SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 24

TITOLO: Farmacologia e Fisiologia Cellulare– Pharmacology and Cellular Physiology

Responsabile scientifico: Bruno D'Agostino

Settore/i Scientifico-Disciplinari di riferimento:

BIO/14-BIO/09

RADoR: Bruno D'Agostino, Pieter De Lange

Tipologia: BIOLOGICO

Gruppi afferenti: Farmacologia e Fisiologia

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- Piano -1 del Corpo A del DISTABIF locale 1A2.1
- dimensioni: 41 m2
- n. 6 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

- PCR-real time
- Immunoblotting
- Immuno-staining in situ
- Elisa
- Preparazione e processamento di campioni istologici animali e umani non infettivi
- Immunoprecipitazione
- Isolamento acidi nucleici

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. **PCR-real time**

L'attività va svolta sotto cappa a flusso laminare e muniti di camice e guanti monouso in nitrile. I campioni da sottoporre all'analisi vengono addizionati alle soluzioni idonee mediante micropipette e puntali sterili e RNAasi free e aggiunti in piastre per sistema PCR. Le piastre vengono, quindi, caricate nello strumento e avviato il programma idoneo.

PRIMA DELL'UTILIZZO DELL'HPLC

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).
- Assicurarsi che la cappa a flusso laminare funzioni adeguatamente e il flusso sia impostato con corretti parametri di sicurezza.

DURANTE L'UTILIZZO

- Verificare il corretto avvio delle analisi.
- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti della strumentazione.
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR).

DOPO L'UTILIZZO

- Spegnere la strumentazione, procedere al riordino banco di lavoro.
- •Procedere al corretto smaltimento dei rifiuti prodotti.

2. Immunoblotting

Lisati proteici saranno separati su gel di acrilammide mediante elettroforesi verticale e successivamente trasferiti su filtri per elettroforesi orizzontale (elletroblotting). L'attività di immuno-detezione va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I filtri posti in petri, vengono trattati con soluzioni di blocco di siti aspecifici, anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Dopo l'incubazione i filtri verranno lavati cona appositi soluzioni (salina tamponato da TRIS con un sapone (Tween))

3. Immuno-staining in situ

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni, fissati su vetrini, vengono trattati con soluzioni di blocco di siti aspecifici, anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Solitamente, le soluzioni utilizzate sono costituite da Tween-20 e TritonX-100 e da albumina sierica bovina in concentrazioni che possono andare da 0,1 a 0,5% a seconda della tipologia di campione. Dopo il tempo necessario di incubazione e dopo aver inserito vetrini copri oggetto, i campioni vanno conservati a -20°C.

4. Elisa

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni vanno caricati in piastre da 96 pozzetti e trattati con soluzioni contenenti anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Solitamente, le soluzioni utilizzate sono costituite da anticorpi coniugati con perossidasi in concentrazioni che possono variare a seconda della tipologia di produttore. Dopo il tempo necessario di incubazione va letta l'assorbanza di ciascun campione mediante lettore di piastre.

5. Preparazione e processamento di campioni istologici animali e umani non infettivi.

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso e mascherina in caso di manipolazione di sostanze tossiche. I campioni raccolti devono essere conservati in formalina o buffer idoneo fino all'inizio delle analisi. I campioni vengono processati mediante impiego di xylene e alcol a diverse concentrazioni per effettuare la disidratazione del tessuto e la successiva inclusione in paraffina. Dal blocchetto di paraffina è possibile ottenere sezioni di tessuto da fissare su vetrino per effettuare colorazioni immunoistochimiche o di immunofluorescenza. Il tessuto può essere congelato anche "a secco" per poi includerlo in soluzione indicate per l'estrazione di acidi nucleici e/o proteine. Alcuni campioni biologici come i lavaggi broncoalveolari (BAL) possono essere conservati a 4 C° fino ad una settimana per misurare mediatori molecolati e/o estrarre cellule.

6. Immunoprecipitazione

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni proteici verranno incubati in una soluzione contenente biglie dotate di uno specifico anticorpo, dopodiché le biglie saranno centrifugate per procedere con la procedura di immunoblotting (punto 2)

7. Isolamento acidi nucleici

Per l'isolamento del DNA, l'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso in nitrile. Ai campioni vengono aggiunte soluzioni contenenti TrisHCl 0.01M e EDTA 0.001M e soluzioni contenenti TrisHCl 0.01M, EDTA 2mM e NaCl 400 mM mediante micropipette e puntali sterili. I campioni vengono, quindi sottoposti a centrifugazione. Successivamente vengono aggiunti 350ul di proteinasi K e 100 ul di SDS AL 10% e lasciati a bagno a 37°C overnight. Il giorno successivo si aggiungono 2ml di NaCl e si effettua un'ulteriore centrifuga. Dopo l'aggiunta di isopropanolo glaciale ed etanolo al 75% il campione viene lasciato asciugare e quantificato.

Per l'isolamento dell'RNA l'attività va svolta sotto cappa a flusso laminare e muniti di camice e guanti monouso in nitrile. Il campione viene trattato con 1ml di reagente Trizol per 50-100mg di tessuto e lasciato incubare. Vengono poi aggiunti 0.2 ml di cloroformio e sottoposti a centrifugazione. La fase acquosa recuperata viene trattata con isopropanolo glaciale e centrifugata. Il pellet di RNA viene solubilizzato con etanolo 75%, viene lasciato asciugare all'aria e quantificato.

LISTA DELLE ATTREZZATURE PRESENTI:

1. Cappa a flusso laminare dotato da lampada UV
2. Incubatore a CO2 per colture cellulari
3. Sistema per RT-PCR
4. Sistema per trasferimento proteine su filtro (Western blotting)
5. Vortex
6. Basculante (n.2)
7. Pompa peristaltica
8. Pompa a vuoto (n.2)
9. PH metro
10. Sistema per perfusione e ventilazione polmonare per roditori
11. Agitatore termoregolato
12. Bagnetto termostatato
13. Termomixer
14. Centrifuga da banco per eppendorf da 1.5 e 2 ml
15. Bilancia

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE GENERALE (DPG):

1. Cappa a flusso laminare

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALI (DPI) AD USO PERSONALE DEGLI OPERATORI:

- Guanti monouso in nitrile
- Guanti monouso in lattice

Categorie ISI WEB di riferimento:
Pharmacology, Physiology

Categorie ERC di riferimento:

- ✓ LS1_2 Biochemistry
- ✓ LS1_3 DNA and RNA biology
- ✓ LS1_9 Molecular mechanisms of signalling processes
- ✓ LS2_3 Epigenetics
- ✓ LS2_4 Gene regulation
- ✓ LS3_5 Cell signaling and signal transduction, exome biology
- ✓ LS3_6 Organelle biology and trafficking
- ✓ LS4_4 Endocrinology
- ✓ LS4_7 Nutrition and exercise physiology
- ✓ LS4-9 Metabolism and metabolic disorders, including diabetes and obesity
- ✓ LS5_1 Neuronal cells
- ✓ LS7_7 Pharmacology and toxicology