SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 5

TITOLO: BIOLOGIA CELLULARE – CELL BIOLOGY

Responsabile scientifico: ALESSANDRA SANTILLO

Settori Scientifico-Disciplinari di riferimento:
BIO/06, BIO/05

RADoR: GABRIELLA CHIEFFI, ALESSANDRA SANTILLO, MARIA M. DI FIORE, CLAUDIA PINELLI

Tipologia: CHIMICO

Gruppi afferenti: BIOLOGIA CELLULARE, CITOLOGIA E ISTOLOGIA, ZOOLOGIA

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- piano rialzato del corpo A del DiSTABiF (locale 2A17.1);
- dimensioni: 33,8 m^2.
- n. 3 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

- Estrazione proteine e western blotting
- Estrazione acidi nucleici e PCR/real time PCR
- Estrazione ormoni steroidei e saggi ELISA per la loro determinazione
- Preparazione di campioni per saggi di attività cellulare

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DEL CICLO DI LAVORO E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. **ESTRAZIONE PROTEINE E WESTERN BLOTTING**

Indossare i dispositivi di protezione individuale (DPI) necessari, come guanti, camice da laboratorio e all'occorrenza occhiali di protezione e mascherina. Tessuti e/o pellet di cellule sono omogenizzati mediante omogenizzatore Turrax in tampone di lisi a pH 7.4, contenente: HEPES 50mM, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10% glicerolo, 1% Triton X-100 (1:2 p/v), 1mM fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF), 1pg aprotinina, 0.5mM sodio ortovanadato, e 20mM di sodio pirofosfato. L'omogenato è successivamente chiarificato mediante centrifugazione a 14000g per 10 min. La concentrazione proteica è determinata mediante saggio Bradford.

Gli estratti proteici vengono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide eseguita secondo il metodo Laemmli che prevede la preparazione di due tipi di gel: stacking gel (per il caricamento dei campioni) e separating gel (per separare le proteine). La preparazione dello stacking gel è eseguita utilizzando: Tris 0.125M, SDS 0.1% pH 6.8, miscela di acrilammide 4%, TEMED 0.1%, ammonio persolfato 0.05%. Il separating gel è preparato utilizzando: Tris 0.375M, SDS 0.1% pH 8.8, miscela di acrilammide 13%, TEMED 0.1%, ammonio persolfato 0.05%. I campioni proteici vengono quindi bolliti in tampone Laemmli per 5 minuti a 95°C prima dell'elettroforesi. Successivamente, i campioni sono sottoposti a SDS-PAGE (10-13% poliacrilammide). La corsa è effettuata a 200 V per 1 h, utilizzando come tampone la soluzione costituita da: Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1% pH 8.6. Dopo separazione mediante elettroforesi, le proteine sono trasferite su membrana di nitrocellulosa (100 V per 90 minuti), in tampone di trasferimento (Tris 16.5mM, glicina 150mM pH 8.3, metanolo 20%). Al termine del trasferimento i filtri sono asciugati all'aria per 15 minuti per rimuovere il metanolo. Il trasferimento completo è valutato utilizzando standard di proteine e mediante colorazione delle membrane con il rosso Ponceau. Le membrane sono quindi prima trattate per 1h con soluzione bloccante (5% latte in polvere in 25mM Tris, pH 7.4, 200mM NaCl, 0.5% TritonX-100, TBS/Tween) e poi incubate per tutta la notte a 4°C con specifici anticorpi primari policlonali

e/o monoclonali. Dopo lavaggio con TBS/Tween, le membrane sono incubate per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano. La rilevazione degli immunocomplessi avviene mediante un sistema di chemiluminescenza potenziata (ECL).

2. **ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI E PCR/REAL TIME PCR**

Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio, all'occorrenza occhiali di protezione e mascherina).

Per l'estrazione di RNA da tessuti e /o pellet cellule, i campioni sono omogenizzati in una soluzione di TRIzol (1ml di TRIzol per 50-100mg di tessuto). Agli omogenati, incubati per cinque minuti a temperatura ambiente, sono aggiunti 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRIzol utilizzato, dopodiché i campioni sono incubati a temperatura ambiente per 2-3 minuti. Dopo centrifugazione, eseguita a 12000g per 15 minuti a 4°C, l'RNA si distribuisce nella fase acquosa superiore, mentre il DNA e le proteine si localizzano nell'interfaccia e nella fase inferiore. La fase acquosa è raccolta e trasferita in un nuovo tubo di polipropilene a cui vengono aggiunti 500 µl di isopropanolo a 4°C. La precipitazione è effettuata incubando i campioni a -20°C per circa 1 ora. È eseguita, quindi, una centrifugazione a 12000g per 10 minuti a 4°C; il surnatante è rimosso ed il pellet è lavato con etanolo al 75%. I campioni, poi, sono centrifugati per 5 minuti a 7500g. Viene rimosso l'etanolo al 75% ed il pellet di RNA è risospeso in acqua sterile. La concentrazione dell'RNA è calcolata con l'uso dello spettrofotometro considerando l'assorbimento della soluzione alla lunghezza d'onda di 260nm; l'integrità dell'RNA è determinata mediante un'elettroforesi su gel denaturante di formaldeide/agarosio. L'RNA estratto è trattato per 30 minuti a 37°C con l'enzima DNasi I (10U/campione) al fine di eliminare le contaminazioni di DNA genomico. Un microgrammo di RNA totale è retro-trascritto a cDNA utilizzando il kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System.

Per l'analisi di qRT-PCR, a 12.5µl di iQSYBR green Supermix sono aggiunti 2µl di cDNA, ottenuto dalla retrotrascrizione, e 6pmol/µl degli specifici primers. La reazione di amplificazione consiste in un primo step a 94°C per 3 minuti, seguito da 35 cicli a 95°C per 10 secondi, ed uno step a 60°C per 30 secondi. I campioni sono poi successivamente sottoposti ad un protocollo di denaturazione che consiste in 71 cicli che iniziano a 55°C e successivamente aumentano di 1°C ogni 10 secondi per generare una curva di dissociazione che conferma la presenza di ogni singolo amplicone.

3. **ESTRAZIONE DEGLI ORMONI STEROIDEI E SAGGI ELISA PER LA LORO DETERMINAZIONE**

Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio, all'occorrenza occhiali di protezione e mascherina).

I tessuti sono omogenizzati 1:10 (p/v) con PBS 1X. L'omogenato è poi mescolato energicamente con etere etilico (1:10 v/v) e la fase dell'etere è isolata dopo centrifugazione a 3000g per 10 minuti. Il sopranatante (etere etilico) è trasferito in una provetta di vetro ed è lasciato evaporare su una piastra calda a 40-50°C sotto cappa. Il residuo è disciolto in 0.25ml di tampone fosfato di sodio 0.05M pH 7.5, contenente BSA ad una concentrazione di 10mg/ml, e usato per il saggio ELISA seguendo il protocollo del kit commerciale.

4. **PREPARAZIONE DI CAMPIONI PER SAGGI DI ATTIVITÀ CELLULARE**

Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio, all'occorrenza occhiali di protezione e mascherina).

Per i saggi di attività cellulare (MMP, ATP, calcio intracellulare, CCK-8, MDA, LDH, ecc.) i campioni sono preparati seguendo il protocollo dei rispettivi kit commerciali.

LISTA DELLE ATTREZZATURE PRESENTI:

1. Centrifuga per Eppendorf
2. pH-metro
3. Piastre riscaldanti n. 2
4. Piastre agitanti n. 3
5. Thermoblock eppendorf
6. Bilance analitiche n. 2
7. Omogenizzatore Turrax

8. Stufe n. 2
9. Basculante
10. Vortex
11. Autoclave
12. Frigorifero/freezer n. 2

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE GENERALE (DPG)

1. Armadio per liquidi infiammabili
2. Cappa chimica

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

- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice (varie misure)
- Visiera
- Guanti per autoclave

Categorie ISI WEB di riferimento

Cell Biology, Reproductive Biology, Endocrinology & Metabolism, Biochemistry & Molecular Biology, Zoology

Categorie ERC di riferimento

- ✓ LS3_1 Cell cycle, cell division and growth
- ✓ LS3_2 Cell senescence, cell death, autophagy, cell ageing
- ✓ LS3_5 Cell signalling and signal transduction, exosome biology
- ✓ LS3_6 Organelle biology and trafficking
- ✓ LS3_9 Cell differentiation, formation of tissues and organs