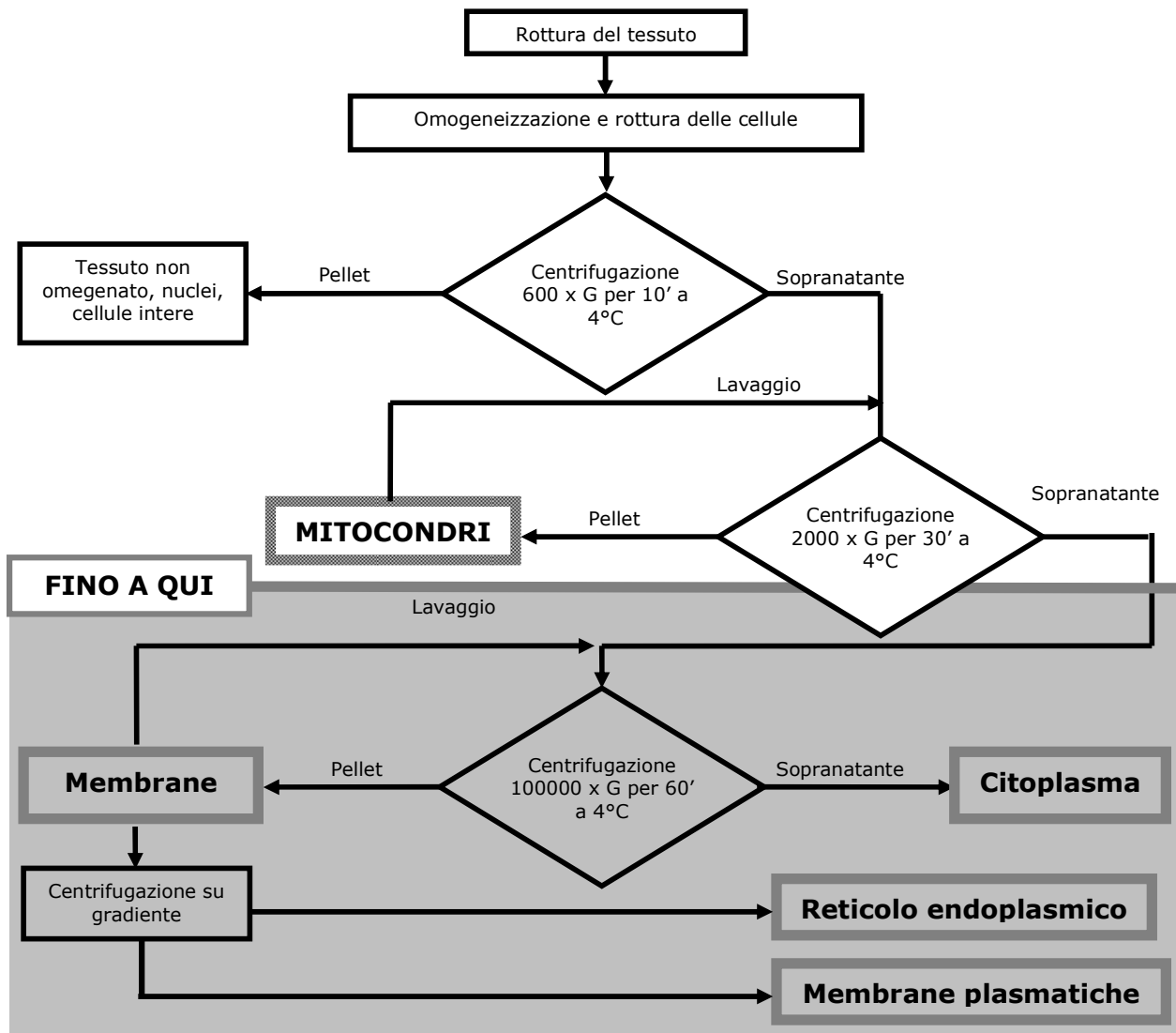


OBIETTIVO

Scopo di questo laboratorio è simulare l'isolamento e la separazione di proteine da materiale biologico di partenza.

Si parte da tessuto e si procede fino alla separazione della frazione mitocondriale. Si valuta il contenuto in proteine e si procede quindi al frazionamento delle proteine su gel di poliacrilamide.

GIORNO 1**SCHEMA GENERALE DEL FRAZIONAMENTO DI UN TESSUTO**

Materiale previsto per ogni gruppo di Studenti:

- un paio di forbici

- vetrino
- un omogeneizzatore Potter
- una provetta da 50mL con tampone HEPES 0.1 M Saccaroso 0.25 M pH 7.5
- una provetta da 50 mL con tampone TRIS 0.1 M pH 7.5
- pipetta P1000
- pipetta P200
- puntali, provette con tappo da 10 mL, vials eppendorf
- portaprovette e portaependorf
- ghiaccio

PROCEDURA PER LA PREPARAZIONE DI MITOCONDRI DI FEGATO DI MAMMIFERO (DUE ORE)**• OMOGENEIZZAZIONE**

- Lavare il fegato con H₂O il modo da liberarlo dal sangue
- Sminuzzare accuratamente il fegato (circa 1,5 g) con la forbice nella petri in ghiaccio,
- Trasferire il fegato sminuzzato nel potter tenuto in ghiaccio (aiutarsi con un poco di tampone HEPES nel trasferimento),
- Aggiungere 3 ml tampone HEPES nel potter,
- Omogeneizzare a mano fino a distruzione del tessuto
- Trasferire il contenuto in provetta con tappo da 10 mL
- Sciacquare il potter con poco tampone
- Portare al volume di 5 ml finali

• ELIMINAZIONE DEL TESSUTO NON OMOGENATO, DELLE CELLULE INTERE E DEI NUCLEI E LAVAGGIO

- Centrifugare a 600g per 15' a 4°C (1900 RPM nella centrifuga refrigerata)
- Prelevare il sopranatante cercando di non raccogliere il grasso in superficie e trasferirlo in un'altra provetta con tappo da 10 mL
- Aggiustare a 6 ml di volume con tampone TRIS
- Trasferire il contenuto in quattro vials eppendorf (1.5 mL per vial).

• SEPARAZIONE DEI MITOCONDRI E LAVAGGIO

- Centrifugare i quattro vial a 20000g per 20' a 4°C (12000 RPM nella centrifuga refrigerata)
- Scartare il sopranatante e ripulire bene il vial eppendorf dal liquido e dall'eventuale grasso
- Aggiungere 1 ml di tampone TRIS su un vial eppendorf e risospendere delicatamente con la pipetta, prelevare tutto e inserirlo nel secondo vial eppendorf, ripetere l'operazione con la seconda coppia di vial eppendorf,
- Si ottengono due vial eppendorf con sospensione di mitocondri.

• LAVAGGIO

- Centrifugare a 20000g per 10' a 4°C (12000 RPM nella centrifuga refrigerata)
- Scartare il sopranatante e ripulire bene il vial eppendorf dall'eventuale grasso
- Aggiungere 1 ml di tampone TRIS e risospendere con la pipetta, prelevare tutto e inserirlo nel secondo vial eppendorf e risospendere con la pipetta.
- Prelevare 100 uL e diluirli 1:10 con tampone TRIS (100 µL di campione + 900 µL di Tampone) in un'altra vial eppendorf
- Alla fine avrete un vial eppendorf con 1 mL di sospensione mitocondriale diluita (per la determinazione delle proteine) e un vial eppendorf con la sospensione di mitocondri.
- Se necessario procedere ad un ulteriore risospensione/lavaggio.

GIORNO 2**DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE NEL CAMPIONE (UN'ORA)***Soluzioni stock per ogni gruppo di studenti*

- Soluzione A (NaK Tartrato, Na₂CO₃ NaOH) (in provetta da 50 mL)
- Soluzione B (CuSO₄ 1%) (in provetta da 15 mL)
- Soluzione di Folin (in provetta da 15 mL)
- Albumina Bovina (standard) 0.5 mg/ml (in eppendorf)
- NaOH 1M (in provetta da 15 mL)
- H₂O (in provetta da 15 mL)

Materiale per ogni gruppo di Studenti:

- pipetta P5000
- pipetta P1000
- pipetta P200
- pipetta P20
- provette
- Puntali, provette con tappo da 10 mL, vials eppendorf
- Portaprovette e porta eppendorf

Reagenti che ogni gruppo di Studenti deve preparare al momento:

- Soluzione A+B (preparata al momento 100:1 quindi 30 mL + 0.3 mL)
- Soluzione C (reattivo di Folin diluito al momento con H₂O 1:1 quindi 1.5 mL + 1.5 mL)

Procedura

- Unire 50 µL di sospensione mitocondriale diluita e 200 µL di NaOH 1M in vial eppendorf
- Preparare i seguenti tubi da saggio:

	Albumina (0.5 mg/mL)	NaOH (1M)	Sospensione Mitocondriale	H ₂ O
Bianco	-	100 µL	-	900 µL
Standard 1	50 µL	100 µL	-	850 µL
Standard 2	100 µL	100 µL	-	800 µL
Campione	-	-	100 µL	900 µL
Campione	-	-	100 µL	900 µL
Soluzione A+B (5mL per provetta)				
Attendere 10' al buio				
Soluzione C (0.5 mL per provetta)				
Attendere 30' al buio				
Leggere allo spettrofotometro a 660 nm				

TABELLA DEI RISULTATI:

Risultati ABS a 660 nm		Risultati sottratti del Bianco	
Bianco			
Standard 1		St ₁ =	
Standard 2		St ₂ =	
Campione		C ₁ =	
Campione		C ₂ =	

Calcoli	
$ABS_c = (C_1 + C_2)/2$	
$ABS_{St} = (St_1 \times 2 + St_2)/2$	
Proteine nel campione (mg/ml) = $(ABS_c / ABS_{St}) \times 0.5^* \times 5^{**}$	
(*) Concentrazione Albumina standard	
(**) Diluizione iniziale con NaOH	

PREPARAZIONE CAMPIONE PER GEL ELETTROFORESI E PREPARAZIONE DEL RUNNING GEL (DUE ORE)*Soluzioni:*

- SDS 200mM in H₂O
- Sample Buffer:
 - Tris 0.25 M
 - SDS 300 mM
 - Glicerolo 10mM
 - 2-mercaptoetanolo 15mM
 - Blu di bromofenolo

Procedura:

- Diluire il campione di proteine fino alla concentrazione di 2.5 mg/ml per un volume finale di 40 µL con SDS 200mM
- Aggiungere 15 µL di sample buffer.
- Bollire per 5'
- Mettere in frigorifero

ELETTROFORESI SU GEL DI ACRILAMIDE*Soluzioni (preparate a priori)*

- Acrilamide 30% (N'N'bismetilacrilamide)
- TEMED
- Ammonio persolfato 0.1 g/mL
- Lower buffer Tris 1.5 M SDS 15mM pH 8.8
- Upper buffer Tris 0.5 M SDS 15mM pH 6.8
- Running buffer: preparato diluendo 5 volte la soluzione madre.
Concentrazione finale: Tris 25 mM, Glicina 0.2M, SDS 3.5mM pH 8.3

Materiale per ogni gruppo di Studenti:

- pipetta P1000
- pipetta P200
- pipetta P20
- Puntali, provette con tappo da 10 mL e 50 mL, vials eppendorf
- Siringa da 20 mL con ago

- Portaprovette e portaependorf
- Vetri per Gel
- Supporto per preparazione del gel

PREPARAZIONE GEL

- Preparazione sostegni per gel come da istruzioni allegate
- Preparazione running gel in provetta:
 - 3.5 mL lower buffer
 - 3.3 mL H₂O
 - 4.5 mL poliacrilamide al 30%
 - Concentrazione finale poliacrilamide 12%
- Aggiunta catalizzatori:
 - 40 µL di ammonio persolfato
 - 5 µL TEMED
- Degassare la soluzione nella siringa da 20 mL
- Iniettare la soluzione di acrilamide (prima che solidifichi) nell'intercapedine dei vetri fino a circa 1 cm dal bordo
- Aggiungere acqua fino al bordo
- Attendere 45' per la polimerizzazione

GIORNO 3**ELETTROFORESI SU GEL DI ACRILAMIDE**

Soluzioni (preparate a priori)

- Acrilamide 30% (N'N'bismetilacrilamide)
- TEMED
- Ammonio persolfato 0.1 g/mL
- Lower buffer Tris 1.5 M SDS 15mM pH 8.8
- Upper buffer Tris 0.5 M SDS 15mM pH 6.8
- Running buffer: preparato diluendo 5 volte la soluzione madre.
Concentrazione finale: Tris 25 mM, Glicina 0.2M, SDS 3.5mM pH 8.3

Materiale per ogni gruppo di Studenti:

- pipetta P1000
- pipetta P200
- pipetta P20
- Puntali, provette con tappo da 10 mL, vials eppendorf
- Siringa da 20 mL con ago
- Portaprovette e portaependorf
- Vetri per Gel
- Supporto per preparazione del gel

PREPARAZIONE GEL (UN'ORA)

- Preparazione stacking gel in provetta:
 - 1.5 mL upper buffer
 - 3.7 mL H₂O
 - 1 mL poliacrilamide al 30%
 - Concentrazione finale poliacrilamide 5%
- Eliminare l'acqua con carta Whatman
- Aggiunta catalizzatori
 - 30 µL di ammonio persolfato
 - 6 µL TEMED

- Degassare la soluzione nella siringa da 20 mL
- Iniettare la soluzione di acrilamide (prima che solidifichi) nell'intercapedine dei vetri fino a colmare
- Inserire il pettine per i pozzetti
- Attendere 45' per la polimerizzazione

CORSA ELETTROFORETICA

- Togliere i vetri dai sostegni
- Numerare i pozzetti
- Montarli appropriatamente nella camera elettroforetica come da istruzioni
- Riempire le camere elettroforetiche con running buffer fino a coprire i pozzetti
- Caricare i campioni nei pozzetti (10 μ L = 20 μ g di proteina)
- Applicare tensione agli elettrodi (24 mA per 50')

COLORAZIONE (SE ABBIAMO TEMPO)

- Vetreria
 - Vaschette
- Soluzioni:
 - Soluzione colorante Blue Coomassie R-250 (0.1% in CH₃OH/CH₃COOH/H₂O:10/45/45)
 - Soluzione decolorante (CH₃OH/CH₃COOH/H₂O:10/10/80)
- Procedimento:
 - Disassemblare il gel risciacquando con H₂O distillata
 - Mettere il gel in una vaschetta
 - Eliminare H₂O
 - Coprire con soluzione colorante Blue Coomassie (circa 50mL) e lasciare agire per 10 minuti
 - Versare la soluzione colorante nella bottiglia
 - Coprire con soluzione decolorante (circa 50mL) e lasciare agire fino a completa decolorazione del gel (rimangono colorate le proteine)

BREVE ELENCO DELLE NORME DI COMPORTAMENTO IN LABORATORIO

Norme generali

- Mantenere in ordine e pulito il laboratorio. Rimuovere prontamente vetreria e attrezzature quando non servono più. Non introdurre sostanze ed oggetti estranei all'attività lavorativa.
- È vietato fumare e consumare cibi o bevande.
- È scoraggiato l'uso dei tacchi alti e delle scarpe aperte. I capelli lunghi dovrebbero essere tenuti raccolti. I gioielli penzolanti (orecchini, bracciali ecc...) potrebbero rappresentare fattori di rischio.
- Non toccare le maniglie delle porte e altri oggetti del laboratorio con i guanti con cui si sono maneggiate sostanze chimiche e isotopi radioattivi. È assolutamente vietato l'uso dei guanti al di fuori dei laboratori.
- Etichettare correttamente tutti i contenitori in modo da poterne riconoscere in ogni momento il contenuto.
- Non tenere nelle tasche forbici, spatole di acciaio, provette di vetro o materiale contundente.
- Si sconsiglia l'uso di lenti a contatto poiché possono essere causa di un accumulo di sostanze nocive e, in caso di incidente, possono peggiorarne le conseguenze o pregiudicare le operazioni di primo soccorso.
- Non abbandonare materiale non identificabile nelle aree di lavoro.
- I becchi bunsen e tutte le altre fiamme libere devono distare almeno 150 cm da ogni infiammabile.
- Non bloccare le uscite di emergenza, i pannelli elettrici e le attrezzature di soccorso.

Norme di Comportamento in operazioni e manipolazioni

- Usare in laboratorio dispositivi di protezione individuali appropriati per ogni livello di rischio (camici, guanti a perdere, occhiali e nel caso si utilizzino gas criogenici, opportune maschere protettive, calzature) che devono essere utilizzati correttamente e tenuti sempre in buono stato di manutenzione.
- È vietato usare pipette aspirando direttamente con la bocca; utilizzare sempre le propipette.
- Tutte le operazioni che coinvolgono prodotti volatili tossico-nocivi o prodotti esplosivi devono essere condotte sotto cappa chimica.
- Non lasciare senza controllo reazioni chimiche in corso o apparecchi pericolosi in funzione.
- Prima di cominciare la reazione si devono conoscere le caratteristiche e il comportamento di tutte le sostanze coinvolte.

Norme di Comportamento in caso di incidente o contaminazione

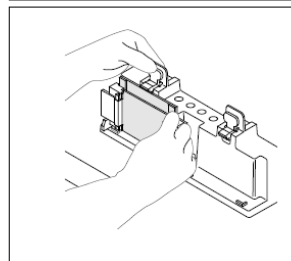
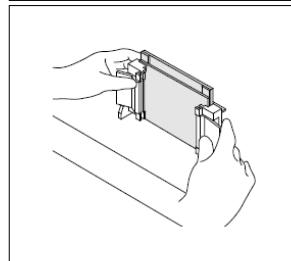
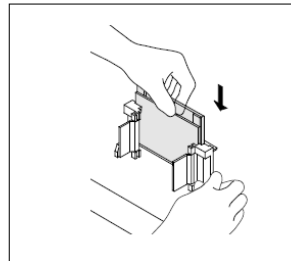
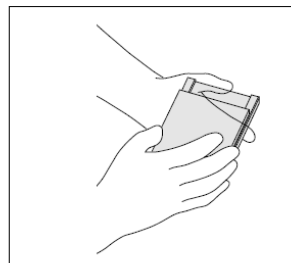
- Prodigare le prime cure, se necessario.
- Decontaminare la cute eventualmente esposta con acqua corrente, docce, lavaggi oculari, antidoti, neutralizzanti, ecc..., a seconda della sostanza. È importante, comunque, affidarsi a un esperto.
- Non disperdere le sostanze contaminanti nell'ambiente. - Allontanare le persone non indispensabili.
- Rimuovere la contaminazione dalle superfici con appositi materiali assorbenti indossando guanti compatibili con la sostanza chimica in questione.
- Avvisare immediatamente il Docente della presenza di eventuali odori sgradevoli o di altre situazioni anomale nei laboratori.

BIO-RAD

Mini-PROTEAN[®] 3 Cell Assembly Guide

Gel Cassette Preparation¹

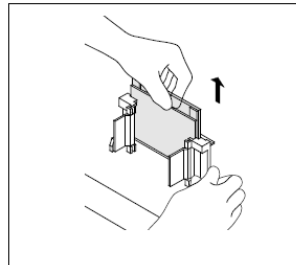
1. Place a Short Plate on top of the Spacer Plate.
2. Slide the two plates into the Casting Frame, keeping the Short Plate facing front. Insure both plates are flush at the bottom on a level surface.
3. Lock the pressure cams to secure the glass plates.
4. Engage the spring loaded lever and place the gel cassette assembly on the gray casting stand gasket. Insure the horizontal ribs on the back of the Casting Frame are flush against the face of the Casting Stand and the glass plates are perpendicular to the level surface. The lever pushes the Spacer Plate down against the gray rubber gaskets.



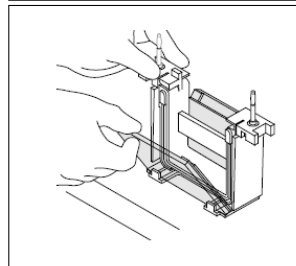
¹ Please refer to the instruction manual for further explanation and technical notes.

**Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis
Module Assembly**

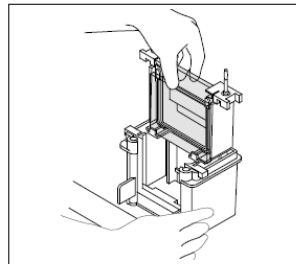
1. Remove the Gel Cassette Sandwich from the Casting Frame.



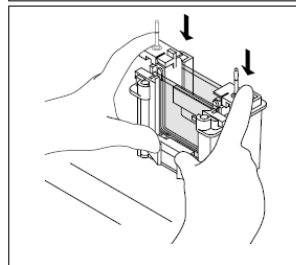
2. Place the Gel Cassette Sandwich into the Electrode Assembly with the Short Plate facing inward.



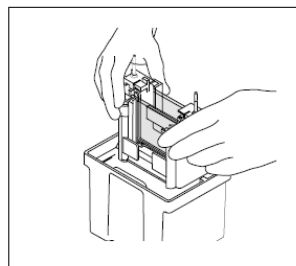
3. Slide Gel Cassette Sandwiches and Electrode Assembly into the clamping frame.



4. Press down the Electrode Assembly while closing the two cam levers of the Clamping Frame.



5. Lower the Inner Chamber into the Mini Tank.

**BIO-RAD****Bio-Rad
Laboratories, Inc.**Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com USA (800) 4BIORAD Australia 02 9914 2800 Austria (01)-877 89 01 Belgium 09-385 55 11 Brazil 55 21 507 6191
Canada (905) 712-2771 China 86-10-8201-1366/68 Denmark 45 44 52-1000 Finland 358 (0)9 804 2200 France 01 47 95 69 65 Germany 089 318 84-177
Hong Kong 852-2789-3300 India (91-124) 6398112/113/114 Israel 03 951 4124 Italy 34 91 590 5200 Japan 03-5811-6270 Korea 82-2-3473-4460
Latin America 305-894-5950 Mexico 52 5 534 2552 to 54 The Netherlands 0318-540666 New Zealand 64-9-4152280 Norway 47-23-38-41-30
Russia 7 095 979 98 00 Singapore 65-2729877 Spain 34-91-590-5200 Sweden 46 (0)8-55 51 27 00 Switzerland 061-717-9555 United Kingdom 0800-181134

Sig 0101

4006158 Rev B

APPUNTI: