

PROTEOMICA con Laboratorio

Maggio 2024

Prof. Riccardo Sgarra

PREMESSA

L'obiettivo di questo laboratorio è trasportare nella pratica alcuni aspetti teorici trattati a lezione.

In particolare:

- 1) Preparazione del campione - Lisi di cellule in coltura mediante SDS-lysis buffer
- 2) Quantificazione del lisato proteico mediante metodi spettrofotometri indiretti (Bradford, BCA, Lowry) e un metodo spettrofluorimetrico diretto (Fluorescenza del Trp) e relativa comparazione dei risultati ottenuti.
- 3) Verifica della normalizzazione mediante SDS-PAGE e colorazione con Blue Coomassie
- 4) Analisi di western blot per il controllo dei livelli di espressione di una serie di proteine.

Questa semplice serie di esperimenti rappresenta una classica procedura di controllo di un sistema biologico nel momento in cui su di esso vengono effettuate delle “alterazioni”.

Nel caso specifico, il nostro sistema biologico verrà modificato andando a silenziare una specifica proteina mediante trasfezione con dei siRNA.

Prima di procedere a qualsiasi indagine (funzionale/proteomica/trascrittomica/altro) su questo modello cellulare è necessario verificare che il sistema biologico abbia risposto correttamente alla modifica messa in atto. Risulta facilmente comprensibile quindi come questa procedura sia largamente diffusa nelle diverse realtà laboratoriali.

Esperimento 1: Lisi cellulare

PROCEDURA

1. PREPARAZIONE DEL LISATO CELLULARE

1. Rimuovere attentamente il terreno di crescita (il siero contiene protein concentrate): bisogna ottenere un lisato trasparente, non una soluzione rosa! Lavare le cellule direttamente nel piattino due volte con PBS e aspirare senza disturbare lo strato di cellule;
2. Lisare le cellule. Aggiungere 200 μ l di Lysis Buffer SDS direttamente sulle cellule. Raccogliere attentamente le cellule con uno scraper e trasferire il lisato in una eppendorf da 1.5 ml;
3. Rompere il DNA passando il lisato attraverso l'ago di una siringa da insulina 29G (10 volte attraverso l'ago);
4. Bollire i campioni a 95°C per 5 minuti prima di procedere con la quantificazione e successiva analisi in SDS-PAGE.

2. PROTEIN QUANTIFICATION OF CELL LYSATES

NB: ciascun metodo di quantificazione ha una sensibilità diversa pertanto richiede l'utilizzo di diluizioni specifiche del campione da analizzare e della proteina per la costruzione della curva di calibrazione.

Il campione incognito ha una concentrazione non nota, ma nel caso di lisati proteici che derivano da un numero "noto" di cellule si può considerare una stima grossolana del quantitativo a disposizione sulla base dell'esperienza accumulata.

Bradford

Il reagente di Bradford può essere utilizzato per determinare la concentrazione di proteine in soluzione. La procedura si basa sulla formazione di un complesso tra il colorante, Brilliant Blue G, e le proteine in soluzione. Il complesso proteina-colorante causa uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 a 595 nm. La quantità di assorbimento è proporzionale alla quantità di proteina presente. Il range di concentrazione lineare è compreso tra 0.1 e 1.4 mg/ml di proteina, utilizzando BSA (albumina sierica bovina) come proteina standard. Il reagente di Bradford è compatibile con agenti riducenti. Gli agenti riducenti sono spesso utilizzati per stabilizzare le proteine in soluzione. Altre procedure di analisi delle proteine (Lowry e BCA) non sono compatibili con agenti riducenti. Il reagente di Bradford dovrebbe essere utilizzato al posto di queste analisi delle proteine se sono presenti agenti riducenti. Tuttavia, il reagente di Bradford è compatibile solo con basse concentrazioni di detergenti. Se il campione proteico da analizzare contiene detergenti nel tampone, si consiglia di utilizzare la procedura di determinazione delle proteine BCA.

1. Aggiungere 5 μ l della curva standard e dei campioni da quantificare nei pozzetti della 96-well. Per il bianco, usare 5 μ l di buffer. (punti a concentrazione nota!)
2. Aggiungere 250 μ l di reagente di Bradford e mixare su agitatore per 30 sec.
3. Lasciare incubare per 5-45 min.
4. Misurare l'assorbanza a 595 nm. Il complesso proteina-colorante è stabile per 60 min.

5. Plottare l'assorbanza e la concentrazione dei campioni standard ed interpolare la curva per ottenere la concentrazione dei campioni ignoti.

BCA

La quantificazione colorimetrica basata sull'acido bicinchoninico (BCA) per la rilevazione delle proteine totali combina la nota riduzione del Cu^{2+} a Cu^{1+} dalle proteine in un mezzo alcalino (la reazione di biureto) con la rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione cuproso (Cu^{1+}) utilizzando un reagente unico contenente acido bicinchoninico. Il prodotto di reazione di questo test, colorato di viola, è formato dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione cuproso. Questo complesso idrosolubile mostra un'assorbanza forte a 562 nm che è quasi lineare con l'aumento delle concentrazioni proteiche su un ampio intervallo di lavoro (20–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

1. Preparare la working reagent (WR) miscelando 50 parti del reagente A e 1 parte del reagente B. Saranno necessari 200 μl per ciascun pozzetto che si vuole allestire.
2. Aggiungere 25 μl della curva standard e dei campioni da quantificare nei pozzetti della 96-well. Per il bianco, usare 25 μl di buffer.
3. Aggiungere 200 μl di WR e mixare su agitatore per 30 sec.
4. Chiudere la piastra con stagnola e incubare a 37°C per 30 min.
5. Misurare l'assorbanza a 562 nm.
6. Plottare l'assorbanza e la concentrazione dei campioni standard ed interpolare la curva per ottenere la concentrazione dei campioni ignoti.

Lowry

La procedura coinvolge la reazione delle proteine con solfato rameico e tartrato in una soluzione alcalina, che porta alla formazione di complessi proteina-rame tetradentati. Quando viene aggiunto il Reagente di Folin-Ciocalteu, viene efficacemente ridotto in proporzione a questi complessi di rame chelati, producendo un prodotto idrosolubile il cui colore blu può essere misurato a 750 nm.

1. Aggiungere 40 μl della curva standard e dei campioni da quantificare nei pozzetti della 96-well. Per il bianco, usare 40 μl di buffer.
2. Aggiungere 200 μl di reagente di Lowry e mixare su agitatore per 30 sec.
3. Incubare a RT per esattamente 10 min.
4. Aggiungere 200 μl di reagente di Folin-Ciocalteu 1X e mixare su agitatore per 30 sec.
5. Incubare a RT per 30 min.
6. Misurare l'assorbanza a 750 nm.
7. Plottare l'assorbanza e la concentrazione dei campioni standard ed interpolare la curva per ottenere la concentrazione dei campioni ignoti.

3. SDS-PAGE di controllo della normalizzazione proteica.

1. Usare un gel precast di poliacrilammide all'opportuna percentuale per risolvere al meglio le protein di interesse a seconda del loro peso molecolare. Il gel a disposizione è un gel in gradiente 8-16%.
2. Montare e riempire l'apparato elettroforetico con running buffer 1X seguendo le istruzioni. RICORDARSI di togliere la linguetta adesiva sul fondo del gel!

- Caricare i campioni nei pozzetti del gel. Includere un marker di pesi molecolari nella prima lane. Il volume di campione da caricare dipenderà dalle quantificazioni effettuate in precedenza in modo da caricare la stessa quantità proteica.

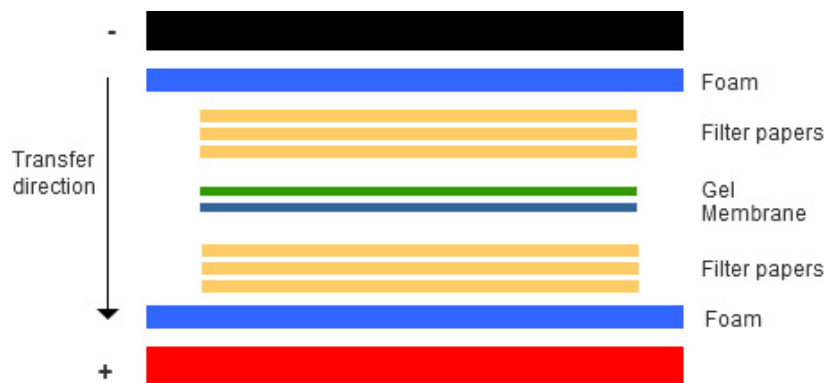
| Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Sample | MW | | | | | | | | | |
| µl | 2 | | | | | | | | | |
| µg | | | | | | | | | | |

- Correre il gel secondo le istruzioni del produttore.
- Colorare il gel con BC over night.
- Il giorno seguente decolorare il gel in 10% acido acetico.
- La normalizzazione dell'estratto proteico totale verrà valutata attraverso densitometria (ved. protocollo ImageJ).

4. Analisi di Western Blot

Correre un gel SDS come il precedente

- Le protein saranno trasferite su una membrana di nitrocellulose usando un sistema semi-dry. Assemblare come segue:



- Le proteine saranno trasferite come da indicazioni del produttore.

Dopo che le proteine sono state trasferite sulla membrana, questa verrà bloccata, incubata con l'anticorpo primario, lavata, incubata con l'anticorpo secondario e lavata nuovamente. L'anticorpo primario è specifico per la proteina d'interesse, mentre l'anticorpo secondario permette la visualizzazione del primario. L'anticorpo secondario è coniugato con un enzima, come la perossidasi di rafano (HRP) per la successiva visualizzazione.

- Colorare la membrana con **Rosso Ponceau** per 5 minuti per visualizzare le bande proteiche e confermare il trasferimento. A questo punto sarà possibile acquisire un'immagine per la determinazione della quantità proteica e verifica della normalizzazione.

4. Lavare il Ponceau con PBS fino a che la membrana torna chiara.
5. Incubare la membrana in blocking solution (BS) per **1h** a temperatura ambiente su agitatore.
6. Diluire 1:1000 l'anticorpo primario in BS (la concentrazione dell'anticorpo dipenderà dalle specifiche indicate da casa produttrice).
7. Incubare la membrana con l'anticorpo primario per **1h** su agitatore (anche in questo caso le modalità di incubazione -tempo e temperatura - sono solitamente indicate da casa madre).
8. Lavare tre volte con **5 ml** di BS per 5 min su agitatore.
9. Diluire 1:5000 l'anticorpo secondario in BS (la concentrazione dell'anticorpo dipenderà dalle specifiche indicate da casa produttrice).
10. Incubare la membrana con l'anticorpo secondario per **30 min** su agitatore.
11. Lavare tre volte con **5 ml** di BS per 5 min su agitatore. Lavare una volta con **5 ml** di PBS.
12. Rimuovere il PBS e aggiungerne **5 ml** di nuovo.
13. Preparare il foglio protettivo di plastica.
14. **Mixare la soluzione A e B del kit ECL⁺ in rapporto 1:1 (a seconda del diverso tipo di substrato utilizzato la preparazione della soluzione potrebbe cambiare).**
15. Incubare la membrana con il substrato per **3 min**.
16. Visualizzare la luminescenza usando il ChemiDoc.