

Esercitazione Prof. Sallese
BIOCHIMICA DELLA TRASDUZIONE

Identificazione di segnali intracellulari attivati a seguito di stimolazione con EGF

Giorno I

Seminare $1,5 \times 10^6$ cellule in una flask T25 ed incubare a 37°C in 5% CO_2 o.n. nelle condizioni culturali standard

Giorno II

- Aspirare il surnatante cellulare contenente le cellule non adese
- Effettuare un lavaggio con PBS
- Aggiungere DMEM serum free

Giorno III

- Dopo 48 ore, aspirare il surnatante cellulare
- Trattare le cellule con 5 ml di terreno trattamento (DMEM serum free + EGF 100 ng/ml) per 10 minuti
- Aspirare il terreno
- Effettuare un lavaggio con PBS
- Aggiungere 0,5ml di buffer di lisi contenente gli inibitori di proteasi e fosfatasi per 20 minuti in ghiaccio
- Raccogliere il lisato cellulare e Centrifugarlo a 13000 rpm x 20 minuti
- Eliminare il pellet e trasferire il surnatante contenente le proteine da analizzare in una nuova provetta

DOSAGGIO PROTEICO CON METODO BRADFORD

Il saggio Bradford è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250
Il colorante libero (forma cationica) presenta un massimo di assorbimento a 465 nm,
dopo il legame con proteine l'assorbimento massimo si sposta a 595 nm e si presenta di
colore blu.

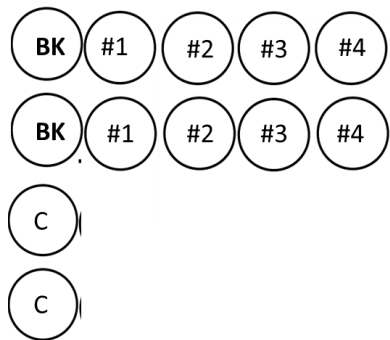
La curva standard per la concentrazione proteica viene ottenuta utilizzando concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA)

-
- Preparare la curva standard di BSA in duplicato direttamente nella multi-well a 96 pozzetti

	H ₂ O (μL)	BSA (μL)	BRADFORD (μL)
BIANCO	200	-	50
Punto 1 (1 μg/μL)	199	1	50
Punto 2 (2 μg/μL)	198	2	50
Punto 3 (4 μg/μL)	196	4	50
Punto 4 (8 μg/μL)	192	8	50

- Preparare il campione proteico di cui vogliamo conoscere la concentrazione. Facciamo sempre un duplicato direttamente nella multi-well a 96 pozzetti

	H ₂ O (μL)	campione (μL)	BRADFORD (μL)
campione	175	25	50



- Leggere la piastra a 595 nm

Calcolare la concentrazione delle proteine del nostro campione utilizzando la retta di

taratura ($Y=m*x+q$)

X = la concentrazione proteica del nostro campione

y = Assorbanza letta a 595 nm

Correggere per la diluizione