

Esercitazione giugno 2021.601626

SDS-PAGE

- 1a. allestire la cameretta (mettere del tampone di corsa, montare il gel facendo attenzione alle bolle e aggiungere ulteriore tampone di corsa fino a coprire i pozzetti del gel)
- 1b. preparare i campioni da caricare (uno a studente) in una provetta aggiungendo, a 14 microlitri di acqua, 1 microlitro di campione e 5 microlitri di loading buffer. Riscaldare i campioni per 5 minuti.

2. Caricare i campioni (16 microlitri del campione riscaldato)

3. Collegare l'alimentatore e far partire la corsa impostando 80V

4. Portare a 120V dopo che il blu di bromofenolo ha superato lo "stacking gel"

5. Fermare la corsa quando il blu di bromofenolo ha quasi raggiunto il termine del "running gel" e dis-assemblare la cameretta.

6. Recuperare il gel ed eliminare lo "stacking" (utilizzare i guanti e fare attenzione a non romperlo)

WESTER BLOT

1a. tagliare 6 pezzi di materiale assorbente delle dimensioni del gel (8,5 x 6 cm - utilizzare i guanti). Calcolare l'area del rettangolo tagliato.

1b. tagliare 3 pezzi di nitrato di cellulosa delle dimensioni del gel

1c. tagliare 1 lucido contenete 3 rettangoli delle dimensioni del gel

1d. preparare una soluzione di latte scremato al 4% in peso in PBS.

2. allestire la camera di trasferimento con il metodo semi-dry:

- appoggiare il lucido

- costruire un sandwich appoggiando 1 pezzo di materiale assorbente imbevuto di tampone di trasferimento, nitrato di cellulosa, gel, materiale assorbente imbevuto di tampone di trasferimento (usare i guanti ed evitare le bolle)

- mettere il coperchio bagnato con il tampone di trasferimento

3. Collegare l'alimentatore e far partire la corsa. Impostare 0,8mA ogni cm² di gel da trasferire.

4. Aspettare 20 minuti per il termine del trasferimento

5. Smontare la cameretta e conservare il nitrato di cellulosa

6. mettere il nitrato di cellulosa in Rosso Ponceau (soluzione pronta) fino alla comparsa delle bande