Università degli Studi di Teramo

Corso di Laurea in Biotecnologie

Metodologie Biochimiche – II Anno

ESERCITAZIONE 2 – Omogenizzazione di un campione cellulare

Data: 27/10/2026

In questa esercitazione estrarrete le proteine totali da un campione di pellet cellulare. Il primo passo consiste nel preparare il tampone di lisi, una soluzione che rompe le membrane cellulari e solubilizza le proteine. Successivamente, seguirete il protocollo di estrazione per ottenere un lisato cellulare chiarificato, pronto per essere analizzato.

Richiami Teorici

Prima di iniziare, rispondete alle domande seguenti.

Domanda: *Cosa si intende per "lisi cellulare"? Quali tipi di forze tengono unita la membrana cellulare e in che modo un detergente come il Triton X-100 riesce a romperla?*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Perché si aggiunge un Protease Inhibitor Cocktail (PI) al tampone di lisi? Cosa succederebbe alle proteine senza di esso?*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Cosa separa la centrifugazione a 14.000 g? Cosa si trova nel pellet e cosa nel surnatante dopo questa centrifugazione?*

Risposta:

_____

_____

Materiali e Strumenti

Reagenti per il tampone di lisi (volume finale 50 mL):

- Tris-HCl pH 8 – soluzione madre 1 M
- NaCl – MM = 58,44 g/mol
- EDTA – soluzione madre 0,5 M
- $MgCl_2$ – soluzione madre 1 M
- Glicerolo
- Triton X-100
- Acqua distillata

Reagenti per l'estrazione:

- Tampone di lisi
- Protease Inhibitor Cocktail
- Pellet cellulare

Strumentazione:

- Bilancia analitica
- Cilindri
- Becher
- Micropipette
- Puntali
- Eppendorf
- Pestello
- Vortex
- Centrifuga
- Spatoletta
- Barchetta per pesata

1. Preparazione del Tampone di Lisi (50 mL)

Il tampone di lisi è una soluzione **fisiologica e tamponata** che, grazie alla presenza del detergente Triton X-100, rompe le membrane cellulari e solubilizza le proteine. Gli altri componenti stabilizzano il pH, proteggono le proteine dalla degradazione e mantengono le condizioni ioniche corrette.

> 📌 **Perché questi componenti?**
>
> **Tris-HCl pH 8:** tampona la soluzione a pH leggermente basico, ottimale per la solubilità proteica.
>
> **NaCl 150 mM:** fornisce la forza ionica fisiologica, prevenendo interazioni aspecifiche tra le proteine.
>
> **EDTA 1 mM:** lega gli ioni divalenti (Ca^{2+}, Mg^{2+}), inibendo le metalloproteasi e le DNasi Mg^{2+}-dipendenti.
>
> **$MgCl_2$ 1 mM:** cofattore necessario per alcune attività enzimatiche che si vogliono mantenere.
>
> **Glicerolo 10%:** stabilizza le proteine, proteggendole dalla denaturazione durante il processo di estrazione.
>
> **Triton X-100 1%:** detergente non ionico che solubilizza le membrane cellulari liberando le proteine intracellulari.

Formule per la preparazione del tampone:

Per i componenti da **soluzione madre** si usa: _____

Per i componenti da **solido** si usa: _____

Calcoli e volumi/masse per il tampone di lisi (50 mL)

Componente	C finale	Stock / MM	Valore calcolato
Tris-HCl pH 8	50 mM	1 M	_____ mL
NaCl	150 mM	MM 58,44 g/mol	_____ g
EDTA	1 mM	0,5 M	_____ µL
NaF	100 mM	MM 41,99 g/mol	_____ g
$MgCl_2$	1 mM	1 M	_____ µL
Glicerolo	10% v/v	100% (puro)	_____ mL
Triton X-100	1% v/v	10% stock	_____ mL
Acqua distillata	—	—	q.b. a 50 mL

Procedimento - *Aggiungete i componenti nell'ordine indicato; aggiungete il Triton X-100 per ultimo, mescolando delicatamente per evitare schiuma.*

1. Mettete circa 20 mL di acqua distillata in un becher da 100 mL sul ghiaccio.
2. Aggiungete il volume calcolato di Tris-HCl 1 M (pH 8) e mescolate.
3. Pesate e sciogliete il NaCl nel becher; mescolate fino a completa dissoluzione.
4. Aggiungete il volume calcolato di EDTA 0,5 M con una micropipetta.
5. Aggiungete il volume calcolato di $MgCl_2$ 1 M con una micropipetta.
6. Aggiungete il Glicerolo (100%) misurando il volume con la pipetta; mescolate lentamente.
7. Aggiungete il Triton X-100 (stock 10%) mescolando delicatamente senza agitare eccessivamente.
8. Trasferite nel cilindro e portate a volume con acqua distillata.

9. Conservate il tampone in ghiaccio fino all'uso.

Domanda: *Perché il Triton X-100 deve essere aggiunto per ultimo e mescolato delicatamente? Cosa succederebbe se si agitasse vigorosamente?*

Risposta:

_____

_____

2. Estrazione proteica dal pellet cellulare e dal tessuto di fegato di topo

Partendo dal pellet cellulare aggiungete il tampone di lisi per rompere le membrane e liberare le proteine intracellulari.

> 📌 **Rapporto tampone/cellule**
>
> Usate **1 mL di tampone di lisi per ogni 5×10^6 cellule**. Questo rapporto garantisce che le proteine siano sufficientemente concentrate per le analisi successive (es. Western blot, dosaggio proteico BCA/Bradford).
>
> **CALCOLI**:
>
> Numero di cellule nel vostro campione: _____ **cellule**
>
> Volume di tampone necessario:
>
> V tampone = N° cellule / (5×10^6 cellule/mL) = _____ / 5.000.000 = _____ **mL**
>
> Volume di Protease Inhibitor Cocktail da aggiungere (1:100):
>
> V Protease Inhibitor Cocktail (PI) = V tampone / 100 = _____ / 100 = _____ **µL**
>
> Prima di aggiungere il tampone al pellet, aggiungete il **PI 1:100** (____ µL per mL di tampone).
> NON preparate questo tampone in anticipo: aggiungetelo sempre fresco al momento dell'uso.

Procedimento:

10. Preparate il tampone di lisi sul ghiaccio e aggiungete il Protease Inhibitor Cocktail (10 µL/mL); mescolate brevemente.
11. Aspirate il surnatante residuo dal pellet cellulare senza disturbarlo.
12. Aggiungete 1 mL di tampone di lisi + PI direttamente sul pellet.
13. Pipettate la miscela su e giù con la micropipetta (almeno 10 volte) per sospendere il pellet.
14. Omogenizzate il campione con il pestello da microcentrifuga, ruotando delicatamente fino a completa dissoluzione del pellet visibile.
15. Incubate la sospensione in ghiaccio per 15 minuti; ogni 5 minuti agitate brevemente al vortex (5 secondi, bassa velocità).
16. Centrifugate a 14.000 g, 4°C, per 10 minuti. [**Importante**: bilanciare le provette prima di inserirle nel rotore].
17. Con una micropipetta, trasferite il surnatante (lisato chiarificato) in una provetta Eppendorf pulita, fredda, evitando di toccare il pellet.
18. Conservate il lisato a –20°C fino all'analisi.

Domanda: *Dopo la centrifugazione, il pellet contiene prevalentemente: (a) proteine solubili, (b) nuclei e detriti cellulari, (c) RNA. Quale risposta è corretta? Motivate la vostra scelta.*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Perché è fondamentale lavorare sempre a 4°C o sul ghiaccio durante l'estrazione proteica? Cosa succederebbe alle proteine a temperatura ambiente?*

Risposta:

_____

_____

Domanda: *Il Protease Inhibitor Cocktail deve essere aggiunto FRESCO al momento dell'uso. Perché non si può preparare il tampone di lisi completo in anticipo e conservarlo con il PI già aggiunto?*

Risposta:

_____

_____