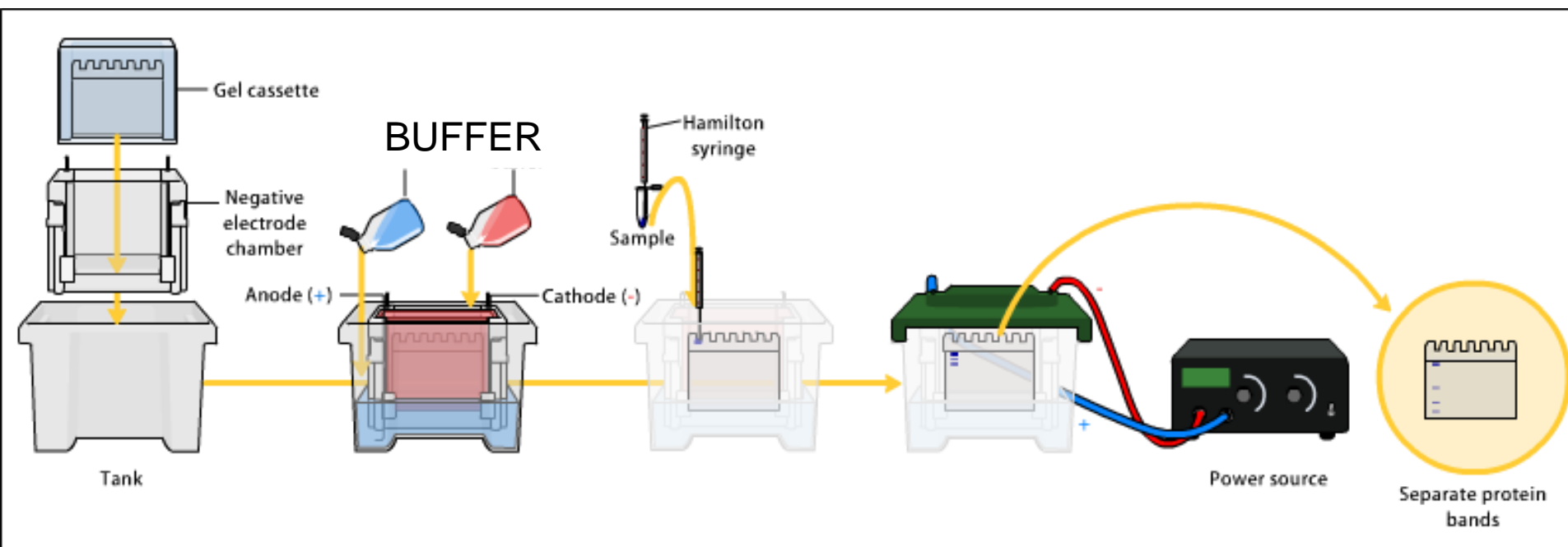
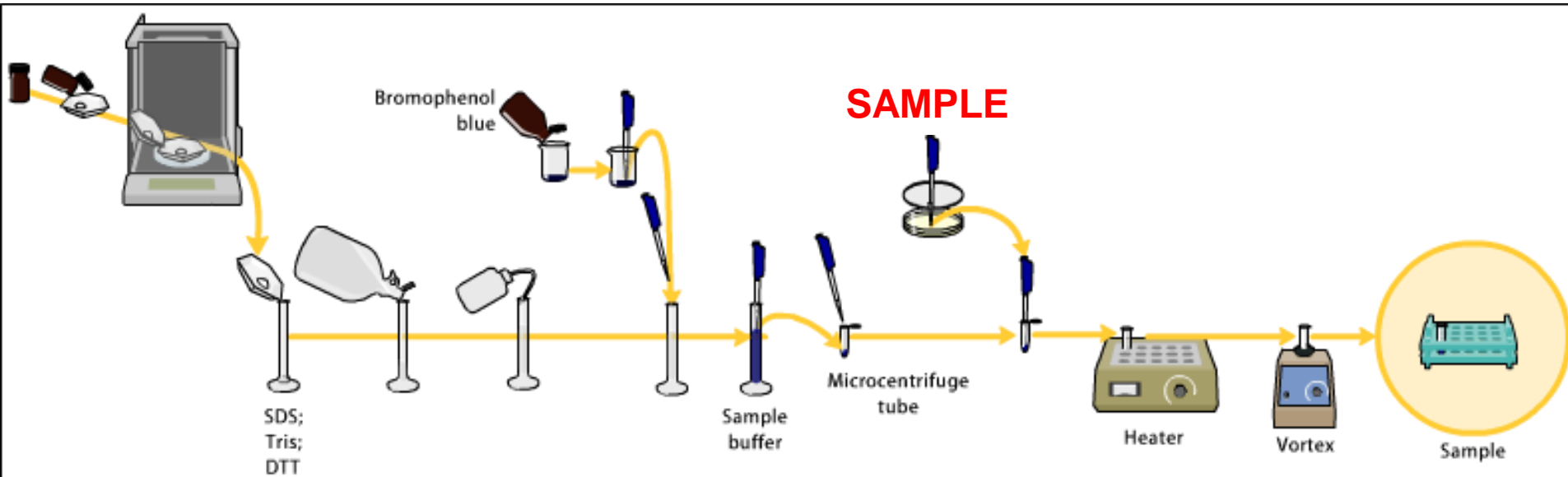


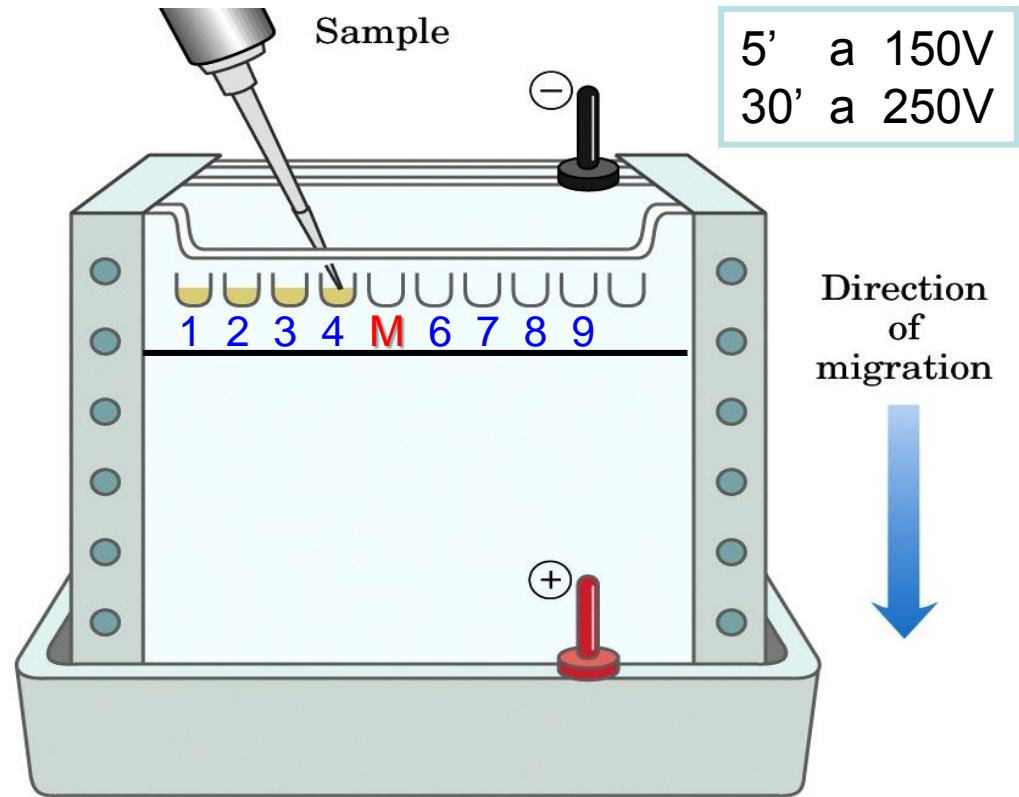
Western Blot 1^a giornata



Caricamento del gradiente di BSA

Preparare 60 μL di ciascun campione.

1. 2000 ng/ μL
2. 1000 ng/ μL
3. 500 ng/ μL
4. 250 ng/ μL
5. **Marker**
6. 250 ng/ μL
7. 500 ng/ μL
8. 1000 ng/ μL
9. 2000 ng/ μL



Caricamento di 20 μL campione + 20 μL sample Buffer 2X
Ogni campione è preparato in doppio.

SDS-PAGE

Sample buffer 2X:

Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante [Glicerolo]

tracciante [Blu di bromofenolo]

riducente [β -mercaptoetanol]

| | | |
|--------------------------|----------------|---------------|
| Tampone di corsa: | Tris | 25 mM |
| | SDS | 3.5 mM |
| | Glicina | 192 mM |

GEL DI PAA

1° (pronto in 15')

Running gel (8 mL) finale 10%

| | |
|-------------------|------------------|
| H ₂ O | 3,9 mL (3900 µL) |
| TRIS 1,5 M pH 8,8 | 2 mL |
| Acrilammide (40%) | 2 mL |
| SDS 20% | 40 µL |
| TEMED | 8 µL |
| APS 10% | 80 µL |

2° (pronto in 6')

Stacking gel (3 mL) finale 4%

| | |
|-------------------|---------|
| H ₂ O | 2300 µl |
| TRIS 1,0 M pH 6,8 | 380 µL |
| Acrilammide (40%) | 300 µL |
| SDS 20% | 15 µL |
| TEMED | 5 µL |
| APS 10% | 30 µL |

Trasferimento (Blot) classico

Preparazione del sandwich

Sulla estremità trasparente si assembla il seguente sistema elettroforetico

- Spugna
- 2 rettangoli di carta da filtro
- Filtrino di nitrocellulosa
- Gel di PAA
- 2 rettangoli di carta da filtro
- Spugna

Estremità **nera** rivolta verso la struttura nera della scatola.

40' a 100 V (schermo verde). Se scalda troppo, chiamare il docente!

Buffer di trasferimento (3L) Tris 25 mM

Glycina 192 mM

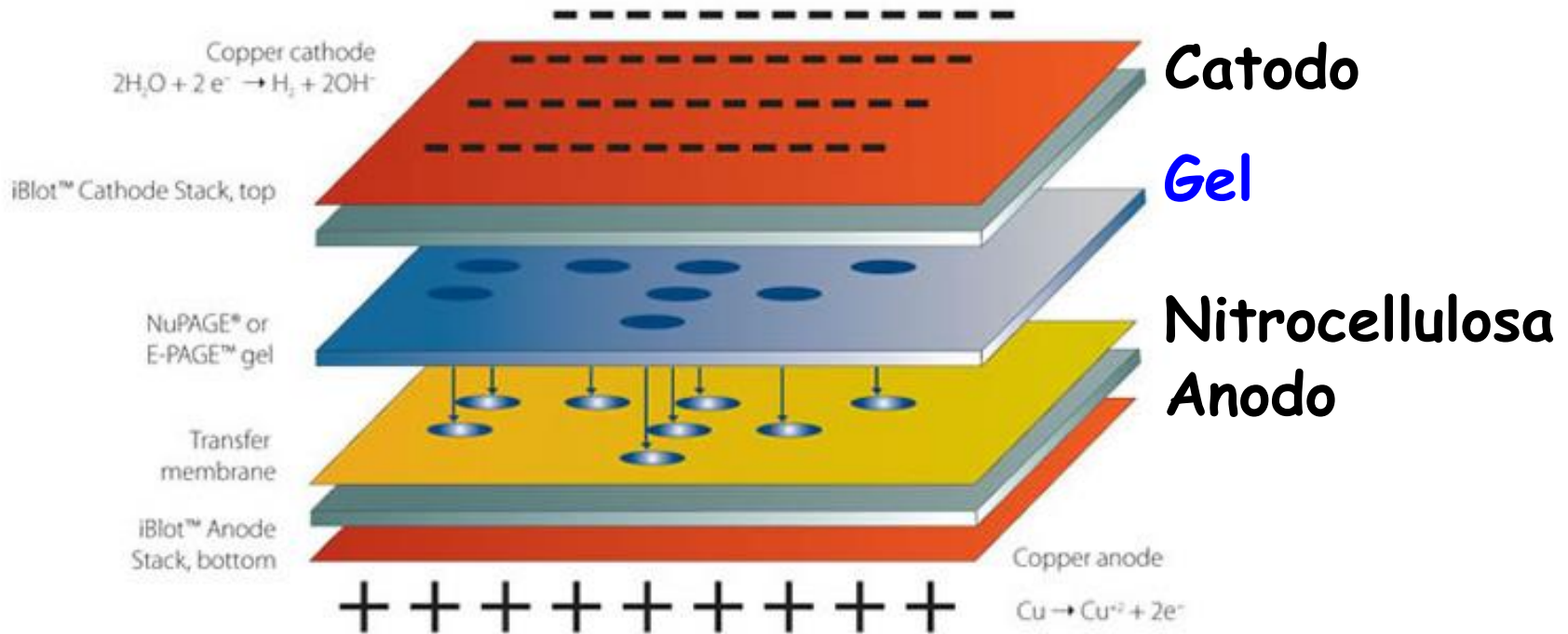
SDS 1%

Metanolo 20%

pH 8,3

iBlot dry blotting system

Generalità



PROTOCOLLO IBLOT

1. Riponi su fondo l'**anodo**
2. Poni il gel sopra la nitrocellulosa
3. Bagna con acqua distillata un filtrino di carta
4. Poni il filtro di carta sul gel
5. Passa il «mattarello»
6. Aggiungi il **catodo**
7. Passa il «mattarello»
8. Aggiungi la spugna sul coperchio
9. **START**

BLOCKING

Blocking Buffer

i filtri sono lasciati almeno 8h (ON) in una soluzione di:

Latte 5% p/V

Tween 20 0,1% V/V

PBS pH 7,4

CONSERVAZIONE FILTRI A -20°C

Dopo il blocking i filtri sono lavati 1-2 volte per 10 minuti in **TBS**, scolati, chiusi tra due strati di plastica trasparente e conservati a -20°C fino alle successive incubazioni con gli anticorpi.

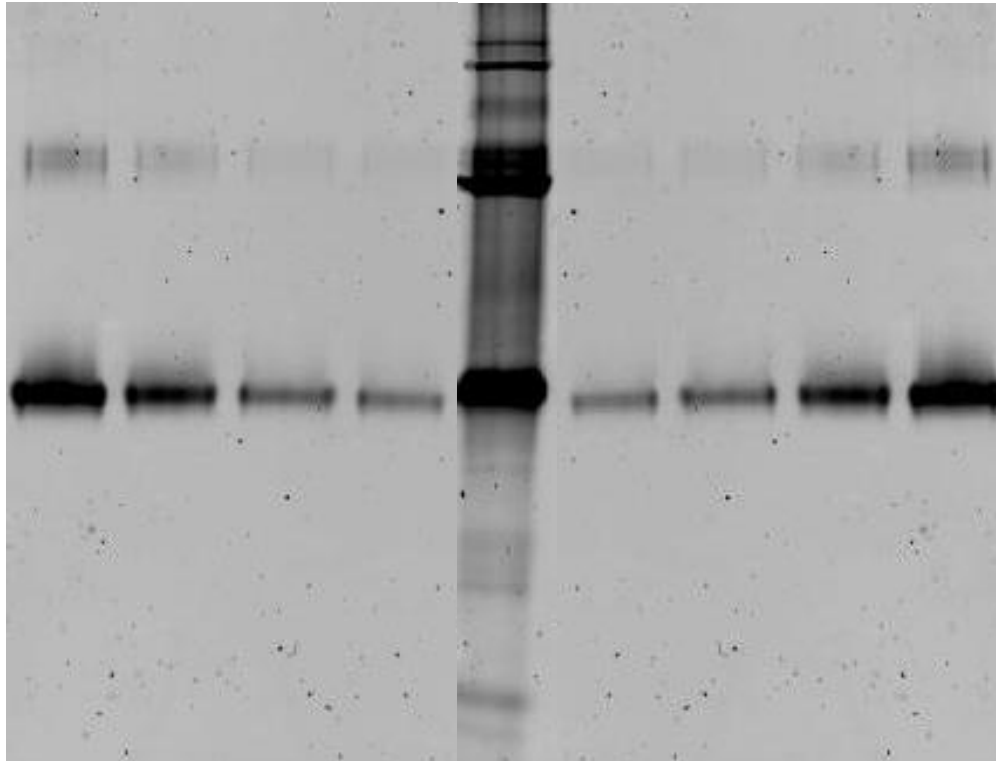
TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

PROTOCOLLO FLUORESCENZA

2° giorno

1. Ab anti-BSA (rabbit) dil 1/500 in latte (12 μ L in 6 mL)
2. 40' di incubazione a Tamb
3. 3 lavaggi (3x5') con latte (falcon da 50 mL)
4. Ab-anti rabbit marcato con Cy5, 3 mL dil 1/3000 in PBS
5. 30' di incubazione a Tamb
6. 3 lavaggi (3x5') con PBS
7. Determinazione della fluorescenza al Pharos FX

RISULTATO ATTESO DI LABORATORIO



PROTOCOLLO CHEMILUMINESCENZA

2° giorno

1. Ab anti-BSA (rabbit) dil 1/500 in latte (12 uL in 6 mL)
2. 40' di incubazione a Tamb
3. 3 lavaggi (3x5') con latte (falcon da 50 mL)
4. Ab-anti rabbit marcato con HRP, 10 mL dil 1/2000 in Latte (in PBS o TBS)
5. 30' di incubazione a Tamb
6. 3 lavaggi (3x5') con PBS
7. Determinazione della chemiluminescenza al Chemidoc

Determinazione della chemiluminescenza allo strumento Chemidoc

1. Miscelare la soluzione contenente luminolo con quella di perossido di idrogeno (350 μL + 350 μL).
2. Incubare la mix per 3' sulla superficie del filtro di nitrocellulosa, poi eliminare l'eccesso.
3. Trasferire il filtro fra due fogli di plastica trasparente.
4. Rilevare la chemiluminescenza ogni 30" per 10' (20 letture per 600" totali).