



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna
Policlinico S. Orsola-Malpighi



Centro unificato di
Ricerca Biomedica applicata

Service per la Ricerca e la Diagnostica Attività di Biologia Molecolare e Cellulare

Al CRBA sono presenti le competenze professionali e le facilities tecnico-strumentali per eseguire attività di ricerca e diagnostica nel campo della Biologia Molecolare. Alcune di queste attività possono essere offerte anche come *service* all'esterno.

Le strumentazioni, le connesse facilities e le attività disponibili in *service* sono le seguenti:

1. Piattaforma di genomica Mass-Array Sequenom

Il CRBA dispone della piattaforma di genomica Mass-Array Sequenom che comprende:

- Spettrometro di Massa Maldi-Tof (Bruker)
- Chip-Nanodispenser (Samsung)
- Robot preparativo (Matrix)
- Thermal Cycler 384 wells (Biorad)

Con questa tecnologia possiamo attualmente offrire le seguenti attività:

1.1 SNPs Genotyping Facility

La facility consente di genotipizzare mediante tecnologia high-throughput polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del DNA. La piattaforma permette di analizzare simultaneamente 10-36 SNPs diversi, su 384 campioni, per ogni seduta di lavoro. La processività della facility è di circa 1.000 analisi alla settimana (1 analisi = 1 campione genotipizzato per 10-36 SNPs).

La piattaforma Sequenom è ottimale per studi di associazione gene-candidato, che richiedano l'analisi di 10-500 SNPs.

Le attività che il team addetto alla SNPs Genotyping Facility è in grado di offrire sono le seguenti:

- project design
- primer design
- esecuzione PCR
- iPlex e conditioning
- nanodispensing
- analisi MaldiTof
- normalizzazione output e invio dati in file Excel
- consulenza e supporto al disegno sperimentale e all'analisi dei dati

1.2 Analisi dei profili di metilazione del DNA

Un'ulteriore applicazione della piattaforma Sequenom consente lo studio epigenetico dei profili di metilazione del DNA. L'analisi permette di determinare simultaneamente la percentuale di metilazione di centinaia di CpG nelle regioni dei promotori genici. La tecnologia permette di analizzare 300-500 nucleotidi su 384 campioni, per ogni seduta di lavoro.

La piattaforma Sequenom è ottimale per testare lo stato di metilazione di vaste regioni del promotore di geni con alterati pattern di espressione.

2. Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Questa tecnologia utilizza la strumentazione Wave Transgenomic ed è basata su una particolare applicazione di tecniche cromatografiche. La strumentazione consta di un campionatore, una colonna cromatografica specifica, un forno elettronico, un miscelatore di reagenti, un detector UV, un detector fluorescente e un collettore di frazioni.

Le attività che il CRBA può offrire in service utilizzando questa tecnologia sono le seguenti:

2.1 Screening di varianti del DNA

Con la strumentazione DHPLC, utilizzando il principio di formazione degli eteroduplici, è possibile effettuare uno screening di frammenti di DNA di 300-400 bp, preventivamente amplificati con PCR, prevedendo la presenza di varianti quali mutazioni, SNPs, piccole delezioni o inserzioni.

La positività del test richiede la successiva caratterizzazione della variante mediante analisi di sequenza.

2.2 Separazione e collezione di frammenti

Questa tecnologia consente di separare frammenti di DNA in base alla loro diversa dimensione e di raccogliere mediante collettore di frazioni i picchi di eluizione di interesse. I frammenti raccolti possono successivamente essere sottoposti a sequenziamento.

3. Sequenziatore di DNA

Al CRBA è presente un sequenziatore automatico di DNA CEQ8000 Beckman, con 8 capillari. Lo strumento consente di eseguire le seguenti attività:

3.1 Analisi di sequenza

Consente il sequenziamento di frammenti di 500-600 bp di DNA. La processività della tecnologia è di 96 sequenze in 12 ore.

3.2 Analisi di frammenti

E' possibile determinare la dimensione e la quantità di frammenti marcati con differenti fluoro cromi da 20 a 800 bp. L'analisi di frammenti consente numerosi applicazioni, quali lo studio di microsatelliti, analisi di LOH, analisi di linkage, identificazione di delezioni/inserzioni, analisi di contaminazione materno-fetale, studio di eterozigosità, ecc.

4. Citometro a flusso

Il citometro a flusso FACS Aria Becton- Dickinson è disponibile al CRBA per effettuare le seguenti attività:

4.1 Analisi di citometria a flusso

4.2 Cell sorting

5. Microscopia a Dissezione Laser

Il CRA dispone di un Microscopio a Dissezione Laser Nikon che consente di isolare mediante osservazione microscopica video-assistita piccole aree o singole cellule da sezioni istologiche, utilizzabili per ulteriori analisi. In questo modo possono essere studiati DNA, RNA e proteine di campioni omogenei, privi di contaminanti.