

ESPERIENZA SDS-PAGE e WESTERN BLOT (parte prima)

Obiettivo dell'esperienza è quello di separare una miscela di proteine in un gel di acrilammide mediante una SDS-PAGE in condizioni denaturanti e successivamente trasferire le proteine separate su una membrana di nitrocellulosa.

MATERIALE:

- i campioni di SN2 e MT
- 1 eppendorf con 30 μ L di campione di controllo (0,4 mg/mL citocromo c, 12 kDa; 0,2 mg/mL albumina bovina, 66.5 kDa) (1 ogni gruppo)(CTRL)
- 1 eppendorf con acqua distillata
- 4 eppendorf vuote da 0,5 mL
- 1 eppendorf con Miscela di standard proteici colorati (1 per tutti, la trovate nel bancone vicino ai gel)
- 1 eppendorf con il **Laemmli sample buffer 5X** (1 per gruppo):
- 1 Bottiglia con 1L di **RUNNING Buffer 1X** (1 ogni 3 gruppi):
 - 0,025 M Tris
 - 0,192 M Glicina
 - 0,1 % m/V SDS
- 1 tubo falcon da 50 mL con il **GIOTTO ProBlue Safe Stain®** (1X)(1 ogni 3 gruppi) (<https://www.giottobiotech.com/prodotto/problue-safe-stain/>)
- 1 tubo falcon da 50 mL con **rosso Ponceau** (1X) (1 ogni 3 gruppi):
 - 0.1% m/V Ponceau S
 - 5% v/V acido acetico
- Confezione di Mini-PROTEAN precast gels (2 ogni 3 gruppi)
- Confezione di transblot turbo transfer pack (1 ogni 3 gruppi)
- Scatoletta di plastica

PROCEDIMENTO:

- 1) Prendete i vostri campioni dal ghiaccio (SN2 e mitocondri (MT)). Leggete il file che vi avevo messo in moodle per seguire i passaggi di diluizione e preparazione della mix di caricamento. Seguite le istruzioni e i dati presenti nelle tabelle 2 e 3.

D1. A cosa serve il sample buffer??

- ~~2) Prendete il campione di controllo e preparate 2 eppendorf nel seguente modo:~~

~~**C1 o epp. 1:** 20 μ L di campione + 5 μ L di sample buffer~~

~~**C2 o epp. 2:** 5 μ L di campione + 15 μ L di acqua + 5 μ L di sample buffer~~

~~Nella relazione dovrete indicare quale quantità di cit. c e albumina vengono caricate nei due casi.~~

- 3) Mettete a scaldare tutti campioni preparati a 95-100°C per 5 minuti in un bagnetto preriscaldato.

D2. A cosa serve questo passaggio?

Da qui lavorate insieme con gli altri gruppi, il docente e il tutor (spostatevi sulla 4 bancata):

- 4) I gel verranno estratti dalla confezione come mostrato nel file "materiale per esperienza Lab. EF e lab.WB 2025-26.pdf " che trovate in moodle.

E' necessario ora togliere la strip di carta posta sotto il gel (pag. 5)

- 5) I due gel saranno inseriti nell'apposito supporto (utilizzate i supporti con gli spinotti per gli elettrodi) (pag 6).
- 6) Si allestisce la cameretta inserendo il modulo elettroforetico appena montato dentro al contenitore di corsa (ci sono due possibili alloggiamenti, è necessario controllare di inserirlo nella giusta posizione)
- 7) Si aggiunge il running buffer 1X all'interno dello spazio tra i vetri fino a coprire i pozzetti e nel contenitore di corsa fino al raggiungimento del corretto livello (2 gel).
- 8) Si toglie il pettine facendo attenzione a non danneggiare il gel.

Dovrete caricare i campioni e i controlli SU ENTRAMBI I GEL

9) Utilizzando una P20 prelevate 15 μ L del primo campione, posizionate il puntale sul vetro appena sopra il pozzetto e fate scendere il campione. Assicuratevi di caricarlo tra i due vetri e non al di fuori. 3 campioni per gruppo (CONTR (10 μ L), SN2 (15 μ L) e MT (15 μ L)) e 3 gruppi per ogni gel.

NB. In un gel caricate il C1, mentre nell'altro C2. Il gel con tutti i C1 alla fine sarà colorato, mentre quello con tutti i C2 invece verrà trasferito.

D3. Perché aggiungiamo un campione di controllo?

10) In un pozzetto caricate anche 3 μ L di standard di peso molecolare.

D4. Quale scopo ha caricare dei marker di peso molecolare?

11) Si imposta la corsa: 200 V (controllate il valore della corrente all'inizio della corsa)

12) Si chiude con il coperchio e si avvia la corsa premendo START

La corsa va fermata quando il fronte (rappresentato dal blu di bromofenolo) raggiunge la linea indicata sulla parte bassa del vetro.

Per essere sicuri che la corsa sia avviata, controllate all'interno della cella elettroforetica, che vi sia produzione di bolle.

D5. Qual è l'origine delle bolle all'anodo e al catodo?

Mentre il gel corre:
rispondete alle domande

Finita la corsa, si spegne l'alimentatore

13) Si prende il pack di trasferimento: ogni sandwich è preparato in modo da essere inserito nel transblottatore in modo ben specifico (UP-DOWN). Una delle due metà contiene anche la membrana di nitrocellulosa

D6. Perché è importante seguire il corretto verso di caricamento?

14) Si prende il supporto con i gel e si smonta 1 come da immagine nel file “materiale per esperienza lab. EF e lab. WB 2025-26.pdf” (pag. 8) (l'altro tenetelo da parte chiuso).

15) Si Mette la metà del sandwich sulla piastra del trans-blot in modo che la membrana sia rivolta verso l'alto (pag. 11)

16) Delicatamente si trasferisce il gel sulla membrana in modo che combaci perfettamente

17) Si appoggia sopra al gel l'altra metà del sandwich e con il roller si fa fuoriuscire eventuali bolle

18) Si chiude il coperchio e lo si inserisce nell'apposito alloggiamento e si fa partire il trasferimento.

Lasciemo 4-5 min a 1,3 Ampere

19) Alla fine del trasferimento si apre la scatola, si apre il sandwich e si mettono la membrana a colorare in rosso ponceau 5 -10 min e il gel in mQ (andrà colorato successivamente insieme all'altro gel)

20) La membrana può essere decolorata in acqua fino allo schiarimento del fondo e l'evidenziazione delle bande (**fotografatela**).

Viene tagliata ora la membrana in modo che ogni gruppo abbia il pezzo con i propri campioni (Ricordatevi di segnare la membrana in modo che sia riconoscibile la superficie su cui sono state trasferite le proteine, per es. tagliate angolo in alto a dx).

21) Mettete la membrana nella scatoletta che trovate sulla vostra postazione e aggiungete qualche mL di soluzione saturante prima che si asciughi.

Mentre la membrana si satura, si apre il secondo gel e lo si trasferisce in una nuova vaschetta riempita con dell'acqua (è necessario fare attenzione a non romperlo trasferendolo)

22) Le vaschette con i gel (anche quella preparata al p.to 20) vanno messe 60-90 sec in forno a microonde (il solvente deve iniziare a bollire)

23) Si butta l'acqua e si aggiunge il colorante GIOTTO ProBlue Safe prima di mettere 45 sec in microonde. Si tira fuori la scatola e si lascia agire per 10 min.

D6. Perché abbiamo colorato anche il gel utilizzato per il trasferimento?

D7. Perché si colora la membrana?

NB. La soluzione colorante può essere nuovamente trasferita nella falcon ed essere riutilizzata più volte.

NB. Per decolorare il fondo del gel e mettere in rilievo le bande proteiche è necessario attuare diversi passaggi di riscaldamento del gel in acqua e di sostituzione del solvente.

Fotografate i gel

Nella relazione dovrete inserire i calcoli e i valori di μg di proteine caricati per i tre campioni. Dovrete spiegare che tipo di elettroforesi è stata effettuata e quali sono le specifiche caratteristiche di questa tecnica. Dovrete

indicare perché si è deciso di colorare entrambi i gel e la membrana e quali informazioni è possibile ricavarne e se tali informazioni possono essere importanti ai fini del risultato. Nella scrittura della relazione potrete aiutarvi rispondendo alle domande che trovate inserite nel protocollo.

SOLUZIONI:

Laemmli sample buffer 5X

0,3125 M Tris/HCl pH 6.8

5% m/V SDS

50% v/V glicerolo

25% v/V β -mercatoetanolo

0.025 % m/V Blu di bromofenolo

RUNNING Buffer 1X

0,025 M Tris

0,192 M Glicina

0,1 % m/V SDS

Rosso Ponceau (1X)

0.1% m/V Ponceau S

5% v/V acido acetico

Miscela di Standard proteici colorati

