Corso di Laurea in Biotecnologie
Insegnamento di Biochimica e Biochimica Analitica
Dipartimento di Biotecnologie – Università degli Studi di Verona
Anno Accademico 2017-2018

Biochimica Analitica

Esperienze di Laboratorio

Alessandra Astegno

INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo laboratorio di Biochimica Analitica è quello di apprendere i principali metodi per l'analisi delle proteine.

Le esperienze di laboratorio saranno le seguenti:

1. Determinazione della concentrazione di una proteina incognita tramite assorbimento a 280 nm e tramite metodo colorimetrico Bradford.
2. Determinazione dei parametri cinetici, costante di Michaelis-Menten, numero di turnover, e costante di inibizione dell'enzima fosfatasi acida utilizzando il metodo di linearizzazione grafica di Lineweaver-Burk.
3. Determinazione dello spettro d'assorbimento del coenzima piridinico NADH (forma ridotta) e determinazione del coefficiente di estinzione molare del NADPH.
4. Determinazione del peso molecolare di una proteina incognita mediante cromatografia ad esclusione molecolare.
5. Separazione di proteine mediante elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) seguita dalla visualizzazione delle bande mediante colorazione con Blu di Comassie
6. Trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa mediante elettroblotting seguita da immunorivelazione delle proteine per l'identificazione di una o più proteina sfruttando la specificità di legame con un anticorpo (WESTERN BLOT).

Di seguito lo studente troverà i protocolli delle singole esperienze preceduti da alcuni richiami teorici relativi al particolare principio sfruttato e/o tecnica utilizzata.

PRIMA ESERCITAZIONE: **DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA**

1^ PARTE**: SPETTROSCOPIA UV (lettura dell'assorbanza a 280 nm)**

L'assorbimento nella regione dell'ultravioletto è un valido e veloce metodo per determinare la concentrazione di una proteina pura, e non di una miscela, di cui si conosce la sequenza aminoacidica. Nel vicino UV, a λ= 280 nm, assorbono gli aminoacidi aromatici, triptofano, tirosina e in misura minore la fenilalanina.
L'intensità di assorbimento ad una certa lunghezza d'onda permette di ricavare informazioni di tipo quantitativo. L'assorbanza è definita come:

$$A=\log I_0/I$$

dove I_0 = intensità della luce che colpisce il campione

I = intensità della luce trasmessa dal campione

Secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della soluzione analizzata:

$$\mathbf{A= \varepsilon bc}$$

dove b = cammino ottico espresso in cm

ε = coefficiente di estinzione molare, definito come l'assorbanza di una soluzione 1 M della sostanza in esame ad una data lunghezza d'onda, usando un cammino ottico di 1cm.

MATERIALE

- cuvette di quarzo
- acqua deionizzata
- tre soluzioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione incognita

PROCEDIMENTO

1. Impostare lo spettrofotometro per misurare a lunghezza d'onda fissa di 280 nm;
2. Azzerare lo strumento utilizzando come bianco il solvente, cioè acqua deionizzata;
3. Misurare l'assorbanza a λ = 280 nm dei tre campioni di BSA a concentrazione incognita e annotarne i valori;
4. Calcolare la concentrazione (<u>sia in M che g/l</u>) di ogni campione sapendo che:
   - il coefficiente di estinzione molare complessivo della proteina è descritto dall'equazione seguente:

$$\boldsymbol{\varepsilon = (nW * \varepsilon_{trp}) + (nY * \varepsilon_{tyr})}$$

   - nella sequenza ci sono 21 tirosine e 3 triptofani
   - ε_{280} (tirosina)= 1290 M^{-1} cm^{-1}
   - ε_{280} (triptofano)= 5960 M^{-1} cm^{-1},
   - PM (BSA) = 66000 Da

2^ PARTE**: SAGGIO COLORIMETRICO (metodo del Bradford)**

MATERIALI:
-Albumina di siero bovino (BSA) SOLUZIONE STOCK **0.1mg/ml**
-Reagente Bradford
-Una soluzione di proteina a concentrazione ignota

PROCEDIMENTO:

1. Preparare in 7 tubi le soluzioni di BSA diluendo lo STOCK per ogni tubo a **1ml finali** alle seguenti concentrazioni : 0 μg/ml (bianco), 5μg/ml, 10μg/ml, 12μg/ml, 17μg/ml, 20μg/ml, 25μg/ml

2. Preparare un ottavo tubo con 1 ml di soluzione incognita.

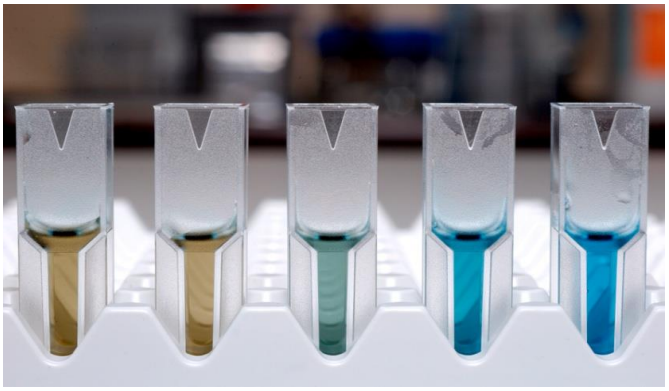
3. Aggiungere agli 8 tubi 1ml di reagente Bradford.

4. Aspettare 30 minuti affinché avvenga la reazione.

5. Nel frattempo accendere lo spettrofotometro ed impostare la lettura a 595nm.

6. Trascorsi i 30 min, effettuare lo ZeroBase con il bianco, misurare l'assorbanza di ciascuno degli 8 campioni a 595 nm e annotarne i valori.

7. Graficare assorbanza vs [proteina] (in μg/ml) delle soluzioni note e tracciare la retta di taratura. Valutare la concentrazione della soluzione incognita utilizzando tale retta.



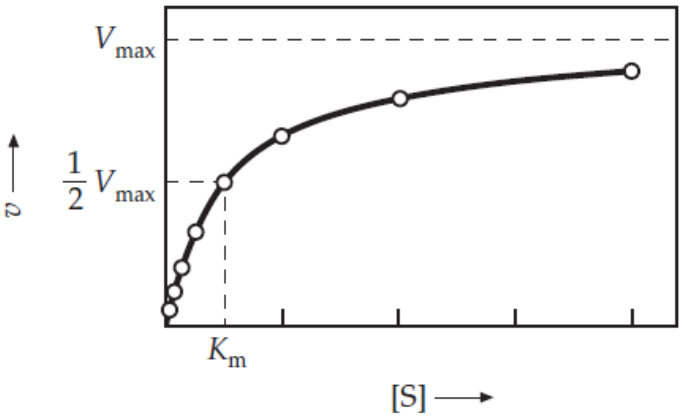
SECONDA ESERCITAZIONE**: DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI CINETICI E INIBIZIONE DA PRODOTTO DELLA FOSFATASI ACIDA**

1^ PARTE: DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI CINETICI

TEORIA

L'equazione di Michaelis-Menten è la seguente:

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

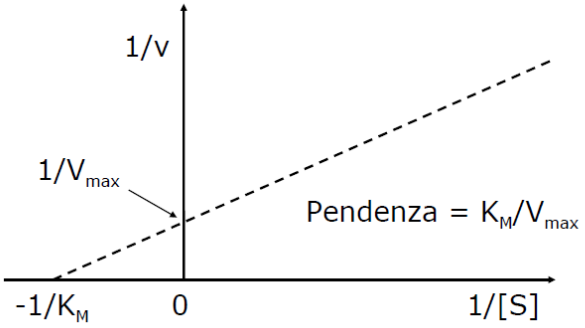


K_M : concentrazione di substrato a cui la velocità è Vmax/2,

Vmax: velocità in condizioni di saturazione di substrato

Dal grafico di MM non è agevole calcolare la velocità massima della reazione, perché alle alte [S] la curva ha un andamento asintotico. Per questo si usa l'elaborazione di Lineweaver-Burk che permette di linearizzare l'equazione tramite il calcolo dei doppi reciproci.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Per 1/[S] uguale a 0 1/*v* diventa uguale a 1/*Vmax* e corrisponde con l'intercetta sull'asse delle ***y***.

Se invece consideriamo 1/v uguale a 0 , 1/[S] assume un valore uguale a -1/K*M* (intercetta con l'asse delle ***x***). Il coefficiente angolare della retta è K*M* / *Vmax*.

Questa linearizzazione è molto utile per la determinazione dei valori di K*M* e *Vmax*.

SCOPO

La prima parte di questa esercitazione ha come scopo la determinazione dei parametri cinetici della fosfatasi acida, **K_M e v_{MAX}**, attraverso l'analisi **Lineweaver-Burk**

MATERIALE

- Substrato della fosfatasi acida STOCK 3mM (p-nitrofenilP; PNPP)
- Fosfatasi acida STOCK 2,5 Unità/ml
- Tampone citrato 0,1M pH 5.5
- NaOH 10N

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. Preparare 8 tubi e diluire lo stock di substrato (3mM) nel tampone citrato, in modo da ottenere 2 ml alle seguenti concentrazioni: 0mM, 0.03mM, 0.09mM, 0.15mM, 0.24mM, 0.3mM, 0.6 mM e 0.9 mM.

2. Con l'aiuto di un cronometro aggiungere 10µl dello STOCK di fosfatasi acida (equivalenti a 25mU) nei diversi tubi ai seguenti tempi:
   t=0min tubo 0mM
   t=1min al tubo 0.03mM
   t=2min al tubo 0.09mM
   t=3min al tubo 0.15mM
   t=4min al tubo 0.24mM
   t=5min al tubo 0.3mM
   t=6min al tubo 0.6mM
   t=7min al tubo 0.9mM

In questa fase è molto importante la precisione sia dei volumi sia dei tempi.

3. Fermare in ogni tubo la reazione dopo **10 minuti** aggiungendo 100µl di NaOH 10N. Le reazioni devono quindi essere fermate ai seguenti tempi:
   t=10min al tubo 0mM
   t=11min al tubo 0.03mM
   t=12min……

   Dopo questa operazione le soluzioni prendono una colorazione gialla di intensità crescente

4. Accendere lo spettrofotometro ed impostare la lettura a **420 nm** (picco di assorbimento del p-nitrofenolo); azzerare lo strumento con il tampone citrato e misurare in cuvetta l'assorbanza di 1 ml di ciascuna delle 8 soluzioni.
5. Sottrarre alle assorbanze misurate il valore di assorbanza della soluzione 0 mM (al fine di avere i valori di assorbimento solo del p-nitrofenolo formatosi nel tempo di reazione).

ELABORAZIONE DEI DATI

1. Calcolare per ogni reazione la velocità della fosfatasi in **moli di prodotto/min*Unità di enzima** sapendo che il coefficiente di estinzione molare ($\varepsilon_{420\,nm}$) del p-nitrofenolo è 15000 M^{-1} cm^{-1}.
2. Graficare i valori ottenuti secondo Lineweaver-Burk (1/V *vs* 1/[S]).
3. Determinare i valori di K_M e v_{MAX}

2^ PARTE: DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI CINETICI

La fosfatasi acida è inibita da fosfato inorganico, un prodotto della reazione. Determinerete il tipo di inibizione cinetica e la costante di inibizione Ki usando l'**analisi grafica di Dixon** (vedi appendice)

MATERIALI

- soluzione di P-nitrofenil fosfato (PNPP) 0.5 mM
- Sodio fosfato (Pi) 1 mM
- Tampone citrato 0.1 M, pH 5.5
- Enzima STOCK 2.5 U/ml
- NaOH 10 N

PROCEDIMENTO

1. Preparare 5 soluzioni in un volume finale di 2 ml contenenti PNPP alla concentrazione 0.05mM e Pi alle seguenti concentrazioni: 0.005 mM, 0.025 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, portando a volume con tampone citrato.
2. Aggiungere 15 µL di Enzima a tutte le provette MESCOLANDO ACCURATAMENTE e lasciare a T ambiente per 5 minuti
3. Bloccare la reazione aggiungendo 0.1 ml di NaOH 10 N, e mescolare rapidamente.
4. Leggere le assorbanze a 420 nm azzerando lo spettrofotometro con tampone citrato

Preparare un altro sistema di saggio come sopra, usando PNPP alla concentrazione finale 0.15 mM . Tutte le altre condizioni (la concentrazione di Pi, tampone a 2 ml, enzima e NaOH) devono essere le stesse.

CALCOLI

1. Calcolare la velocità dell'enzima in termini di **µmoli /min* Unità di enzima**, ricordando che il coefficiente di estinzione molare del p-nitro fenolo è 15000 M^{-1} cm^{-1}
2. Mettere in grafico il reciproco della velocità, 1/v contro la [Pi]. Questo è un grafico di Dixon. Dovete ottenere due linee rette dalle due diverse concentrazioni di PNPP utilizzate.
3. Trovare il punto di intersezione di queste due linee. Da questa intersezione calcolate la costante di inibizione, Ki, e il tipo di inibizione (competitiva o non competitiva)

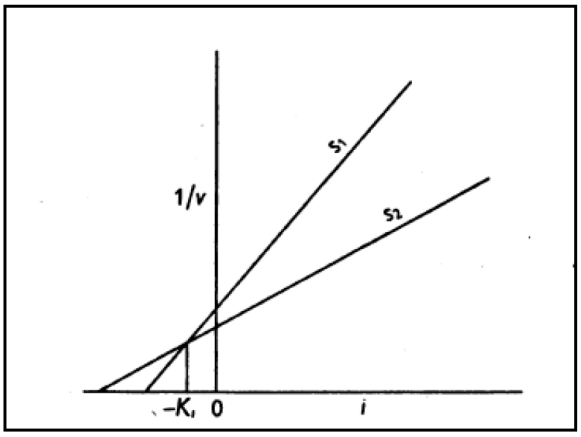
NOTA: Ki, come Km, è una costante cinetica per l'interazione tra l'inibitore e l'enzima ed è una misura dell'affinità dell'inibitore per l'enzima.

APPENDICE:

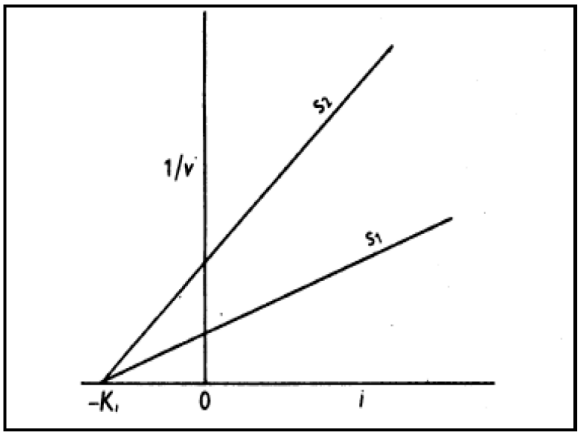
Un modo pratico per determinare costanti di inibizione (competitiva e non competitiva) è quello di eseguire una serie di saggi a due o più concentrazioni diverse di substrato variando la concentrazione dell'inibitore (I). Per ogni concentrazione diversa di substrato è possibile tracciare un grafico di 1/v contro [I] (grafico di Dixon, rappresentato in figura). L'intersezione delle due linee nel secondo quadrante avverrà a **- Ki.**

Sono mostrati i profili dell'inibizione competitiva e non competitiva a due concentrazioni di substrato (S1 e S2).

INIBIZIONE COMPETITIVA



INIBIZIONE NON COMPETITIVA



3^ ESERCITAZIONE**: DETERMINAZIONE DELLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO DEL COENZIMA PIRIDINICO NADH (FORMA RIDOTTA) E DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE DI ESTINZIONE MOLARE DEL NADPH**

I coenzimi piridinici (NAD^+ e $NADP^+$) presentano un particolare spettro di assorbimento in forma ossidata che differisce dallo spettro di assorbimento delle forme ridotte (NADH e NADPH). Infatti entrambi i coenzimi sono caratterizzati, nella forma ridotta, da una banda di assorbimento con massimo a 340 nm, che è assente nelle forme ossidate. Quindi, se nella cuvetta dello spettrofotometro NAD^+ o $NADP^+$ partecipano a reazioni nelle quali sono trasformati in NADH o NADPH si osserverà un incremento di densità ottica a 340 nm. Viceversa, se il NADH o il NADPH sono ossidati a NAD^+ o $NADP^+$, si osserverà un decremento della densità ottica.

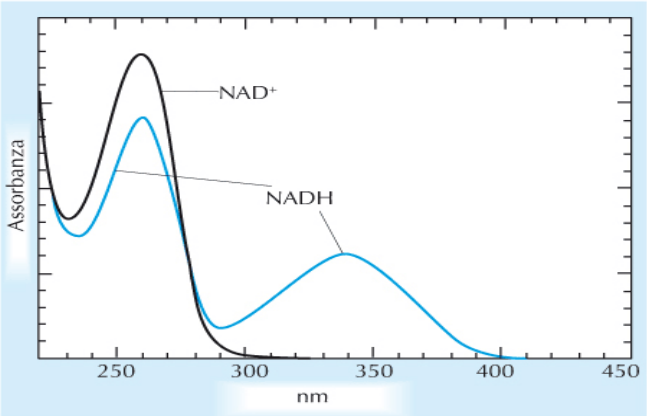


Figura 10.14 Spettro di assorbimento nell'UV-VIS del NAD^+ e del NADH.

Un esempio classico è quello delle deidrogenasi, enzimi che usano come substrato il NAD o il NADP. Nelle reazioni catalizzate da questi enzimi, la comparsa di NADH (o NADPH) a partire dal NAD^+ (o $NADP^+$) è accompagnata dalla comparsa di una banda di assorbimento a circa 340 nm.

La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH) catalizza la reazione di ossidazione del glucosio-6-fosfato a 6-fosfogluconolattone, utilizzando come accettore di elettroni il NADP. Questa reazione, tuttavia, è reversibile; pertanto, di per sé, non è in grado di produrre una conversione completa del substrato a prodotto; la forza trainante che spinge questa reazione enzimatica a completamento è rappresentata da una successiva reazione non enzimatica. Questa, essendo estremamente esoergonica, determina l'idrolisi irreversibile del 6-fosfogluconolattone ad acido 6-fosfogluconico.
La conversione del NADP a NADPH è quindi essenzialmente completa e questo permette di considerare la concentrazione finale di NADPH uguale a quella iniziale di NADP.

MATERIALI:

- Glucosio-6P-Deidrogenasi (ENZIMA)
- Glucosio-6P STOCK 30 mM (SUBSTRATO)
- MgCl2 STOCK 30 mM
- NADP STOCK 0.5 mM

PROCEDIMENTO

Parte 1 Analisi spettro cofattore

1. per acquisire confidenza con lo strumento spettrofotometro e la molecola NADH misurare l'intero spettro di assorbimento della soluzione di NADH fornita facendo una scansione nel range di lunghezze d'onda da 240 nm a 420 nm.

Parte 2 Determinazione del coefficiente di estinzione molare del NADPH

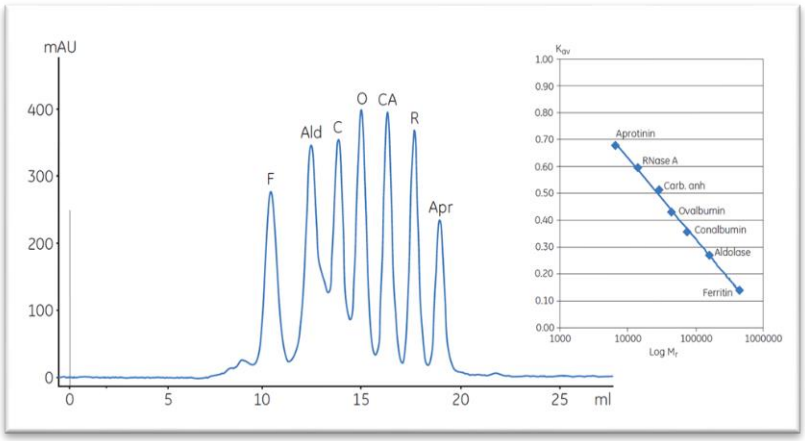
1. impostare lo spettrofotometro per misurare a lunghezza d'onda fissa di 340nm.
2. Preparare una nuova soluzione aggiungendo in ciascuna delle 2 cuvette di quarzo:
    - 450µl di tampone Tris 0,05 M
    - 60µl della soluzione STOCK di Glucosio-6P
    - 60µl della soluzione STOCK di $MgCl_2$.
    - 30µl di Glucosio-6P-Deidrogenasi.
3. Azzerare (zero base) quindi lo strumento con le due cuvette appena preparate.
4. Aggiungere <u>solo</u> alla cuvetta "sample" 20µl della soluzione STOCK di NADP, aspettare almeno 5 min in modo che la lettura si stabilizzi e annotarsi il valore di assorbimento. Ripetere il punto 4 per 4 volte.
5. Determinare la concentrazione di NADP in cuvetta dopo ogni aggiunta e graficare Abs vs [NADP]. Determinare il coefficiente di estinzione molare del NADPH dalla retta risultante.

QUARTA ESPERIENZA**: DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE DI UNA PROTEINA INCOGNITA MEDIANTE CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE**

La gel filtrazione è un metodo cromatografico che consente la separazione delle molecole in base alle loro dimensioni ed alla loro forma. I supporti impiegati, scelti per la loro stabilità chimica e meccanica, sono costituiti da destrano, poliacrilammide ed agarosio. Tra questi, il Sephadex è un gel idrofilico composto da destrano ed epiclorina etilenica, la quale è responsabile delle formazione di legami crociati tra catene lineari di destrano.
Variando il contenuto di destrano si ottengono gel di diversa porosità, i quali consentono la separazione di molecole in uno specifico intervallo di dimensioni.
Il sistema cromatografico è costituito da una certa quantità di gel sospesa in tampone che si lascia sedimentare in una "colonna" di vetro.
La resina utilizzata nella presente esercitazione (Sephadex G-75) consente la separazione di proteine il cui peso molecolare è compreso nell'intervallo di 3.000-70.000 Dalton. Nel corso dell'eluizione, le proteine presenti nel campione saranno trasportate dalla soluzione tampone lungo la colonna, con una velocità dipendente dalle loro dimensioni molecolari.
Tutte le molecole con un peso molecolare maggiore di 70.000 Da saranno completamente escluse dai pori e passeranno attraverso gli spazi interstiziali. Tali molecole saranno dunque eluite per prime nel **V_0 o volume vuoto**, il quale corrisponde al volume di tampone esterno alle sferette del gel. Le molecole di piccole dimensioni (< 5.000 Da) avranno accesso non solo al V_0, ma anche al tampone che si trova all'interno delle sferette di resina (**Vi o volume interno**). Tali molecole effettueranno quindi un percorso più lungo all'interno della fase stazionaria e saranno eluite per ultime, con un volume pari al **V_0 + Vi = volume totale della colonna (Vt)**.
Le molecole di dimensioni intermedie saranno eluite dalla colonna con un **volume di eluizione (Ve)** intermedio tra il V_0 e il Vt, il quale sarà tanto maggiore quanto minori saranno le dimensioni di tali molecole.
Il **coefficiente di distribuzione Kd** di ciascuno proteina è dato dalla relazione:

$$Kd = (Ve - V_0)/(Vt - V_0)$$

Kd può assumere tutti i valori compresi tra 0 e 1.
Le molecole di dimensioni maggiori dei pori del gel che non penetrano nei pori hanno Kd = 0 e sono eluite per prime. Le molecole di dimensioni tali da penetrare completamente nei pori del gel hanno Kd =1 e sono eluite per ultime. Le molecole il cui peso molecolare è compreso tra i due casi descritti hanno 0 < Kd <1 e sono eluite con un volume di eluizione compreso tra Vo e Vt.



Mettendo in grafico il valore del coefficiente di distribuzione Kd rispetto al log del peso molecolare delle proteine, si ottiene una correlazione lineare nel range di separazione della resina.

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. La resina Sephadex G-75 è stata precedentemente rigonfiata ed equilibrata in 50 mM Tris-HCl pH 7.5. La resina è stata fatta scendere lentamente con una pipetta, a colonna chiusa, evitando la formazione di bolle d'aria che possono influire negativamente sulla separazione dei composti. Quando la resina ha raggiunto il livello stabilito è stato aperto il tappo inferiore e si è fatto fluire il tampone, aggiungendolo in modo continuo sopra il livello della resina stessa.
2. Dopo aver chiuso il rubinetto inferiore della colonna e rimosso la quantità di tampone eccedente, si stratifica al di sopra del gel il campione. Si fa penetrare il campione, contenente la mix di proteine standard a peso molecolare noto, nel gel per gravità. La miscela da separare è costituita da:

MIX
Blu destrano (2.000.000 Da)
Albumina da siero bovino (66.000 Da)
Ovoalbumina (45.000 Da)
Mioglobina (17.000 Da)

3. Una volta aggiunto la miscela, si inizia ad aggiungere tampone per l'eluizione.
4. In parallelo all'aggiunta del tampone di eluizione si iniziano a raccogliere le frazioni di eluato. Numerare le provette di raccolta delle frazioni. Raccogliere circa 1 ml per ogni provetta. Lo standard di volume vuoto è il dextran blue.
5. Una volta che si considera terminata l'eluizione, determinare il contenuto proteico di ogni frazione tramite assorbimento della luce ultravioletta a 280 nm (l'assorbimento nella regione dell'ultravioletto è un valido e veloce metodo per determinare la concentrazione di una proteina pura, e non di una miscela, di cui si conosce la sequenza aminoacidica. Nel vicino UV assorbono gli aminoacidi aromatici, triptofano, tirosina e in misura minore la fenilalanina.)
6. Ripetere la procedura, dal caricamento in colonna all'eluizione, con il campione contenente la proteina di PM incognito e il dextran blue come indicatore di V0.
7. recuperare e NON GETTARE il contenuto delle frazioni eluite, sia gli standard che il campione incognito, in quanto verranno congelate ed analizzate tramite SDS-PAGE nella prossima esercitazione.

ELABORAZIONE DEI DATI

1. Preparare il cromatogramma riportando in grafico i valori di assorbanza (ordinata) in relazione al volume di eluizione (ascissa).
2. individuare il numero di picchi che si evidenziano dal cromatogramma ed indicare l'ordine di eluizione (con rispettivo volume) delle proteine caricate.
3. calcolare i coefficienti di distribuzione delle proteine standard eluite e metterli in grafico in funzione del logaritmo del peso molecolare delle proteine.
4. Dalla curva di calibrazione (plot of Kd versus log Mr), una volta calcolato il coefficiente di distribuzione della vostra proteina incognita attraverso il suo volume di eluizione, determinarne il peso molecolare.

QUINTA E SESTA ESERCITAZIONE ESERCITAZIONE**: SDS-PAGE E WESTERN BLOT**

Procedura generale:

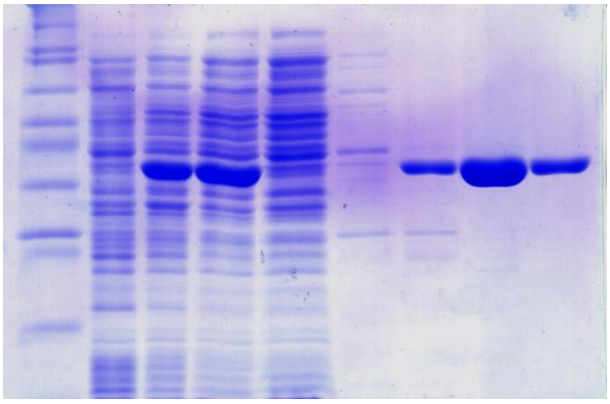
1. Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE
2. Colorazione di un gel mediante Blu di Coomassie
3. Trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa mediante elettroblotting
4. Immunorivelazione delle proteine

PRIMA PARTE: **SDS-PAGE**

L'**elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS** è uno dei metodi maggiormente impiegati per separare le proteine e determinarne il peso molecolare apparente. Tale procedura si basa sulla denaturazione delle proteine ad opera del detergente dodecilsolfato di sodio (SDS). In tali condizioni tutte le molecole proteiche in soluzione presentano una carica negativa costante per unità di massa. Le miscele di molecole proteiche da sottoporre ad SDS-PAGE sono di solito solubilizzate in un'opportuna soluzione tampone (Tris-HCl a pH 6.8) contenente SDS 0,1%. La stessa soluzione tampone contiene anche un colorante tracciante ionizzabile (blu di bromofenolo), il quale consente di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Sono presenti inoltre saccarosio e/o glicerolo, i quali hanno la funzione di rendere più densa la soluzione del campione. Agenti riducenti, quali ditiotreitolo e ß-mercaptoetanolo, sono aggiunti al fine di ridurre ponti disolfurici eventualmente presenti nelle molecole proteiche sottoposte all'analisi.

SCOPO

L'esercitazione ha come scopo l'utilizzo della elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) in presenza di SDS per la separazione di proteine in base alla loro massa molecolare.
Obiettivo specifico è quello di visualizzare le proteine presenti nelle frazioni picco ottenute nel corso della cromatografia eseguita nella seconda esercitazione e calcolare il peso molecolare della proteina incognita dalla sua mobilità elettroforetica in confronto a proteine con P.M. noto



PROCEDURA SPERIMENTALE

ATTENZIONE: usare i guanti ad ogni passaggio di preparazione del gel e dell'apparato di corsa in quanto l'acrilammide è tossica.

1. *MONTAGGIO DELL'APPARATO ELETTROFORETICO*

Lo spessore dei vetri utilizzati per questo esperimento è di 0,75 mm. Pulire i vetri, se necessario, con alcool etilico denaturato e montarli

Nella fase di montaggio bisogna assicurarsi che i vetri siano ben allineati in basso; ciò eviterà, durante la fase di versamento del gel, che il liquido fuoriesca.

Montare i vetrini, fare la prova di tenuta con l'acqua e poi asciugare.

2. *PREPARAZIONE DEL GEL SEPARATORE (ACRILAMMIDE AL 12%)* Volume della miscela: 5 ml

Reagenti	***volume***
Lower buffer 2X	2.5ml
Acrilammide-Bis 30%	2 ml
H_2O	0.5 ml
APS 10%	25 µl
Temed	5 µl

- Preparare la miscela aggiungendo i componenti nell'ordine indicato in tabella.
- Innescare la reazione di polimerizzazione: l'APS ed il Temed vanno aggiunti poco prima di colare il gel, poiché essi sono i catalizzatori della sua polimerizzazione. Immediatamente dopo la loro aggiunta, colare il gel nell'apparato con una p1000 fino a 2cm dal limite superiore del vetrino.
- Appena colato il gel, aggiungere sulla sua superficie 1ml o meno di acqua milliQ, affinché si polimerizzi perfettamente orizzontale all'interfaccia.

3. *PREPARAZIONE DELLO STACKING GEL (ACRILAMMIDE AL 4%)*

- A polimerizzazione avvenuta del running gel, si asciuga l'acqua soprastante con della carta assorbente
- Preparare 3 ml di Stacking gel contenente:

Reagenti	***volume***
Upper mix	3 ml
APS10%	25 µl
Temed	5 µl

- Appena aggiunti i polimerizzanti, colare il gel superiore facendo molte attenzione a non provocare la formazione di bolle, e portare lo stacking fino al limite del vetrino.
- Inserire il pettine fra i due vetrini sempre evitando le bolle d'aria, e si attende la polimerizzazione di questo secondo gel (circa 30 minuti).

4. *PREPARAZIONE DEI CAMPIONI*

- I campioni sono sciolti nel tampone di carico composto da:

- Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8,
- SDS al 2%,
- glicerolo 10%,
- blu di bromofenolo 0.02%,
- DTT 20 mM

– Il volume finale dei campioni è di 20 µl. Ogni campione va preparato aggiungendo 5 µl di Sample Buffer 4X + 15 µl della particolare proteina. **Per il campione contenente gli standard a PM noto invece si mescolano 5 µl di Sample Buffer 4X + 5 µl di Marker**

– Far bollire i campioni, già addizionati di sample buffer e DTT 20mM, per 2 min e farli raffreddare sul bancone a temperatura ambiente.

5. CARICAMENTO DEL CAMPIONE

– Togliere il pettine con molta attenzione e assemblare l'apparato (2 gel per pacchetto).

– Inserire l'assemblato nella vaschetta e riempire la spazio fra i due gel fino all'orlo con il tampone di corsa (Tris-Glicina pH 8.3, SDS 0.1%) controllando che il sistema non perda.

– Caricare i campioni nei pozzetti nel seguente ordine

Pozzetto	*Campione*
1	Marker di peso molecolare *
2	BSA
3	Incognita
4	Mioglobina
5	Ovoalbumina
6	-
7	BSA
8	Incognita
9	Mioglobina
10	Ovoalbumina

* per la composizione del marker di peso molecolare vedere la tabella

– Applicare il coperchio facendo attenzione alla polarità degli elettrodi .

– Impostare l'alimentatore su amperaggio costante di 15mA e avviare la corsa (durante la corsa tenere sotto controllo il voltaggio in modo che non superi mai i 200V, in tal caso abbassare l'amperaggio).

SECONDA PARTE: **COLORAZIONE DEL GEL**

– A corsa conclusa, staccare il coperchio e smontare i pacchetti dei due gel (svuotare prima dal tampone di corsa).

- Separare i due vetrini con cautela e rimuovere lo stacking gel.
- Con molta delicatezza prelevare il running gel dal vetrino e tagliarlo a metà. Una prima metà va immersa nella vaschetta di colorazione contenente il colorante blu coomassie e lasciata in agitazione lenta per tutta la notte. La seconda metà verrà utilizzata per la procedura di western blot.
- Il **giorno successivo** togliere il colorante e aggiungere la soluzione di decolorazione (soluzione di acido acetico e metanolo).
- Una volta terminata la colorazione proteica l'immagine può essere acquisita tramite scansione.

ELABORAZIONE DEI DATI

- Calcolare le mobilità elettroforetiche (Rf, in cm) delle proteine a partire dalla linea di separazione tra lo stacking gel ed il running gel fino alla metà della banda corrispondente alle diverse proteine.
- Costruire un grafico log PM vs Rf
- Calcolare, mediante la retta il peso, delle proteine incognite, sia quella eluita in gel filtrazione sia quella fornita in questa nuova esperienza, attraverso il calcolo del loro Rf.

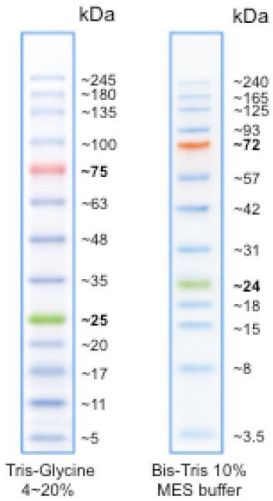


Figura 1Composizione dello standard di peso molecolare

TERZA PARTE: **ELETTROBLOTTING** (trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa mediante corrente)

Le proteine, focalizzate in bande nell'SDS-PAGE, possono essere trasferite su una membrana mediante l'applicazione di un campo elettrico trasversale. Tale trasferimento produce una replica della corsa elettroforetica sulla membrana dove è possibile rilevare le proteine trasferite tramite immunorivelazione.

- Recuperare la seconda metà di *gel* dall'apparecchio elettroforetico ed equilibrarla immergendola in tampone di trasferimento. Tale tampone è composto da Tris 25 mM pH 8.8, glicina 192 mM e metanolo 20%.

- Anche tutte le altre componenti del *blotting*, cioè carta *Whatman* 3MM, membrana nitrocellulosa, spugne e supporto, vengono immerse nel tampone di trasferimento.

- Preparare la griglia di trasferimento, aprendola in una vaschetta con la parte nera appoggiata al fondo

- Procedere all'assemblaggio del *sandwich*, immerso nel tampone, stratificando i componenti dal polo negativo a quello positivo come segue:
    - spugna
    - carta *Whatman* 3MM
    - *running gel*
    - membrana
    - carta *Whatman* 3MM
    - spugna

!! La membrana va sempre maneggiata con i guanti.

- Chiudere la griglia così ottenuta (sandwich).

- Il pacchetto così assemblato si colloca nella cella di trasferimento riempita con l'apposito tampone. La membrana deve essere rivolta verso il polo positivo, in modo che le proteine, ricoperte da SDS, migrino verso di esso fissandosi sulla membrana. La struttura della cella di trasferimento è tale per cui il campo elettrico viene applicato perpendicolarmente al piano del sandwich.

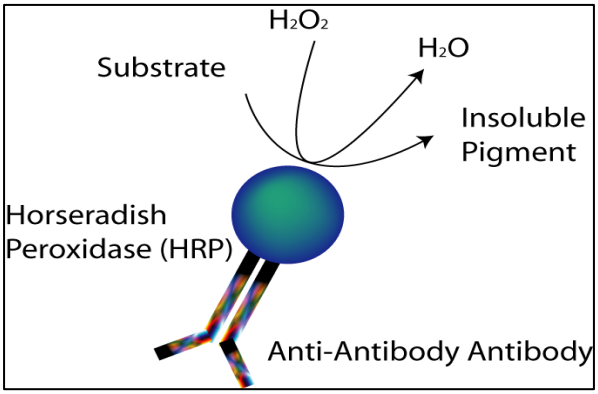
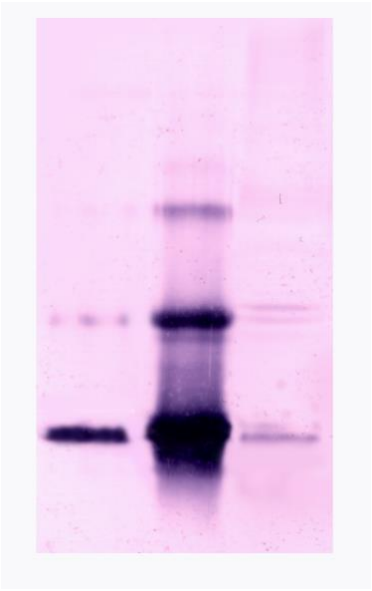
- Si applica quindi una differenza di potenziale di 20V per tutta la notte in camera fredda.

- Il **giorno seguente** al termine del trasferimento si recupera la membrana e si controlla l'avvenuto trasferimento delle proteine mediante colorazione con Rosso Ponceau, che permette di individuare e marcare la posizione delle bande, si segna la posizione dei marcatori di peso molecolare e si decolora la membrana con acqua.

QUARTA PARTE: **IMMUNORIVELAZIONE**

La fase di immunorivelazione ci permette, in una miscela di proteine, di identificare uno o più polipeptidi sfruttando la specificità di legame con un anticorpo.

- Saturare la membrana per almeno 1 h a temperatura ambiente con la soluzione di saturazione (con PBS, latte scremato 5%). Questo trattamento ha lo scopo di saturare la membrana mediante le proteine presenti nel latte bovino che l'anticorpo primario non è in grado di riconoscere così da evitarne l'adsorbimento aspecifico.

- Applicare quindi l'anticorpo monoclonale **Anti-polyHistidine coniugato con perossidasi** nel tampone PBS, latte scremato 1% e lasciare in incubazione per 2 ore.

- Lavare la membrana 3 volte per 5 minuti in PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1.46 mM KH_2PO_4)
- Rivelare aggiungendo i substrati della perossidasi cloronaftolo e H_2O_2.