**Esercitazione Prof. Sallese**

 **BIOCHIMICA DELLA TRASDUZIONE**

**Identificazione di segnali intracellulari attivati a seguito di stimolazione con EGF**

**WESTERN BLOTTING**

|  |  |
| --- | --- |
| **Transfer buffer pH=8.3** |   |
| TRIZMA BASE  | 25mM |
| GLYCINE | 192 mM |
| Methanol |   |

Tamponi

|  |
| --- |
| **Laemmli buffer**  |
| 10% SDS |
| Glycerol |
| 0,1 % bromophenol blu  |
| 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8 |
| water  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Running buffer pH=8.3** |   |
| TRIZMA BASE | 25mM |
| GLYCINE | 192mM |
| SDS | 0,10% |

Giorno esercitazione 14/05/2021:

* preparare i campioni nel Laemmli buffer 5 minuti a 98°C, per denaturare le proteine.
* Togliere il pettinino dal gel
* Montare i gel nella vaschetta elettroforetica
* Versare il Running Buffer nella cameretta
* Caricare il marker proteico e ciascun campione nell’ordine prestabilito alla sommità di ciascun pozzetto
* Collegare la cameretta elettroforetica ad un alimentatore elettrico, settare il voltaggio 80V all’inizio. Non appena il fronte del colorante entra nel Resolving gel aumentare il voltaggio a 150 V e correre il gel fintanto che esso non raggiunge la parte finale
* Preparare tutto il necessario per il trasferimento, ovvero: supporti, spugnette e carta assorbente e membrana di nitrocellulosa. Umidificare con il Transfer buffer le spugnette e la carta assorbente per preparare il sandwich.
* Togliere i vetrini dalla cameretta e utilizzando una spatolina applicare una leggera pressione sui vetrini e delicatamente recuperare il gel
* Preparare il sandwich facendo attenzione a non creare bolle tra la membrana e il gel:



* Inserire il supporto con il sandwich nella cella elettroforetica
* Collegare la cameretta elettroforetica ad un alimentatore elettrico, settare il voltaggio 350 per 1,30 h a 4°C.
* Terminato il trasferimento (le bande del marker si sono completamente trasferite sulla membrana) verificare medinate colorazione panceau il corretto trasferimento.

Giorno esercitazione 21/05/2021:

* disporre la membrana in una vaschetta con una soluzione di PBS+Tween 1X con 5% Milk dry no fat (Blocking solution), 1 h RT. In questo modo avviene il blocco dei siti di legame aspecifici.
* Incubare la membrana con l’anticorpo primario 1 h a temperatura ambiente su di un basculatore.
* Effettuare 3 lavaggi di 10 minuti ognuno con PBS-Tween 1X. Questo passaggio consente di eliminare l’anticorpo in eccesso che non si è legato.
* Incubare la membrana 1h a RT con l’anticorpo secondario, disporre la vaschetta con la membrana su di un basculatore.
* Effettuare 3 lavaggi di 10 minuti ognuno con PBS-Tween 1X. Questo passaggio consente di eliminare l’anticorpo in eccesso che non si è legato.
* Preparare in una tubo il substrato chemioluminescente (ECL)
* Disporre la membrana su un piano orizzontale e versare il substrato su di essa in corrispondenza della nostra proteina di interesse (vedere il peso molecolare e seguire l’indicazione del marker). Il tempo di esposizione è variabile a seconda dell’anticorpo utilizzato.
* Procedere alla lettura.