

ESPERIENZA SDS-PAGE e WESTERN BLOT (parte seconda): sviluppo del western-blot

Materiale e reagenti:

- 1 tubo con tappo verde con 5 mL di soluzione saturante (**saturante**)
- 1 tubo da 15 mL tappo rosso con **5 mL di soluzione saturante con anti-citocromo c** (Santa Cruz Biotechnology, INC;) (dil. 1:1000) (**marcata Ab1**)
- 1 tubo da 15 mL con **10 mL di soluzione saturante con goat anti-mouse IgG peroxidase conjugated** (Merck,) (dil 1:40000) (**marcata Ab2**)
- 1 tubo falcon con **50 mL soluzione di lavaggio** (**marcata soluzione di lavaggio**)
- Pasteur di plastica
- P1000; P200; P20
- 1 vaschetta per incubare membrana
- 1 becker per raccogliere lavaggi

Soluzione saturante (1): PBS 1X

0,1 % v/V Tween 20

4% m/V BSA (bovin serum albumin)

Soluzione di lavaggio (2): PBS 1X

0,1 % v/V Tween 20

Substrato per perossidasi: LiteAblot EXTEND (Euroclone)

PROCEDIMENTO

1) Aspirate con la pasteur di plastica la soluzione saturante e mettetela nuovamente nel tubo di plastica.

2) Aggiungete sulla membrana 5 mL di **Ab1** e lasciate incubare per 1h in agitazione

Nel frattempo:.... Applicazione di SDS-PAGE
--

Passata l'ora di incubazione:

3) Aiutandovi con la Pasteur, aspirate la soluzione e inseritela nuovamente nella Falcon (**Ab1**)

NB. La soluzione con l'AB può essere riutilizzata diverse volte prima di scartarla

- 4) Aggiungete 8 mL di **soluzione di lavaggio** e lasciate in agitazione 5 min.
5) Aspirate la soluzione e buttatela nel becker di scarto

Ripetete punti 4 e 5 altre 2 volte

- 6) Aggiungete 8 mL della soluzione **Ab2** e lasciate incubare per 45 min in agitazione

D.1 Perché prima di incubare la membrana con gli anticorpi l'avete messa a contatto con la soluzione saturante?

D2. Perché si utilizza la soluzione saturante anche per diluire gli anticorpi?

D3. Vi ho detto a lezione che utilizzando la centrifugazione differenziale, non è possibile ottenere una frazione mitocondriale pura. Come fareste per mettere in evidenza eventuali frazioni contaminanti utilizzando sempre la tecnica del western blot?

Passato il tempo di incubazione:

- 7) Aiutandovi con la Pasteur, aspirate la soluzione e inseritela nuovamente nella Falcon (**Ab2**)
- 8) Aggiungete 5 mL di **soluzione di lavaggio** e lasciate in agitazione 5 min.
- 9) Aspirate la soluzione e buttatela nel becker di scarto
- 10) Ripetete punti 8 e 9 altre 2 volte

Aggiungete un po' di **soluzione di lavaggio** per mantenere bagnata la membrana e portatela vicino al sistema di Imaging

Prepareremo le membrane tutte insieme per la visualizzazione

Utilizzeremo una soluzione costituita da una substrato chemiluminescente

LiteAblot EXTEND (euroclone):

2 soluzioni da mescolare 1:1 soluzione A: luminolo (fotosensibile)
soluzione B: soluzione perossido

700 uL soluzione A + 700 uL soluzione B: si aggiunge goccia a goccia su tutta la superficie della membrana, si lascia agire al buio nell'imager e poi si cattura l'immagine

D.4 Che risultato abbiamo ottenuto?

E' possibile vedere un segnale nel campione di controllo? Questo dato è importante? Perché?

Si vede il cyt.c nella frazione mitocondriale?

C'è contaminazione mitocondriale anche nell'SN2?