

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 39

Nome del laboratorio in Italiano – Inglese: Metabolismo ed Endocrinologia/ Metabolism and Endocrinology

Settore Scientifico-Disciplinare di riferimento: BIO/09

Responsabile: Rosalba Senese

RADoR: Antonia Lanni, Rosalba Senese

Tipologia: Chimico, Biologico

Gruppi afferenti: Fisiologia Generale

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- Ubicazione: Corpo A- Primo Piano
- Postazioni di lavoro: n.3

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Real-Time PCR;
2. Acquisizione gel di agarosio;
3. Attività enzimatiche mitocondriali (ossigrafo);
4. Misura della respirazione cellulare.

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Real-Time PCR

Nel laboratorio di Metabolismo ed Endocrinologia è ubicata una Real-Time PCR (StepOne Plus-Applied Biosystems) utilizzata per l'analisi dell'espressione genica, espressione di microRNA e Rilevamento dei geni. Prima dell'esperimento, utilizzare i DPI necessari (camice da laboratorio, guanti in nitrile o lattice).

Di seguito è riportata la procedura per avviare l'esperimento:

- Dal desktop del PC selezionare il programma StepOne Software v2.3;
- Cliccare su Advanced Setup e indicare il tipo di esperimento che si vuole eseguire;
- Selezionare StepOne Plus Instrument (96 wells), Quantitation Comparative Ct, Syber Green Reagents (per analisi di espressione genica), TaqMan reagents (per analisi di microRNA), Standard (~ 2 hours to complete run);
- Definire i target genici e i campioni da analizzare;
- Inserire la piastra nella strumentazione e Avviare l'esperimento cliccando su Start run.

2. Acquisizione Gel di agarosio

Nel laboratorio di Metabolismo ed Endocrinologia è ubicato un ChemiDoc XRS+ System per visualizzare i risultati dell'elettroforesi su gel di agarosio, e per separare e analizzare gli acidi nucleici.

Prima dell'esperimento, utilizzare i DPI necessari (camice da laboratorio, guanti in nitrile o lattice).

Di seguito è riportata la procedura per avviare l'esperimento:

- Con l'utilizzo di guanti in nitrile il gel viene trasferito dalla cameretta elettroforetica al carrello mobile del ChemiDoc che poi viene chiuso;
- Dal desktop del PC selezionare il programma Image Lab;
- Selezionare New Protocol, Nucleic acid Gels (Ethidium Bromide), il tempo di esposizione;
- Avviare l'esperimento cliccando su Run Protocol.

3. Attività enzimatiche mitocondriali

Nel laboratorio di Metabolismo ed Endocrinologia è presente un Oroboros O2k (O2k, OROBOROS INSTRUMENTS, Austria). Si tratta di un respirometro bicamerale chiuso per la respirometria ad alta risoluzione (HRR) per eseguire analisi sui mitocondri e sulle cellule.

Prima dell'esperimento, utilizzare i DPI necessari (camice da laboratorio, guanti in nitrile o lattice).

Di seguito è riportato il procedimento di esecuzione dei saggi:

- Accendere il pc;
- Cliccare sul programma DataLab 6;
- Impostare i valori in base se si utilizzato cellule o tessuti (milioni di cellule nel primo caso, mg di proteina nel secondo);
- Ambientarlo con soluzione COX;
- Staccare le cellule e risospendere il pellet in un volume adeguato di Buffer;
- Incubare in un rapporto di 1:1 i mitocondri e il lubrol ed incubarle per 30 minuti in ghiaccio;
- Inserire 20 microlitri nella camera di misura contenente la COX;
- Dopo 5 minuti di stabilizzazione aggiungere 5 microlitri di ascorbato e 5 microlitri di TMPD.

4. Misura della respirazione cellulare

PRIMA DELL'UTILIZZO DEL METABOLIMETRO

Utilizzare i DPI necessari (camice da laboratorio, mascherina, occhiali di protezione).

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni fornite dal costruttore;
- Avviare il PC e lo strumento;
- Calibrare lo strumento con O₂ e CO₂ che vengono erogati da bombole con speciali miscele.

DURANTE L'UTILIZZO

- Posizionare gli animali nelle camerette metaboliche;
- Verificare il corretto avvio delle analisi;
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al responsabile delle Attività (RAdoR)

DOPO L'UTILIZZO

- Riportare gli animali nello stabulario;
- Pulire le Camerette metaboliche con il fadion per le successive misurazioni.

Lista delle attrezzature presenti:

- Applied Biosystems Real-time PCR machinery (StepOnePlus) n.1;
- ChemiDoc XRS+ System n.1;
- NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers n.1;
- Metabolimetro con sistema di Gabbie per ratti e Topi n. 1;
- Oxygraph-2k (Oroboros Instruments-high resolution respirometry) n.1;

Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)

- Nessuno

Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori:

- Camice da laboratorio;
- Guanti in nitrile e in lattice varie misure;
- Occhiali di protezione da UV;
- Mascherina FFP2;

Categorie ISI WEB di riferimento:

- Physiology; Endocrinology, Cell Biology; Biochemistry & Molecular Biology

Categorie ERC di riferimento:

- LS1_11 Fundamental aspects of synthetic biology and chemical biology;
- LS4_1 Organ physiology and pathophysiology;
- LS4_2 Comparative physiology and pathophysiology;
- LS4_3 Molecular aspects of endocrinology;
- LS4_5 Metabolism, biological basis of metabolism-related disorders;
- LS4_7 Fundamental mechanisms underlying cardiovascular diseases;
- LS3_1 Morphology and functional imaging of cells and tissues;
- LS3_2 Cytoskeleton and cell behaviour (e.g. control of cell shape, cell migration and cellular mechanosensing);
- LS3_5 Cell signalling and signal transduction;
- LS3_7 Cell death (including senescence) and autophagy;
- LS3_8 Cell differentiation, physiology and dynamics;
- LS2_8 Transcriptomics.