intervallo. 30 immagini, una ogni 30 sec.

Sequenza 4b_Bassa (vetrino 3)

Al termine ogni sequenza 4a spegnere l'eccitazione e controllare la riattivazione ad intervalli di c.a. 10 min acquisendo un'immagine e spegnendo subito dopo l'illuminazione. Se viene notata riattivazione acquisire un'altra time lapse di 10 immagini.

Sequenza 4c_Bassa (vetrino 3)

Time lapse su un punto non eccitato di 50 immagini, una ogni 30 sec., ad un'esposizione media.

Sequenza 5a_Bassa (vetrino 4)

Tre immagini per ogni esposizione nell'intervallo, del terreno di crescita dei batteri.

Sequenza 6_Bassa (vetrino 6)

Acquisire immagini di batteri senza costruito per alte esposizioni

5.4 Risultati e Discussione

Dalle letture al fluorimetro si è ricavato il valore della fluorescenza relativa di ogni campione batterico acquisito al microscopio. Il dato, per ogni valore di gain, è stato costruito mediando i valori di fluorescenza di ognuno dei tre pozzetti e normalizzando tale media con il valore della densità ottica fornito dal fluorimetro con la lettura di assorbanza. Questo passaggio è stato indispensabile per far sì che la misura condotta al microscopio del fenomeno fluorescente di una stessa popolazione non fosse influenzata dall'inevitabile cambiamento delle condizioni biologiche del campione dovuto al trascorrere di tempi consistenti tra una misura e l'altra.

5.4.1 Specifiche del data-set

Il motivo per cui si è scelto di acquisire le immagini da due popolazioni con diversa intensità di emissione è perché si è voluto testare le condizioni di lavoro del sistema nel più ampio intervallo possibile di esposizione in vista del suo possibile utilizzo in tale range. Si è quindi dovuto trovare le condizioni sperimentali di acquisizione e di scelta dei protocolli di produzione del materiale biologico per cui le due popolazioni

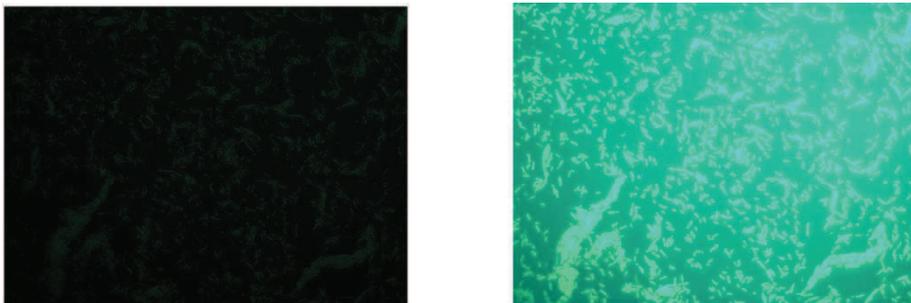


Figura1: foto di batteri ad alta fluorescenza prese con esposizione 250ms(sinistra) e 8000ms(destra) eccitati a 501 nm .

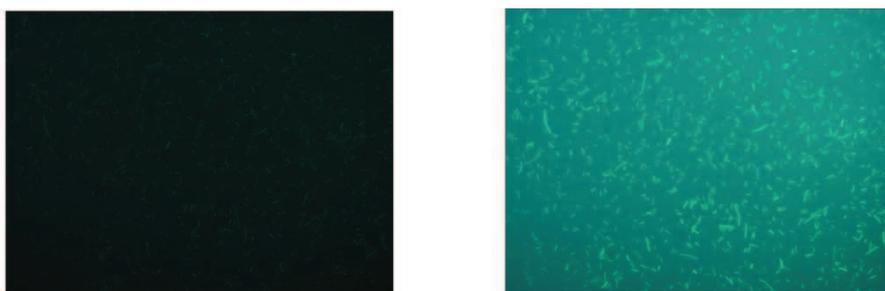


Figura 2 : foto di batteri a bassa fluorescenza prese con esposizione 8000ms(sinistra) e 60000ms(destra) eccitati a 497 nm.

emettessero in intervalli di esposizione diversi e contigui. I campioni prodotti e le condizioni sperimentali di acquisizione hanno soddisfatto questa specifica.

Sono visibili rispettivamente in Figura 1 e Figura 2 i batteri ad alta emissione (immagini prese dalla sequenza 3a_Alta) e bassa emissione (prese dalla 2a_Bassa). Si nota come sia stato possibile ottenere immagine ben esposte con tempi di esposizione tra 250 ms e 60000ms. Per ottenere la fluorescenza desiderata del costrutto a bassa emissione si sono fatte delle prove di induzione con IPTG a diverse concentrazioni (100 μ M, 500 μ M e 1000 μ M). La concentrazione di 100 μ M, indotto circa un'ora e mezza prima della misura è risultata essere la scelta migliore. Il criterio di scelta è stato: quella concentrazione che garantiva una percentuale di batteri indotti superiore almeno al 90%, dando la precedenza alla popolazione meno fluorescente. La scelta delle lunghezze d'onda di eccitazione è stata determinante per ottenere questo risultato. I 501 nm per i batteri ad alta emissione sono stati scelti perché è la lunghezza d'onda di eccitazione alla quale il fluoroforo utilizzato esibisce più fluorescenza. Ho deciso di non eccitare alla stessa lunghezza d'onda l'altra popolazione perché a tali esposizioni l'autofluorescenza del terreno peggiorava il rapporto segnale rumore tanto da rendere inutilizzabile la misura. Dopo alcune prove di eccitazione si è visto che ha 497 nm si otteneva un buon rapporto segnale rumore e una quantità di segnale tale da garantire la contiguità degli intervalli di esposizione.

5.4.2 Caratterizzazione della funzione di risposta

Per stimare la curva di risposta sono state usate le immagini acquisite nelle sequenze 2a_Bassa, 3a_Alta. L'obiettivo è quello di stimare due curve di risposta, una per i batteri ad alto contenuto di GFP, quindi utilizzando immagini prese a basse esposizioni, ed una per i batteri a basso contenuto di GFP quindi con immagini prese ad alte esposizioni, in modo tale da confrontare le due curve e osservare la sovrapposibilità per verificare la bontà della stima in un ampio range di esposizioni. Quindi le sequenze 2a_bassa e 3a_Alta servono per stimare le curve di risposta rispettivamente ad alte esposizioni e basse esposizioni.

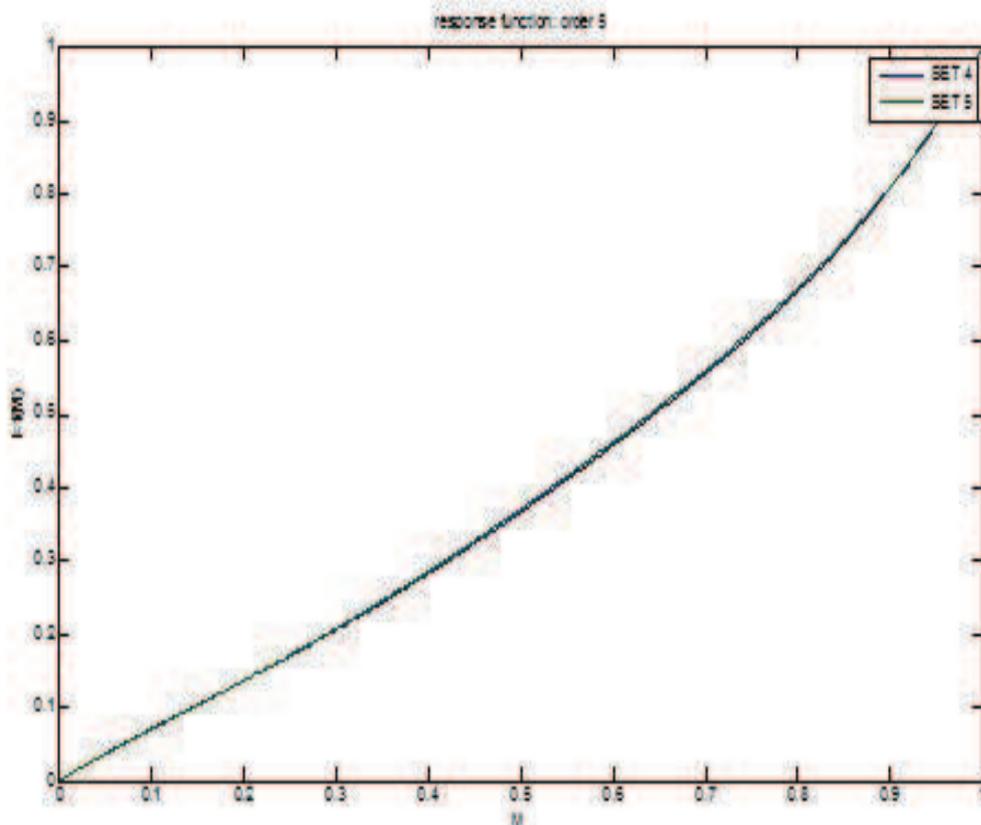


Figura3: sovrapposizione di due curve di risposta calcolate con due set di dati ricavati da colture a bassa ed alta emissione.

In Figura è illustrato il grafico di due curve di risposta calcolate con due set di dati diversi ricavati da colture rispettivamente a bassa e ad alta emissione. I dati per il calcolo di tali curve non sono ricavati dalle colture delle: Figura e Figura ma da altre acquisizioni che presentavano un maggior grado di sovrapposizione degli intervalli di esposizione. Quindi la buona sovrapposibilità delle curve in figura non conferisce robustezza al risultato in termini di range di esposizione. I due set di dati comunque presentavano caratteristiche di fluorescenza molto diverse, quindi il fatto che si sia arrivati ad uno stesso risultato è indice della bontà del metodo di stima. Anche con le sequenze 2b_Bassa e 3b_Alta l'obiettivo sarà quello di costruire funzioni di risposta. Lo scopo però di queste curve sarà diverso. Tali sequenze infatti sono state acquisite allo scopo di valutare l'effetto di photobleaching avvenuto sulle sequenze rispettivamente 2a_Bassa e 3a_Alta, che potrebbe compromettere una stima verosimile della caratteristica della fotocamera. Queste immagini infatti hanno subito più eccitazione

delle 2b_Bassa e 3b_Alta (vedi protocollo acquisizioni). Dunque costruendo delle curve di risposta con queste sequenze “non bleachate” e confrontandole con quelle costruite con le sequenze “bleachate” sarà possibile validare o meno la funzione di risposta. Il motivo per il quale non si è deciso di calcolare le curve di risposta direttamente con queste sequenze è la scarsità in numero di tali sequenze, dovuta alla difficoltà pratica di acquisire un numero sufficiente di campi di vista dello stesso vetrino non precedentemente eccitati, che non permette una buona stima dei parametri del modello, ma che di fatto permette di valutare l’influenza del photobleaching sulla stima delle curve di risposta.

5.4.3 Caratterizzazione del rumore

Le sequenze adibite alla caratterizzazione del rumore sono le:

- 1_Bassa
- 1_Alta
- 5b_Alta
- 5a_Bassa
- 5c

Le sequenze 1_Alta e 1_Bassa hanno lo scopo di caratterizzare il rumore del sistema in assenza di vetrino ad illuminazione accesa per ogni esposizione nell’intervallo dell’esperimento.

Le sequenze “5” invece sono state ideate per caratterizzare il rumore della scena in presenza di vetrino e per valutare le proprietà di fluorescenza del terreno di coltura. In particolare sono stati acquisiti terreni provenienti da colture ad alta fluorescenza (5b_Alta), a bassa fluorescenza (5a_Bassa) e da campioni dove non sono mai stati presenti batteri. Questo per valutare se le proprietà di fluorescenza del terreno fossero influenzate dalla presenza di batteri o dal costrutto che questi batteri esprimevano.

La caratterizzazione che queste sequenze permettono ha lo scopo di eliminare il più possibile dalle immagini acquisite la componente di rumore, prima di essere usate per la stima della funzione di risposta o del photobleaching, o comunque ogni volta che si desidera condurre misure con questo sistema di acquisizione.

I terreni della coltura dei batteri sono stati rappresentati dal soprannatante ricavato dalla centrifugazione (vedi capitolo sui protocolli) degli stessi batteri che sono stati acquisiti.

5.4.4 Caratterizzazione del photobleaching e riattivazione

Le sequenze per la caratterizzazione del photobleaching e della riattivazione sono:

- 4a_Bassa/4a_Alta
- 4b_Bassa/4b_Alta

In particolare le sequenze 4a hanno lo scopo di acquisire una stessa scena a distanza di 30 secondi mentre è sottoposta ad eccitazione. Tramite queste sequenze e la funzione di risposta della fotocamera si possono costruire delle curve di decadimento della radianza della scena allo scopo di caratterizzare il fenomeno di photobleaching della GFP in queste condizioni sperimentali. Le immagini di Figura 4 le quali però non sono state ancora elaborate per eliminare il rumore e per riferirle ai valori di radianza, mostrano un effettivo decadimento del fenomeno fluorescente. Tali immagini sono la prima (sinistra)

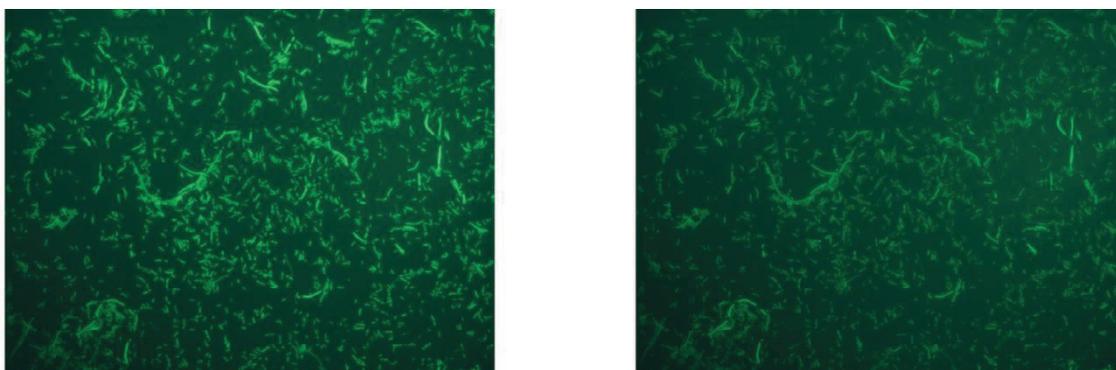


Figura 4 : immagini di batteri ad alta fluorescenza prima (sinistra) e dopo (destra) aver subito photobleaching.

e l'ultima (destra) immagine della sequenza 4a_Alta a 2000 ms di esposizione. Le due immagini sono state acquisite a una distanza l'una dall'altra di 15 minuti, durante i quali l'eccitazione era attiva. In Figura invece sono riportate delle curve di decadimento ricavate dal CVG con sequenze acquisite dallo stesso sistema di misura ma con parametri di TimeLapse diversi, sequenze più lunghe (2200 sec) e intervallo tra le foto di 45 secondi.

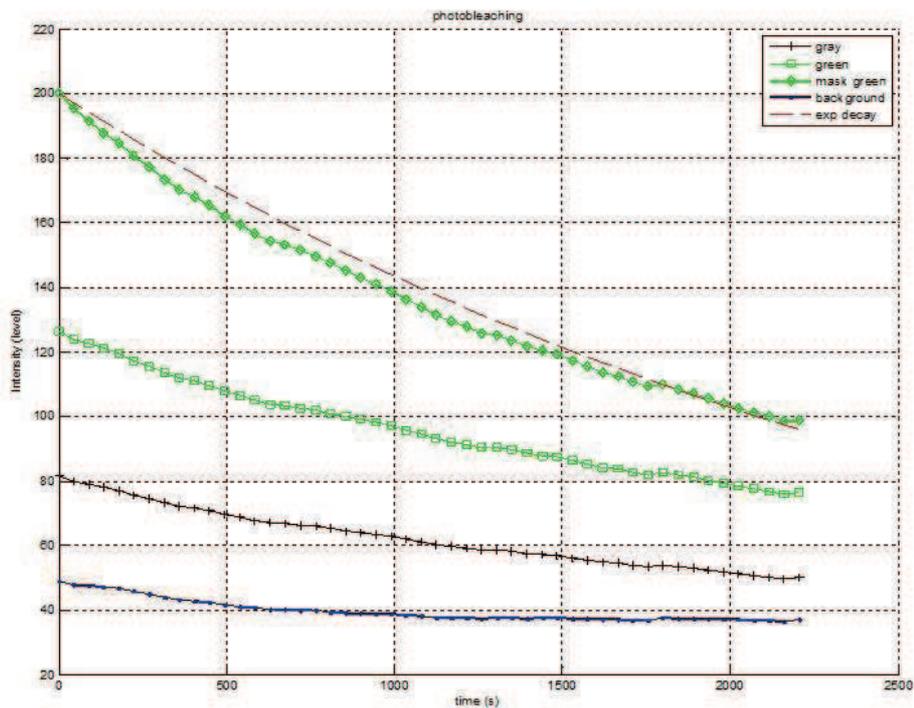


Figura5: Curve di decadimento nel tempo della fluorescenza dovuto a photobleaching

Le curve rappresentano:

- Gray: valore medio dell'immagine convertita in gray level
- Green: valore medio del solo canale green del RGB
- Mask green: valore medio dei soli batteri segmentati con algoritmo a soglia locale
- Background: valore medio del solo background dopo la segmentazione
- Exp decay: fitting con esponenziale negativa

Questi risultati suggeriscono che tale fenomeno non è trascurabile se si vuole condurre delle indagini quantitative in queste condizioni di osservazione. Caratterizzando però al meglio tale fenomeno può essere possibile tenerne conto grazie all'elaborazione numerica, rendendone immune la misura.

Le sequenze 4b_Alta e 4b_Bassa avevano lo scopo di verificare l'occorrenza di una riattivazione del fluoroforo "bleachato" dopo un intervallo di tempo in cui

l'illuminazione veniva spenta. Ho eseguito l'indagine per circa 20-30 minuti per ogni sequenza e non è stata osservata alcuna riattivazione.

5.4.5 Le sequenze 4c

Con le sequenze 4c si voleva valutare il fenomeno di fluorescenza e le condizioni del vetrino dopo un lungo tempo di acquisizione. Tale acquisizione non ha prodotto particolari risultati, se non altro photobleaching.

5.5 Conclusioni e sviluppi futuri

In conclusione il lavoro da me fatto in laboratorio in questi mesi ha permesso di ottenere acquisizioni da campioni in grado di soddisfare le specifiche richieste dal tipo di risultati attesi dai futuri protocolli di ricerca. Le difficoltà che ho incontrato sono state legate principalmente alla complessa natura del materiale biologico utilizzato, che ha reso difficile operare in condizioni sperimentali ripetibili e quindi trarre informazioni robuste dalle evidenze dei singoli esperimenti. Il percorso ha però alla fine portato a un risultato incoraggiante: alla luce dei dati descritti, il team del Computer Vision Group dispone degli elementi necessari per la realizzazione di un set-up di misura di segnali fluorescenti tramite microscopia ottica. Ciò rappresenta un notevole potenziale di sfruttamento della strumentazione del laboratorio a costi contenuti.

Appendice

Protocolli di calibrazione del microscopio ottico

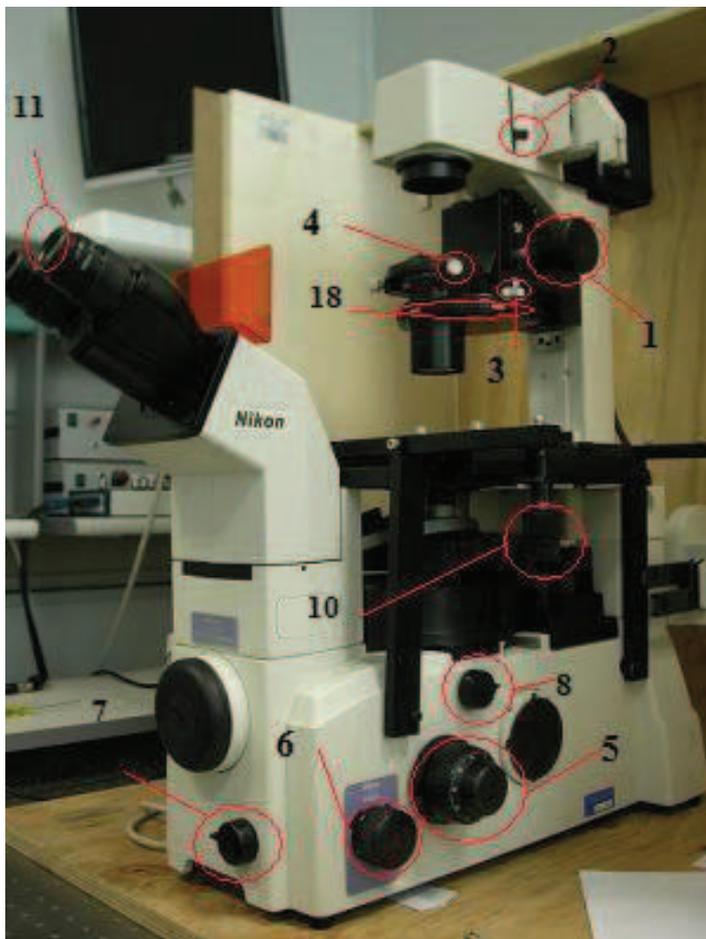


Figura 1 : Vista sinistra del microscopio con riferimenti alle regolazioni



Figura 2 : Vista frontale del blocco condensatore

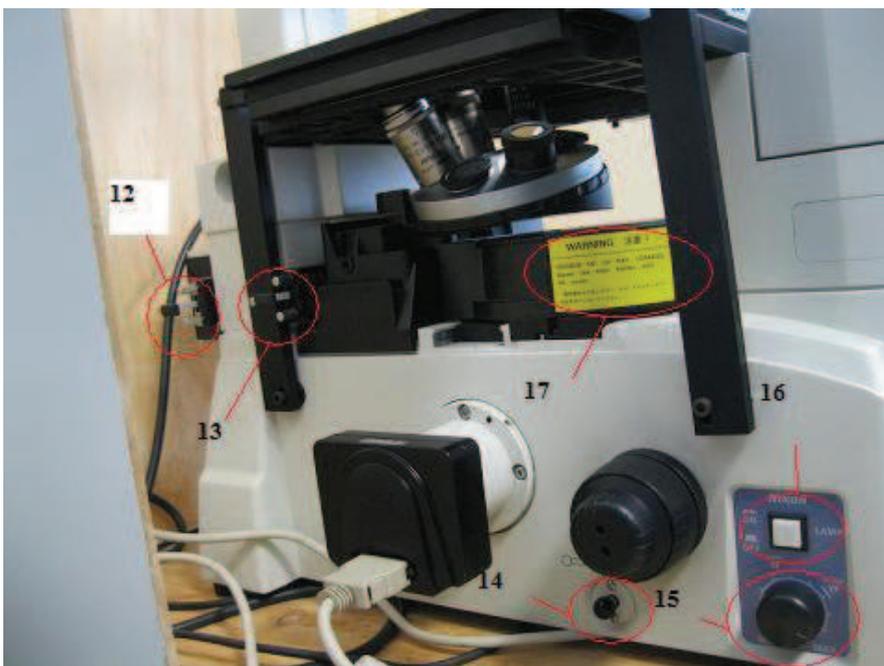


Figura 3 : Lato sinistro del microscopio con riferimenti alle regolazioni

Legenda regolazioni

1. Manopola di regolazione dell'altezza del blocco condensatore
2. Levetta di regolazione dell'apertura del diaframma di campo

3. Viti di centraggio dei diaframmi di apertura e fase del blocco condensatore
4. Viti di centraggio del blocco condensatore
5. Manopole macrometrica e micrometrica di messa a fuoco
6. Manopola di sezione del percorso ottico
7. Manopola di inserimento della *photo-mask*
8. Manopola di inserimento di un ulteriore ingrandimento di 1.5x
9. Levetta regolazione dell'apertura del diaframma di apertura
10. Rotelle per la traslazione orizzontale dell'*holder*
11. Rotelle di regolazione diottrica
12. Regolazione del diaframma di campo dell'illuminazione in episcopia
13. Regolazione del diaframma di apertura dell'illuminazione in episcopia
14. Tiretto per bloccare un eventuale inserimento di luce parassita dagli oculari quando non si conduce l'osservazione tramite oculari
15. Potenzimetro della lampada dell'illuminazione in diascopea
16. Pulsante di accensione dell'illuminazione in diascopea
17. Alloggiamento filtro per fluorescenza
18. Roller selettore dei diaframmi nel blocco condensatore

Operazioni per garantire il corretto funzionamento in campo chiaro e in contrasto di fase.

1. Regolazione altezza del condensatore

- Accendere il sistema di illuminazione.
- Regolare la manopola di selezione (Regolazione 6) in posizione 1 per attivare la vista tramite oculare.
- Mettere a fuoco un campione attraverso la manopola macro e micrometrica di messa a fuoco (Regolazione 5).
- Regolare il diaframma di campo per rendere visibile il “pipistrello” nel campo di vista.(Regolazione 2)
- Attraverso la manopola di regolazione dell’altezza del blocco condensatore (Regolazione 1) si mette a fuoco il “pipistrello” del diaframma di campo.

2. Centraggio del blocco condensatore

- Rregolare il diaframma di campo (Regolazione 2) in modo che risulti visibile il “pipistrello del diaframma di campo”.
- Tramite le due viti di centraggio del blocco condensatore (Regolazione 4) si centra il “pipistrello” del diaframma di campo sul campo di vista. Figura 4

Per questa operazione è utile aprire il diaframma di campo al massimo, sempre fino a che non sia tutto contenuto entro il campo di vista.

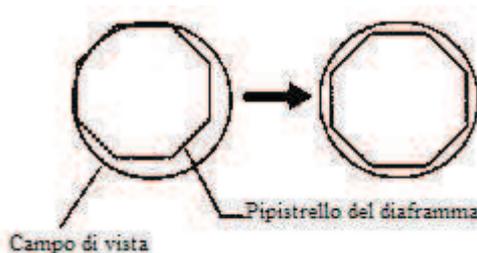


Figura 4 : centraggio del “pipistrello” del diaframma di campo

3. Regolazione del diaframma di campo

- Il diaframma di campo deve essere aperto agendo sulla levetta (Regolazione 2) in modo che il pipistrello risulti appena fuori dal campo di vista.

Un'eccessiva chiusura del diaframma di campo può risultare in una non uniforme illuminazione del campo di vista.

4. Regolazione diottrica degli oculari

- Ruotare in senso antiorario la manopola (Regolazione 7), inserire la “*photo-mask*” nel cammino ottico.

- Guardare nell'oculare sinistro con l'occhio sinistro, agire sull'anello di regolazione diottrica (Regolazione 11) fino a portare a fuoco la doppia croce centrale della “*photo-mask*”. Figura 5

- Guardando nell'oculare destro con l'occhio destro, agire sull'anello di regolazione diottrica fino a portare a fuoco la doppia croce centrale della “*photo-mask*”. Figura 5

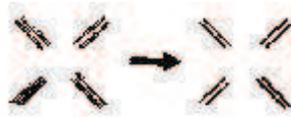


Figura 5: regolazione diottrica

Regolazioni specifiche per il contrasto di fase

1. Selezione dell'anello di fase.

-Attraverso il roller selettore dei diaframmi nel blocco condensatore (Regolazione 18) posizionare nel cammino ottico l'anello di fase adatto all'obiettivo utilizzato.

Tutti gli anelli di fase sono contrassegnati da un codice, ad es.: "Ph1, Ph2, Ph1". L'anello di fase scelto deve avere lo stesso codice scritto sull'obiettivo.

2. Centraggio del diaframma ad anello per il contrasto di fase.

Questa operazione deve essere necessariamente svolta dopo il “centraggio del blocco condensatore” .

-Togliendo l'oculare sarà visibile il diaframma ad anello del blocco condensatore illuminato ed il diaframma ad anello dell'obiettivo in ombra. Attraverso le due viti di centraggio dei diaframmi del blocco condensatore (Regolazione 3), si procederà allo spostamento del diaframma anulare fino a che non sarà sovrapposto al meglio con quello in ombra dell'obiettivo. Figura 6

La vite di destra sposta il diaframma lateralmente, quella di sinistra frontalmente. Per poter agire con la vite di sinistra sulla posizione frontale dell'anello però è necessario bloccare con la mano il selettore dei diaframmi, altrimenti la rotazione della vite causerà una rotazione del selettore.

-Rimettere l'oculare.

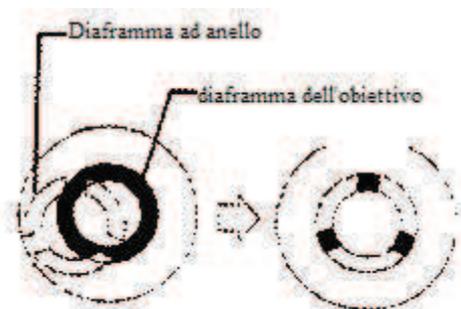


Figura 6: centraggio del diaframma anulare

Regolazioni per il campo chiaro

1. Selezione del diaframma di apertura.

-Attraverso il roller selettore dei diaframmi nel blocco condensatore (Regolazione 18) inserire nel cammino ottico il diaframma di apertura, contrassegnato con la lettera "A".

2. Regolazione dell'apertura del diaframma di apertura.

-Togliendo l'oculare e guardando nella pupilla d'uscita dell'obiettivo sarà visibile il diaframma di apertura in ombra che limita esternamente un cerchio luminoso. Attraverso la rotella di regolazione del diaframma di apertura (Regolazione 9), regolare quest'ultimo in modo che limiti esternamente il cerchio luminoso per una porzione indicativamente di un ottavo dell'area del cerchio.

Il cerchio luminoso rappresenta l'apertura numerica (NA) dell'obiettivo, il pipistrello quella del condensatore. Per sfruttare al meglio la NA dell'obiettivo, e quindi il suo potere risolutivo, è

necessario che la NA del condensatore sia nei rapporti suddetti con quella dell'obiettivo.
L'apertura numerica aumenta il potere risolutivo ma fa diminuire la profondità di fuoco. Questa operazione è necessario eseguirla ad ogni cambio dell'obiettivo per regolarsi sulla sua NA.

-Rimettere l'oculare.

Bibliografia

Capitolo 1

[1] Waclaw Szybalski. In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription, page 405. Plenum Press, New York, 1974.

[2] Wikipedia

[3]http://annameldolesi.italianieuropei.it/2010/05/biologia_sintetica_ecco_cose/

Capitolo 2

[1] http://www.funsci.com/fun3_it/sini/eo/o11-fluor.pdf

[2] wikipedia

[3] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. J. Cell. Comp. Physiol. 59:223–39

[4] Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J. 1974. Biochemistry 13:2656–62

[5] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Gene 111:229–33

[6] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Science 263:802–5

[7] Inouye S, Tsuji FI. 1994. FEBS Lett. 341:277–80

[8] Tsien R (1998). "The green fluorescent protein" . Annu Rev Biochem 67: 509–44.

[9]<http://www.ls.manchester.ac.uk/research/researchgroups/cellorganisationanddynamics/>

[10]Siegel MS, Isacoff EY. 1997. Neuron 19:735–41

[11]Stryer L. 1978. Annu. Rev. Biochem. 47: 819–46

[12]Tsien RY, Bacskai BJ, Adams SR. 1993. Trends Cell Biol. 3:242–45

[13]<http://messa-a-fuoco.com/lu.com/capitolo1.php>

Capitolo 3

[1] Tecan Infinite M200 manual

[2] Microfluidic devices for measuring gene network dynamics in single cells.

Matthew R.Bennet and Jeff Hasty. Sept. 2009

Capitolo 4

Capitolo 5

[1] Datasheet Nikon ECLIPSE TE2000-U.

Capitolo 6

[1] A robust approach to reconstruct experimentally the camera response function

Alessandro Bevilacqua, Alessandro Gherardi e Ludovico Carozza IEEE

