

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 5

BIOLOGIA CELLULARE – CELL BIOLOGY

Responsabile: ALESSANDRA SANTILLO, GABRIELLA CHIEFFI

Settori Scientifico-Disciplinari di riferimento:

BIOS-04

BIOS-03

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 m²
- n. 3 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Estrazione proteine e western blotting
2. Estrazione acidi nucleici e PCR/real time PCR
3. Estrazione ormoni steroidei e saggi ELISA per la determinazione
4. 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 omogeneizzatore Turrax in tampone di lisi a pH 7.4. 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 SDS-PAGE 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). 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. La corsa è effettuata a 200 V per 1 h. Dopo separazione mediante elettroforesi, le proteine sono trasferite su membrana di nitrocellulosa (100 V per 90 minuti). Al termine del trasferimento i filtri sono asciugati all'aria per 15 minuti. Il trasferimento completo è valutato utilizzando standard di proteine e mediante colorazione delle membrane con il rosso Ponceau. Le membrane sono incubate per tutta la notte a 4°C con specifici anticorpi primari. Dopo lavaggio, le membrane sono incubate per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario. La rilevazione degli immunocomplessi avviene mediante un sistema di chemiluminescenza potenziata.

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 di cellule, i campioni sono omogenizzati in opportune soluzioni e poi 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. Un microgrammo di RNA totale è retro-trascritto a cDNA, che è sottoposto ad amplificazione.

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 tampone fosfato di sodio (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 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 PBS 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 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. Balance 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 (MOMOWORK ECOAIR 120 TIRAGGIO EXT)

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 Cell Biology, Development, Stem Cells and Regeneration

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

[SCHEDA DI SICUREZZA](#)