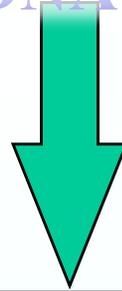


TESSUTI FISSATI-ESTRAZIONE DI PROTEINE



Da sezioni in bianco di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Gli estratti possono essere impiegati per western blot or protein arrays.

Dopo la deparaffinizzazione, le sezioni vengono
➡ incubate in un tampone di estrazione a due T ≠ in modo tale da rendere reversibili i legami crociati della formalina e liberare le proteine.

STEPS

- ⇒ Taglio delle sezioni- massimo 3 di 10 μm e una superficie di 100 mm^2 .
- ⇒ Deparaffinizzazione e 3 lavaggi con EtOH: 100, 96 o 90%, 70%

Estrazione



100 μl di tampone

1. 100°C per 20 min.
2. 80°C per 2 h sotto agitazione.
3. 4°C per 1 min .
4. Centrifugare per 15 min @ 14,000 x g at 4°C. Recuperare il spn contenente l'estratto proteico.

Problematiche

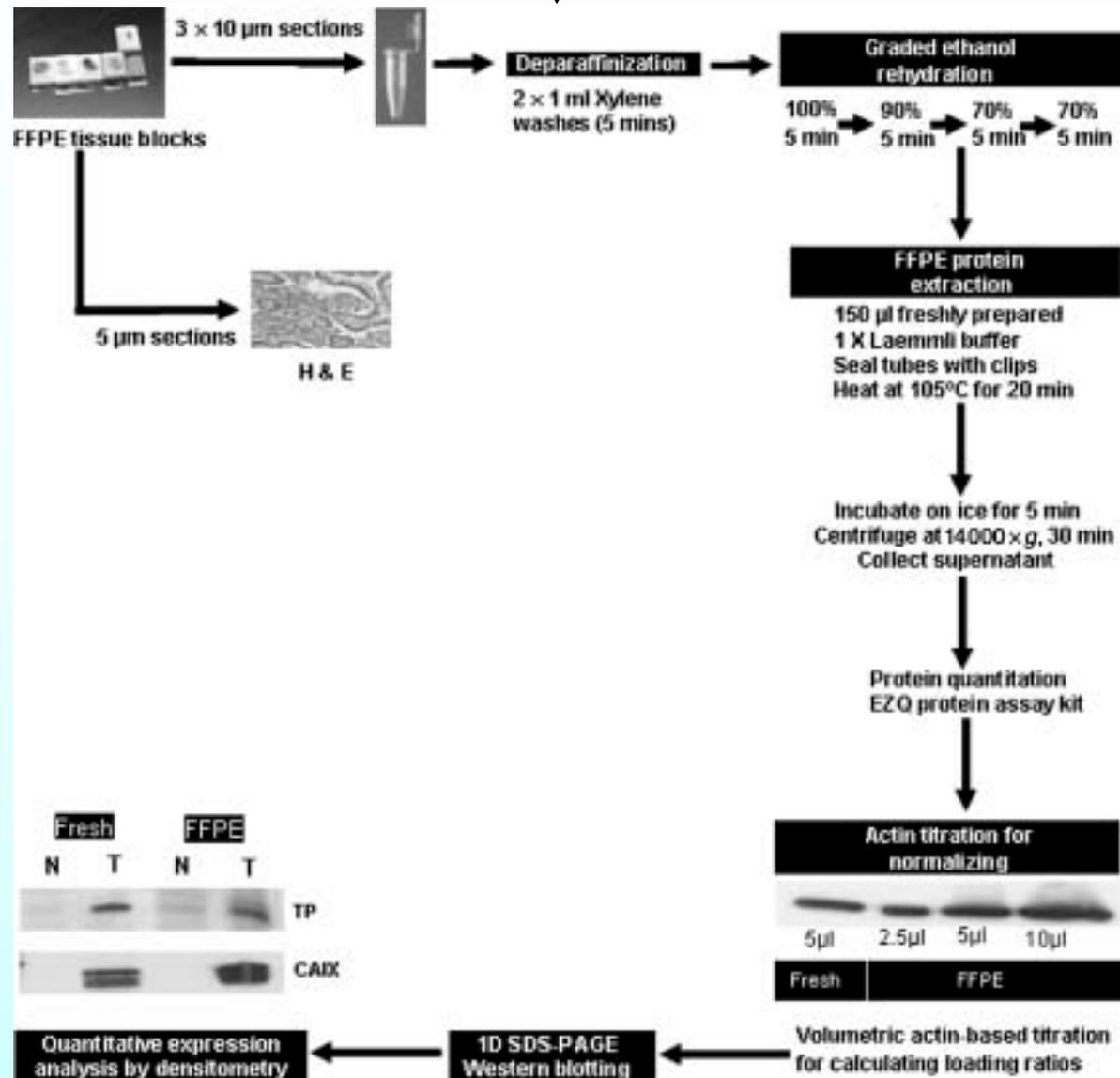
Bassa resa

- a) Scarsa qualità del materiale di partenza: fissazione superiore alle 24 h o conservazione per periodi troppo lunghi possono portare ad un'estrazione incompleta
- b) Poco materiale di partenza
- c) Deparaffinizzazione incompleta o troppa paraffina nel campione. Rimozione difficile da sezioni spesse.

TESSUTI FISSATI IN FORMALINA

ESTRAZIONE DI PROTEINE

J Pathol 2009; 217:497-506.



STEPS

⇒ Taglio delle sezioni- 3 di 10 μm e una superficie di 25 mm^2 ciascuna.

⇒ Deparaffinizzazione xilene (1 ml per 5 min, 2 x) e 3 lavaggi con EtOH: 100, 90 e 70%, 5 min ciascuno

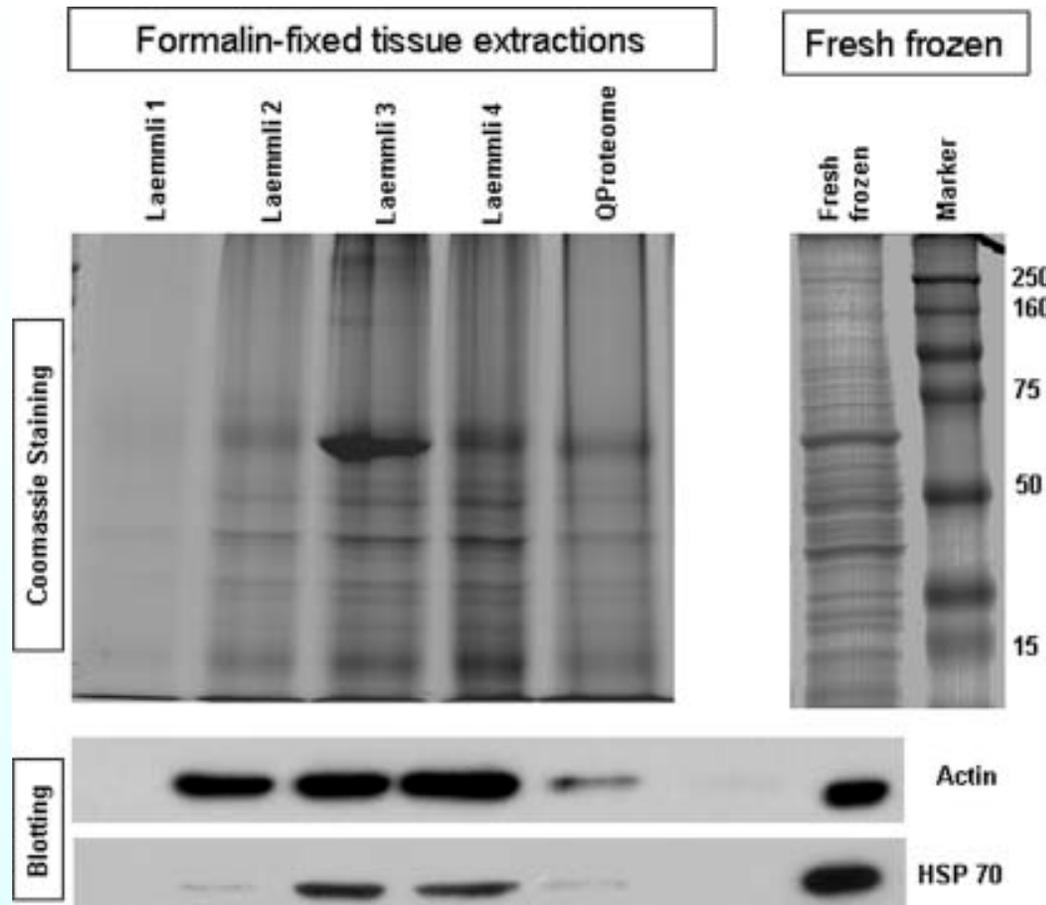
Estrazione



150 μl di tampone Laemmli: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 20% (v/v) glicerolo; 4% (v/v) β -mercaptoetanol (aggiungere prima dell'uso)

1. 105°C per 20 min.
2. Ghiaccio per 5 min .
3. Centrifugare per 30 min @ 14,000 x g at 4°C. Recuperare il spn contenente l'estratto proteico e conservare a -20° C.

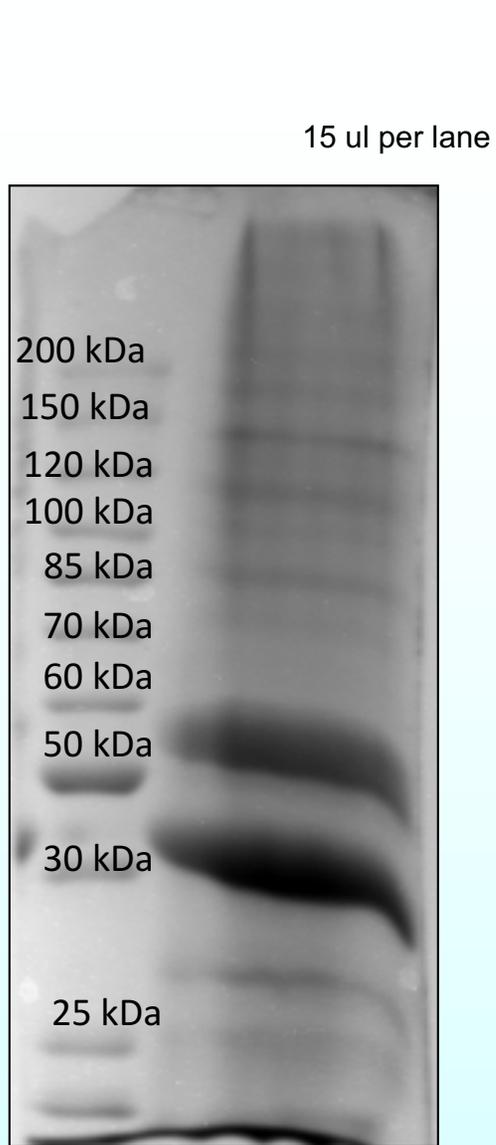
Confronto Qproteome-Protocollo Laemmli



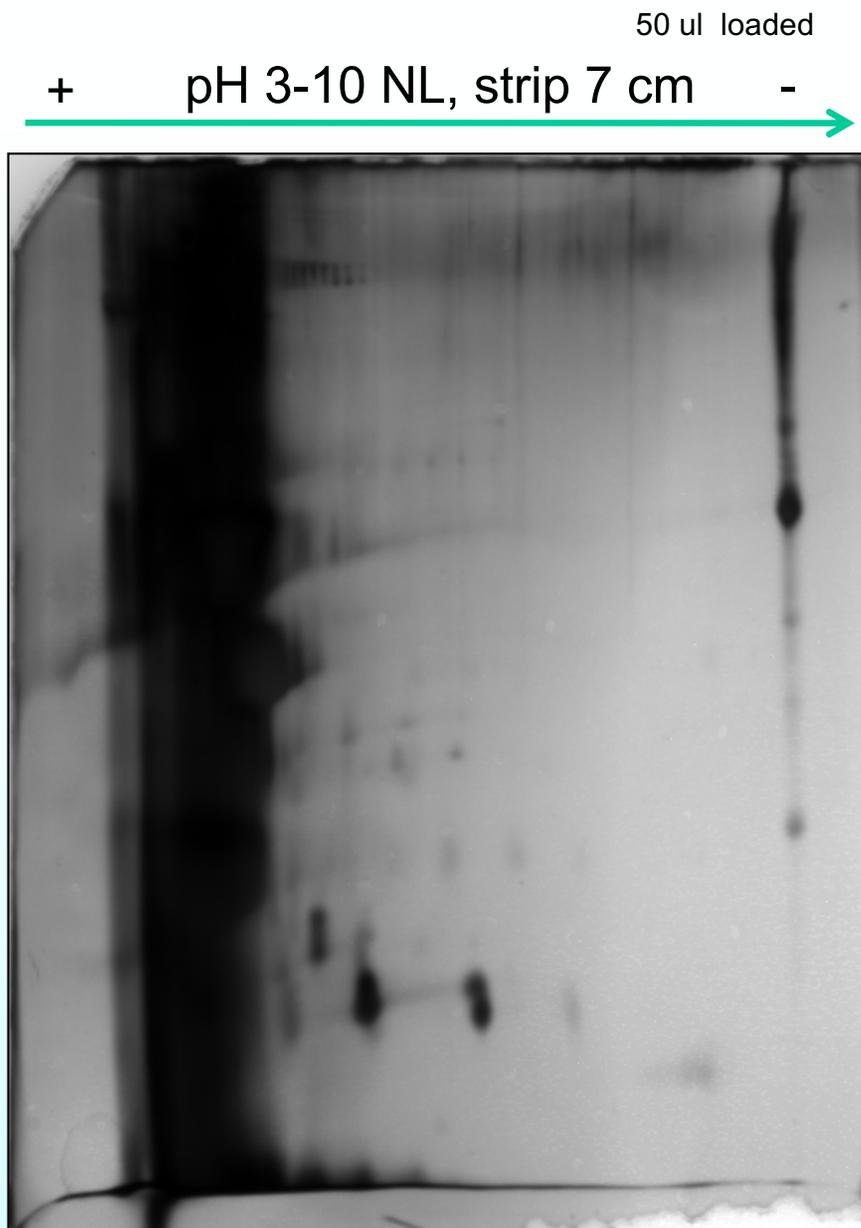
Laemmli 1: no boiling; **Laemmli 2:** 105° C 10 min; **Laemmli 3:** 105° C 20 min; **Laemmli 4:** 105° C 20 min, 80° C 20 min; **QProteome:** 100° C 20 min, 80° C 2h.

Protocollo estrattivo per tessuti fissati in fissativi alcolici (RCL-2; FineFix) versione modificata*

- **3 x10 μ m sezioni in bianco**
- **Deparaffinizzazione** (2x xilene, 1 ethanol 100%, 1 ethanol 96%, 1 70%)
- **Risospendere il pellet in 100 μ l buffer estrattivo** (50 mM Tris-HCl pH7.5, 7M UREA, 2M THIOUREA, 2% CHAPS, 1% MEGA, 0.5% TRITON X-100, 1% OGP AND 50 MM DTT) con inibitori di proteasi
- **vortexare**
- **15' ghiaccio + 20' 99° C + 1h 80° C**
- **Centrifugare @ max velocità per 15min @4° C**

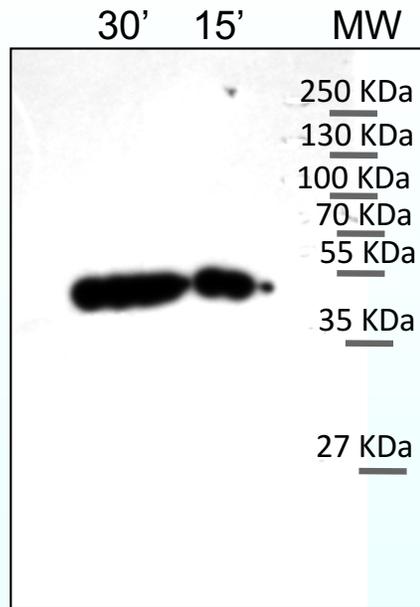


Coomassie Staining



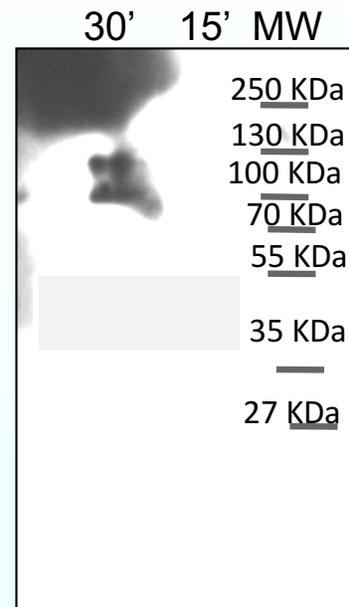
Silver Staining

Western blot analyses



β -actin (42kDa)

5" exposure

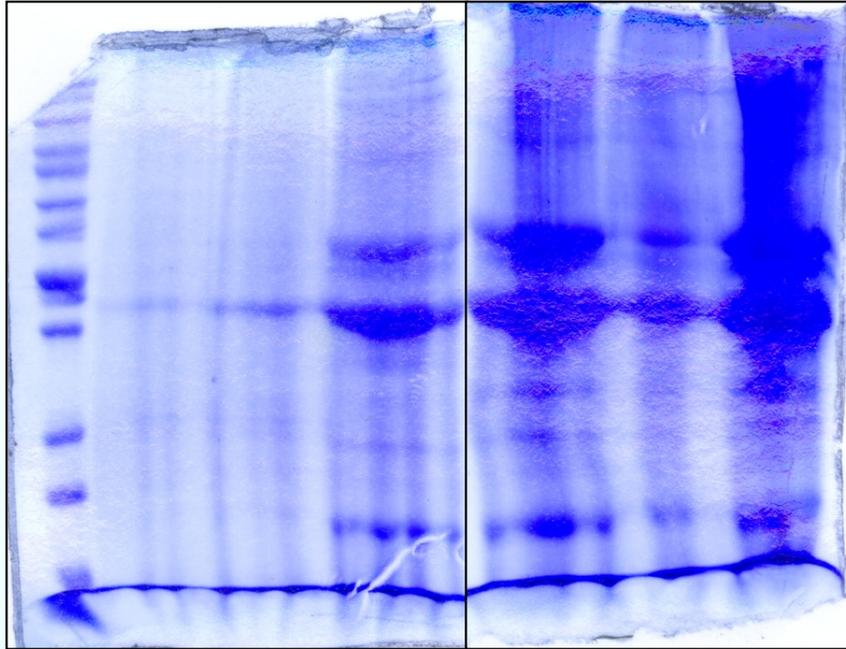


HER2(182kDa)

10" exposure

Note: 30': after 15' in ice, the sample was boiled for 30'
15': after 15' in ice, the sample was boiled for 15'

Mw 1 2 3 4 5 6



- 1 #6666 DW FX ISOPROPANOLO (20' 99° C)
- 2 #6557 BL28 FXD ISOPROPANOLO (20' 99° C)
- 3 #12205 BL14 FX JFC (20' 99° C)
- 4 #12776 FX JFC (20' 99° C)
- 5 #8467 RCL2 4C (15' ice + 20' 99° C)
- 6 #12776 FX JFC (15' ICE + 20' 99° C + 1h 80° C)