

# VALUTAZIONE DELLA INTERAZIONE TRA ANTIGENE E ANTICORPO MEDIANTE TECNICA IMMUNOCHEMICA “WESTERN BLOTTING”

*Laboratorio di Biochimica Cellulare (Responsabile attività: Prof. Angela Ostuni; Tutor: Dr.ssa Agata Petillo)*

L'obiettivo del **Western Blotting** (o **Immunoblotting** o **Immunofissazione**) è l'identificazione, con un anticorpo specifico, di un determinato antigene (proteina) presente all'interno di una complessa miscela di antigeni (o proteine) separate in un gel di poliacrilammide in base al peso molecolare e immobilizzate su una membrana. Il Western Blotting permette di monitorare l'espressione proteica in una cellula e quindi di determinare la presenza, la quantità e il peso molecolare di uno specifico antigene attraverso tre steps:

- 1) *Estrazione e dosaggio delle proteine;*
- 2) Separazione delle proteine mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (*SDS-PAGE*);
- 3) *Western Blotting*: trasferimento delle proteine separate dal gel su di una membrana di nitrocellulosa (blot); esposizione della membrana all'anticorpo diretto contro la proteina di interesse (anticorpo primario); esposizione della membrana ad un anticorpo diretto contro l'anticorpo della specie utilizza come anticorpo primario (anticorpo secondario), e sviluppo della membrana con il metodo della chemiluminescenza (ECL).
- 4) *Analisi densitometrica delle immagini*

## 1) *Estrazione e dosaggio delle proteine*

La procedura di estrazione delle proteine dalle cellule prevede tre fasi: *lisi cellulare, isolamento delle proteine e dosaggio proteico.*

- **Lisi cellulare**

Alle cellule viene aggiunta una soluzione di lisi che serve a rompere le cellule e a mantenere l'integrità delle proteine.

- **Isolamento delle proteine**

Le proteine (presenti nella fase solubile, surnatante) sono separate per centrifugazione da tutte le altre componenti cellulari (pellet).

- **Dosaggio proteico**

La quantità di proteine estratte è misurata al fine di determinare il volume di soluzione proteica da utilizzare per l'esperimento.

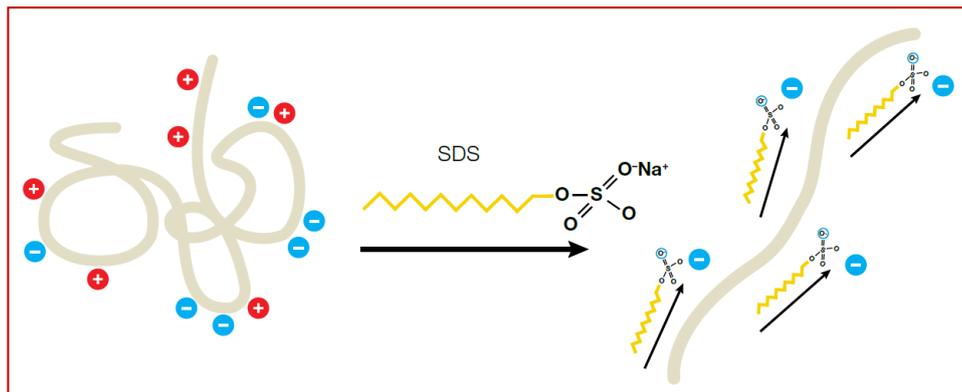
## 2) *Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare tra loro particelle cariche in un campo elettrico: le molecole cariche migrano o verso il catodo (polo negativo) o verso l'anodo (polo positivo) a seconda della loro carica.

L'elettroforesi delle proteine viene condotta su un supporto poroso o gel in modo che le molecole rimangano separate in bande strette. La carica delle molecole guida la direzione di

migrazione; la dimensione o peso molecolare delle molecole e la dimensione dei pori del gel, determinano la velocità di migrazione e la posizione sul gel al termine della corsa elettroforetica.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) è una tecnica di separazione elettroforetica delle proteine in condizioni **denaturanti** e consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare grazie alla presenza dell'SDS, un detergente anionico (con carica negativa) che annulla la carica propria delle proteine e le carica negativamente: le proteine avranno tutte carica negativa netta e migreranno verso il polo positivo; la velocità di migrazione delle singole proteine dipenderà così solo dal loro peso molecolare (Fig. 1).



**Fig. 1 - Effetto dell'SDS su conformazione e carica di una proteina.** A sinistra: proteina nella sua normale struttura 3D e carica. A destra: proteina con SDS legato che determina la distensione della catena amminoacidica e acquisizione della carica negativa.

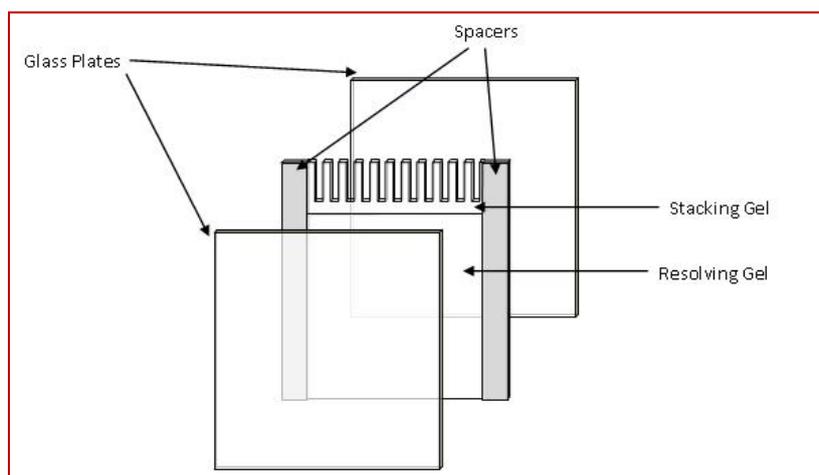
La carica propria delle proteine viene quindi completamente mascherata dalle molecole di SDS cariche negativamente. Ogni rotazione che tende a chiudere la catena è ostacolata dalla repulsione tra le cariche negative, che mantengono così la conformazione filamentosa. *Le proteine possono così essere separate solo sulla base del loro peso molecolare.*

Un tipico allestimento di un gel per elettroforesi in SDS, formato tra due lastre di vetro, prevede la preparazione di (Fig.2):

- Uno **“stacking” gel (o gel di impaccamento)** di acrilammide al 4%: è la parte superiore del gel; la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato nei pozzetti, in modo che tutte le proteine presenti nella miscela inizino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza;
- Un **“running” gel (gel di separazione)** di acrilammide a percentuale maggiore: è la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine del campione in base al loro peso molecolare.

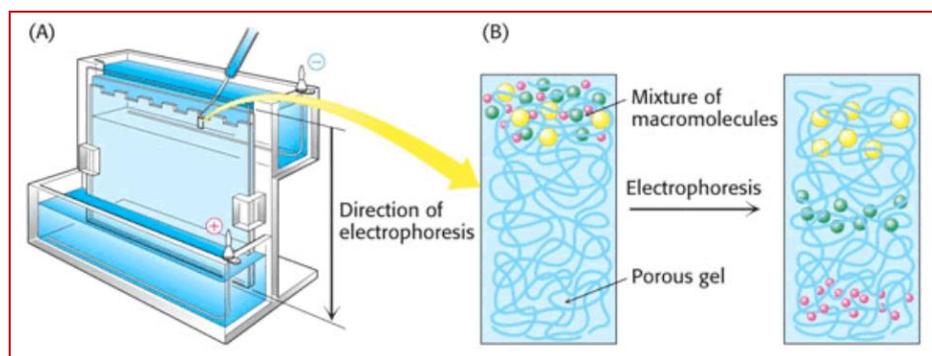
Stacking gel e running gel hanno gli stessi ingredienti ma in quantità diverse e con un pH diverso. In particolare, varia la quantità di acrilammide: lo stacking gel serve solo ad impaccare le proteine alla “griglia di partenza” (costituita dal bordo superiore del running gel) e per ottenere ciò basta una concentrazione bassa di acrilammide; nel running gel, invece, si vogliono separare le proteine e la quantità di acrilammide viene scelta in base al peso molecolare delle proteine che si vogliono analizzare. La concentrazione di acrilammide

determina la dimensione dei pori nel gel: concentrazioni maggiori permettono la formazione di pori di dimensioni minori.



**Fig. 2 Gel di poliacrilammide formato tra due lastre di vetro.** L'apparato di base per l'elettroforesi verticale è costituito da due lastre di vetro rettangolari, inserite verticalmente nel supporto per la gelificazione; le lastre sono separate da due spaziatori e chiuse da pinze. Nello spazio che si genera (1,5 mm di spessore) si versano e si lasciano gelificare prima la soluzione di acrilammide per il gel di separazione (inferiore) e poi quella per il gel di impaccamento (superiore). Quando questo non è ancora gelificato, si introduce un pettine dello stesso spessore degli spaziatori, allo scopo di formare i pozzetti in cui verranno caricati i campioni.

I complessi SDS-proteina sono quindi caricati all'interno dello stacking gel (Fig.3), il quale, essendo a bassa percentuale permette il loro libero movimento e, dato che hanno la stessa carica per unità di lunghezza, si muovono tutti con la stessa mobilità: le proteine vengono concentrate in una banda sottile, sotto l'effetto del campo elettrico applicato, prima di attraversare il running gel, in cui si separano a causa della presenza di pori più piccoli dovuti alla maggiore percentuale di acrilammide. Solo le proteine a peso molecolare minore riescono ad attraversare tutto il gel, le altre vengono intrappolate durante la migrazione.



**Fig. 3.** (A) Caricamento del gel di poliacrilammide; (B) separazione molecole proteiche in base alle loro dimensioni.

### 3) *Western Blotting*

Le proteine separate mediante SDS-PAGE sono trasferite dal gel su una membrana per rendere accessibili le proteine ad uno specifico anticorpo ed essere così esaminate singolarmente.

Le proteine separate mediante SDS-PAGE sono trasferite elettricamente su un foglio di nitrocellulosa. Il foglio è poi incubato con un anticorpo specifico diretto contro la proteina di interesse (anticorpo primario) e il complesso proteina-anticorpo è evidenziato utilizzando un anticorpo secondario (cioè che riconosce il primo anticorpo) marcato, o in grado di conferire un colorazione specifica, o una chemiluminescenza che può essere facilmente rilevata.

Gli anticorpi primari si ottengono dal siero di animali (in genere topo/ratto/coniglio/capra) iniettando la proteina di interesse. Gli anticorpi del siero animale sono *policonali* (ossia sono diretti contro diversi epitopi della proteina usata come immunogeno) e possono avere quindi reazioni crociate con altre proteine (che condividono epitopi con la proteina di interesse); per una specificità maggiore si usano anticorpi *monoclonali*. Come anticorpo secondario si usa un siero di animale (di specie diversa da quella in cui è stato prodotto l'anticorpo primario), immunizzato con anticorpi della specie dell'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è, quindi, un anticorpo diretto contro la parte costante di un anticorpo di specie diversa.

Dopo il trasferimento (*blotting*) su membrana di nitrocellulosa, si effettuano i seguenti passaggi:

1. **Blocking o saturazione:** nel processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana, che vengono bloccati rivestendo la membrana con una miscela di proteine non specifiche. Questo evita il legame non specifico dell'anticorpo primario su tali siti. Si utilizza una miscela di proteine del latte o albumina bovina (BSA).
2. **Incubazione con anticorpo primario:** la membrana viene immersa in una soluzione che contiene l'anticorpo primario. Poiché tutti i siti della membrana che legano proteine sono bloccati, l'anticorpo aderisce alla membrana solo se si lega con il suo antigene specifico.
3. **Lavaggi:** permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato il proprio antigene. La membrana viene lavata con una soluzione contenente un detergente (Tween), mantenendola in agitazione su una piastra basculante. È importante effettuare più lavaggi, cambiando di volta in volta la soluzione di lavaggio.
4. **Incubazione con anticorpo secondario:** la membrana viene immersa in una soluzione che contiene un anticorpo in grado di reagire con qualunque anticorpo della stessa fonte biologica del primario. Ad esempio: anticorpo primario di coniglio (*rabbit*), anticorpo secondario capra anti-coniglio (*goat anti-rabbit*).
5. **Lavaggi:** permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato l'anticorpo primario. Si utilizza la stessa soluzione con detergente utilizzata nello step 3.
6. **Rilevazione della proteina:** l'anticorpo secondario è legato covalentemente a un enzima che catalizza una reazione cromogena quando la membrana viene incubata con il substrato specifico per l'enzima.

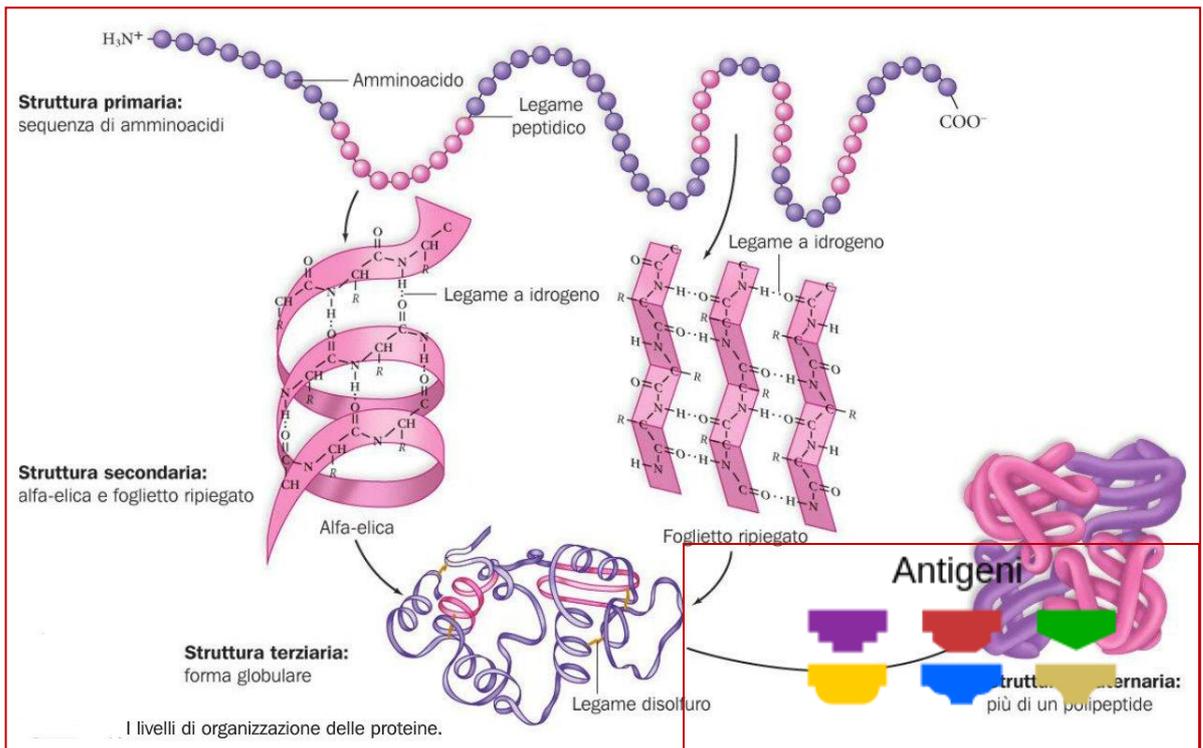
**PER SAPERNE DI PIU'**

**PROTEINE**

Una proteina è un polimero formato dalla combinazione di 20 amminoacidi legati tra loro grazie a *legami peptidici*.

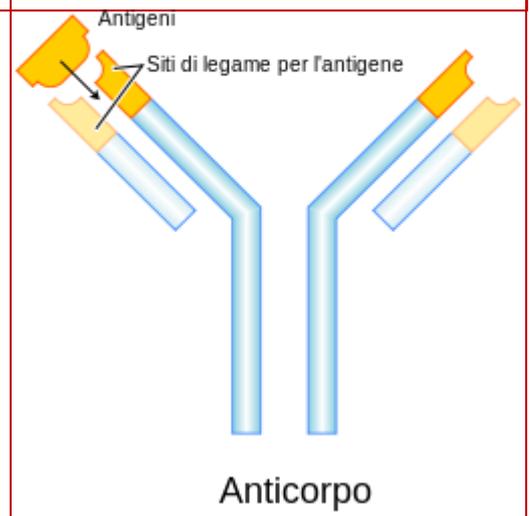
Tabella degli amminoacidi		
Sigla a tre lettere	Sigla a una lettera	Nome
Gly	G	Glicina
Ala	A	Alanina
Val	V	Valina
Leu	L	Leucina
Ile	I	Isoleucina
Met	M	Metionina
Cys	C	Cisteina
Pro	P	Prolina
Phe	F	Fenilalanina
Trp	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Thr	T	Treonina
Ser	S	Serina
Asn	N	Asparagina
Gln	Q	Glutamina
Asp	D	Acido aspartico o Aspartato
Glu	E	Acido Glutammico o Glutammato
His	H	Istidina
Lys	K	Lisina
Arg	R	Arginina

La struttura si divide in quattro livelli, indicati come *struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria*:



**INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO**

La tecnica utilizzata, per evidenziare una particolare proteina, “sfrutta” la reazione antigene-anticorpo che avviene normalmente in un organismo. Gli **anticorpi** hanno la caratteristica fondamentale di riconoscere gli *antigeni* in modo molto specifico e di legarli mediante legami non covalenti.



Un tipico anticorpo ha la forma di Y e ha due identici siti di legame per l'antigene su ciascun braccio della Y. La proteina è formata da quattro catene amminoacidiche (due catene pesanti H e due catene leggere L).

Gli **antigeni** sono sostanze in grado di interagire con anticorpi; il sito di interazione con l'anticorpo è detto "*epitopo*" o determinante antigenico. Gli antigeni più comuni e potenti sono le proteine. Le singole proteine hanno più di un epitopo e possono quindi essere riconosciute da anticorpi con specificità diverse.

### Siti web consigliati

SDS-PAGE:

<https://www.youtube.com/watch?v=3CrzY7jb9fQ>

Western Blotting:

<https://www.youtube.com/watch?v=GJJGN0dhP8w>

<https://www.youtube.com/watch?v=JcN0EkcHrKk>

[https://www.youtube.com/watch?v=IoVzpL\\_heFo](https://www.youtube.com/watch?v=IoVzpL_heFo)

## GIORNO 1

### *Estrazione delle proteine*

#### **Reagenti e materiali biologici**

- Cellule di mammifero
- Soluzione di lisi: PIC 100X (Protease Inhibitor Cocktail) portata a 1X con RIPA Buffer

#### **Protocollo sperimentale**

- Aggiungere alle cellule 40  $\mu\text{L}$  di *soluzione di lisi*.
- Vortexare e incubare in ghiaccio per 10 minuti.
  
- Centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C per consentire la separazione del pellet (detriti cellulari e proteine insolubili) dal surnatante (proteine solubili).
- Trasferire il surnatante in una nuova eppendorf.



### *Dosaggio delle proteine (metodo Bradford)*

#### **Reagenti e materiali biologici**

- Comassie Protein Assay reagent (reattivo di Bradford)
- Albumina di siero bovino a concentrazione nota (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- Campione proteico a concentrazione non nota

#### **Protocollo sperimentale**

- Una retta di taratura, riportante l'assorbanza a 595 nm in funzione della concentrazione proteica espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , è preparata con soluzioni di BSA a concentrazioni note e crescenti:

	<b>BSA 2 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math></b>	<b>Acqua distillata</b>	<b>Comassie Protein Assay reagent</b>
1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$	499,5 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	499 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	498 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	496 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	492 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$

La concentrazione delle proteine estratte, e presenti nel surnatante, è misurata aggiungendo a 499  $\mu\text{l}$  di acqua distillata e a 500  $\mu\text{l}$  di Comassie Protein Assay reagent 1  $\mu\text{l}$  di surnatante.

- Incubare le soluzioni per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.
- Effettuare allo spettrofotometro la lettura dell'assorbanza a 595 nm.
- Dai valori di assorbanza delle soluzioni di BSA a concentrazione nota e crescente si ottiene la retta di taratura con il programma Microsoft Excel. Aprire il programma Excel e costruire una tabella a due colonne nelle quali vanno inseriti i valori di assorbanza letti dallo strumento e la concentrazione nota delle soluzioni di BSA. Selezionare i dati della tabella e

cliccare su INSERISCI (in alto nella barra applicazioni). Scegliere il grafico a DISPERSIONE: comparirà un grafico con una serie di punti più o meno dispersi sul piano cartesiano. Ciò che è necessario per permetterci di ottenere i valori di nostro interesse (concentrazione delle proteine estratte) da tale grafico è l'equazione matematica alla base della che meglio interpola i punti rappresentati (*linea di tendenza*). Per visualizzare sia la linea di tendenza che l'equazione della retta cliccare sui punti rappresentati cliccare sul grafico e in PROGETTAZIONE cliccare su AGGIUNGI ELEMENTO GRAFICO e scegliere line di tendenza LINEARE. Nelle opzioni scegliere “visualizza l'equazione sul grafico” e “visualizza il valore R quadro sul grafico”. L'R quadro darà una indicazione della dispersione dei dati intorno alla linea di tendenza e l'equazione della retta permetterà di ricavare la concentrazione delle proteine estratte per semplice estrapolazione:

$$y = ax + b$$

x = assorbanza del campione proteico

y = concentrazione delle proteine estratte espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

### *Preparazione del gel di poliacrilamide*

#### **Reagenti**

- Acqua distillata
- Acrilammide/bis-acrilammide
- Tris-HCl 1M pH 6.8
- Tris-HCl 1.5M pH 8.8
- SDS 10%
- APS
- TEMED

## **GIORNO 2**

### *Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE*

#### **Reagenti e materiali biologici**

- Campione proteico (surnatante)
- Gel di poliacrilamide
- Acqua distillata
- Marker di proteine
- Running buffer
- Sample buffer 6X, colorante di caricamento per gel di proteine

#### **Protocollo sperimentale**

- Calcolare i  $\mu\text{l}$  di surnatante contenenti i  $\mu\text{g}$  di proteine da caricare (dai 50 ai 100  $\mu\text{g}$ ) sul gel utilizzando la concentrazione ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) del campione proteico determinata con il metodo Bradford.

$$\mu\text{l di surnatante} = \frac{(\mu\text{g di proteine da caricare})}{(\text{concentrazione } \mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

**Nota:** i pozzetti del gel possono contenere un volume massimo di 40  $\mu\text{l}$ . Quindi, per esempio se 100  $\mu\text{g}$  di proteine sono contenuti in 60  $\mu\text{l}$  di surnatante, bisogna diminuire i  $\mu\text{g}$  di proteine da caricare per rientrare nel limite massimo di 40  $\mu\text{l}$ .

- Incubare le proteine con Sample buffer 6X nel termoblocco a 95°C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle proteine. Il Sample buffer 6X va portato a 1X con il volume di surnatante utilizzato:

$$\mu\text{l di Sample buffer 6X} = \frac{(\mu\text{l di surnatante})}{5}$$

- Centrifugare i campioni per 30 secondi a 13000 rpm per raccogliere sul fondo il liquido contenuto nella provetta.
- Togliere il pettine dal gel, sciacquare i pozzetti con acqua distillata e montare il gel sull'apposito sostegno.
- Riempire la cella elettroforetica con il Running buffer (tampone di corsa).
- Caricare nel primo pozzetto i marker di proteine.
- Caricare il campione proteico o i campioni proteici.  
**Nota:** appuntarsi l'ordine di caricamento.
- Applicare al sistema una differenza di potenziale di 120 V per i primi 10-15 minuti di corsa.
- Aumentare a 140 V.
- Bloccare la corsa quando il fronte blu del colorante si vede quasi "uscire" dal gel.

### *Trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa (Western Blotting) e individuazione immunologica di una specifica proteina (parte 1)*

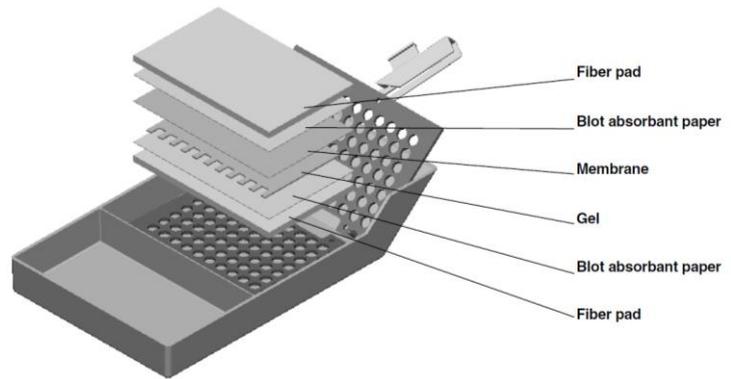
#### **Reagenti e materiali biologici**

- Buffer di trasferimento per Western Blotting
- Membrana di nitrocellulosa
- Carta da filtro
- PBST, soluzione di lavaggio
- Soluzione di blocking, soluzione di incubazione per blocco siti aspecifici (PBST + latte in polvere al 10% (g/V)).
- Soluzione di incubazione con anticorpi primari (PBST + latte in polvere al 5% (g/V), con anticorpi primari monoclonali di coniglio Anti- $\beta$ -Actina diluiti 1:400 (V/V))
- Soluzione di incubazione con anticorpi secondari (PBST + latte in polvere al 5% (g/V), con anticorpi secondari di tipo "Anti-coniglio" coniugati con la perossidasi, diluiti 1:3000 (V/V))
- Substrati della perossidasi

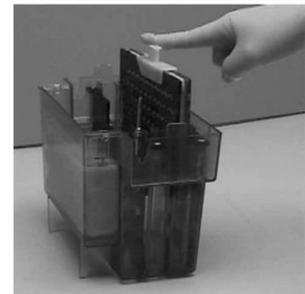
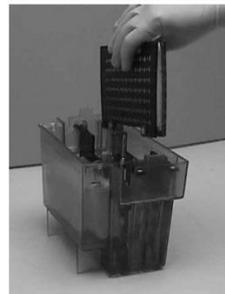
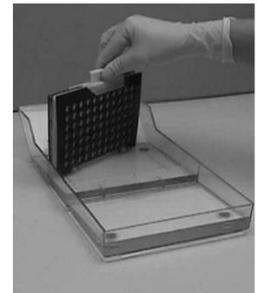
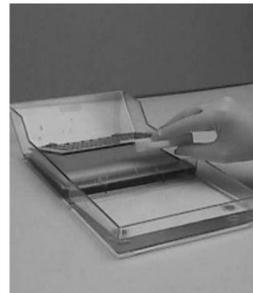
#### **Protocollo sperimentale**

Al termine della corsa elettroforetica, il gel è sottoposto a western blotting, ovvero al trasferimento delle bande proteiche dal gel di poliacrilamide a una membrana di nitrocellulosa.

- Preparare la griglia di trasferimento, aprendola in una vaschetta di plastica, contenente il Buffer di trasferimento, con la parte nera appoggiata al fondo.
- Posizionare in sequenza: una spugnetta bagnata di buffer di trasferimento e 3 fogli di carta.



- Appoggiare il gel sulla carta.
- Appoggiare la membrana di nitrocellulosa anch'essa imbevuta nel buffer di trasferimento, maneggiandola solo con delle pinzette.
- Posizionare altri tre fogli di carta e la seconda spugnetta (sempre imbevuti di buffer di trasferimento).
- Eliminare le bolle.
- Chiudere la griglia (sandwich).
- Inserire il sandwich nella camera di un apparato per *elettroblotting*.
- Riempire di Buffer di trasferimento l'apparato. La struttura dell'apparato è tale per cui il campo elettrico viene applicato perpendicolarmente al piano del sandwich.



- Il trasferimento viene realizzato applicando un'intensità di corrente di 380 mA per 90 minuti. Al fine di evitare sbalzi di temperatura del Buffer di trasferimento, nell'apparato per elettroblotting viene posizionata una vaschetta con del ghiaccio e il trasferimento viene condotto in camera fredda (4°C).
- Una volta completato il trasferimento, immergere la membrana nel colorante *Rosso Ponceau* il quale lega le proteine a livello dei gruppi amminici e delle regioni non covalenti e non polarizzate, evidenziando le proteine come bande rosse sulla membrana.
  - Lavare la membrana con acqua distillata.
  - Effettuare lavaggi di 10 minuti della membrana con PBST fino a scomparsa delle bande rosse.

Dopo il *western blotting*:

- Incubare per un'ora la membrana con la soluzione di blocking.
- Rimuovere la soluzione di blocking.
- Incubare per tutta la notte con la soluzione contenente anticorpi primari Anti- $\beta$ -Actina.

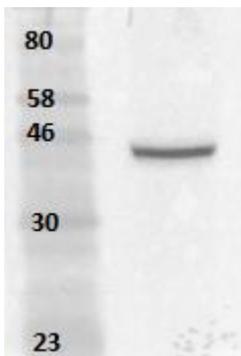
## GIORNO 3

### *Individuazione immunologica di una specifica proteina (parte 2)*

- Effettuare un lavaggio veloce con PBST dopo aver recuperato e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  la soluzione contenete anticorpi primari.
- Cambiando di volta in volta il PBST, effettuare due lavaggi di 10 minuti ciascuno.
- Incubare la membrana con la soluzione di incubazione contenente gli anticorpi secondari per un'ora.
- Rimuovere la soluzione di incubazione.
- Effettuare un lavaggio veloce in PBST e due lavaggi di 10 minuti, sempre in PBST.
- Lasciare la membrana nella seconda soluzione di lavaggio.

**Nota:** Non lasciare mai a secco la membrana di trasferimento.

- **Al buio** spostare la membrana in una vaschetta, versarvi prima la soluzione 1 e poi la soluzione 2.
- Incubare per 4-5 minuti: il luminolo viene ossidato dall'ossigeno liberato dall'azione della perossidasi (coniugata agli anticorpi secondari) sull'acqua ossigenata, con concomitante produzione di luce rilevata dall'apposito strumento che fornirà un'immagine come la seguente:



sulla sinistra sono riportati i pesi molecolari dei marker proteici in kDa, a destra la banda corrispondente all'actina che ha un peso molecolare di circa 43 kDa.

### *Elaborazione dei dati*

Mediante l'utilizzo di un software di elaborazione delle immagini si procede con la misura della densità di pixel della banda proteica rilevata sulla membrana. La densità di pixel è prporzionale alla quantità di quella determinata proteina presente nelle cellule analizzate. Il software utilizzato è "Image J".

## SOLUZIONI UTILIZZATE PER GLI ESPERIMENTI

**Tris-HCl 1 M pH 8**

		Concentrazione finale
<b>Tris</b>	121,14 g	1M
HCl 37%	circa 40 ml	

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Sciogliere in 700 ml di acqua distillata 121,14 g di Tris, portare a pH 8 aggiungendo HCl 37% (circa 40 ml), controllando il valore con pH-metro o con cartina tornasole; portare a volume con acqua distillata.

### NaCl 5 M

Sciogliere 292,2 g di NaCl in 800 ml di acqua distillata, quindi portare il volume a 1000 ml con acqua distillata.

### RIPA buffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8	2,5 ml della 1 M
150 mM	NaCl	1,5 ml della 5M
1%	NP-40	0,5 ml
0.1%	SDS	0,05 g
0.5%	Sodio desossicolato	0,25 g

Portare a 50 ml con acqua distillata

Conservare a 4°C.

### Buffer di lisi

	RIPA buffer	40 µl
1X	PIC	0,4 µl del 100X

Per un solo campione cellulare

**Nota:** il PIC 100X è portato a 1X con il volume di RIPA buffer utilizzato, il quale è scelto in base al numero di cellule presenti nel campione (in genere si utilizzano campioni cellulari per i quali sono sufficienti 40 µl).

### SDS 10%

Sciogliere 20 g di SDS in 200 ml di acqua distillata con un agitatore magnetico ed eventualmente scaldando a circa 60°C. Conservare a temperatura ambiente

### Tris glicina 10X

		Concentrazione finale
Tris	30.30 g	0.25 M
Glicina	150.14 g	2 M

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Il pH deve essere 8.3. Conservare a temperatura ambiente.

### Running buffer per SDS-PAGE pH 8.3

		Concentrazione finale
Tris glicina 10X	100 ml	0,025 M e 0,2 M rispettivamente
SDS 10%	10 ml	0.1%

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Questo tampone è utilizzato per l'elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Il Tris mantiene stabile il pH a 8.3; gli ioni di glicina servono per il passaggio di corrente; SDS (un detergente fortemente anionico) mantiene le proteine denaturate cariche negativamente.

### Sample buffer 6X (colorante di caricamento per SDS-PAGE)

Acqua distillata	40 µl
B-Mercaptoetanololo	100 µl
SDS	0,2 g
Glicerolo 100%	1 ml
Tris-HCl 1M, pH 6.8	500 µl
Blu di bromofenolo	una punta di spatola

Si utilizza per il caricamento di campioni proteici durante SDS-PAGE. Il B-Mercaptoetanololo rompe i ponti disolfuro. Il glicerolo appesantisce i campioni, facilitandone il caricamento, mentre il blu di bromofenolo è un colorante di piccole dimensioni carico negativamente che migra verso il polo positivo più velocemente delle proteine fungendo da indicatore di corsa e permettendo così di capire quando bloccare la corsa elettroforetica evitando la fuoriuscita dal gel delle proteine.

### Buffer di trasferimento per Western Blotting

		Concentrazione finale
Tris glicina 10X	100 ml	10%
Metanolo	200 ml	20%
Acqua distillata	700 ml	70%

Gli ioni di glicina servono per il passaggio di corrente. Il metanolo serve per fissare le proteine sulla membrana di nitrocellulosa.

### PBS 10X, pH 7.5

		Concentrazione finale
NaCl	40,9 g	1,4 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,89 g	100 mM
KCl	1 g	27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,22 g	18 mM

Portare a 500 ml con acqua distillata

Portare la soluzione a pH 7.5 con NaOH 10M e/o HCl 37%, usando il pH-metro o cartina tornasole.

Conservare la soluzione a temperatura ambiente.

### **PBST 1X**

		Concentrazione finale
PBS 10X	50 ml	1X
Acqua distillata	450 ml	
Tween	250 µl	0,05 % (V/V)

Questa soluzione si utilizza per il western blotting e per i successivi lavaggi della membrana di trasferimento.

Il PBS è una soluzione isotonica tamponata. L'aggiunta di Tween, un detergente, serve a ridurre i legami aspecifici delle biomolecole alla membrana.

### **PBST 1X + latte in polvere 10%**

Sciogliere 1 g di latte in polvere in 10 ml di PBST 1X. Conservare a 4°C per non più di tre giorni.

Questa soluzione si utilizza per bloccare i siti di legame aspecifici sulla membrana di trasferimento.

### **PBST 1X + latte in polvere 5%**

Sciogliere 0,5 g di latte in polvere in 10 ml di PBST 1X. Conservare a 4°C per non più di tre giorni.

Questa soluzione si utilizza per diluire gli anticorpi primari e secondari per l'immunorilevamento di proteine.