**LABORATORIO ONE HEALTH – Prof. Coccetti, Lab 1027 Ed. U3-Bios**

**Schema attività:**

Giorno 1:

piastramento cellule in mw96 per MTT

cambio mezzo piastre per saggio attività GST e western

preparazione gel per SDS-page

Giorno 2:

trattamento cellule con estratti per MTT

estrazione per saggio GST e per western blot, dosaggio Bradford

Giorno 3:

trattamento con acqua ossigenata piastre per MTT

caricamento gel e western blot

dosaggio GST

Giorno 4:

fine MTT

Sviluppo western blot

Discussione risultati

**Esperienza 1: VALUTAZIONE SENSIBILITA’ alla H2O2 tramite saggio MTT**

Il saggio MTT, la sigla indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), è un [saggio colorimetrico](https://it.wikipedia.org/wiki/Spettroscopia_UV/Vis) utilizzato per la misurazione dell'[attività](https://it.wikipedia.org/wiki/Catalisi_enzimatica) degli [enzimi](https://it.wikipedia.org/wiki/Enzimi) che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore violaceo. Questa analisi colorimetrica si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio giallo (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT) a cristalli viola di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive e vitali. Le cellule vitali contengono enzimi reduttasi NAD(P)H-dipendenti mitocondriali che riducono l’MTT a formazano.

Questo saggio viene utilizzato per determinare la vitalità delle cellule a seguito di specifici trattamenti.

Immagine che contiene testo, diagramma, Carattere, linea

Descrizione generata automaticamente

**Giorno 1: Piastramento cellule**

Ogni gruppo riceve 1 petri da 90 mm contenente cellule di neuroblastoma transfettate stabilmente per esprimere livelli più alti di α-synuclein: SH-SY5Y SYNUCLEIN.

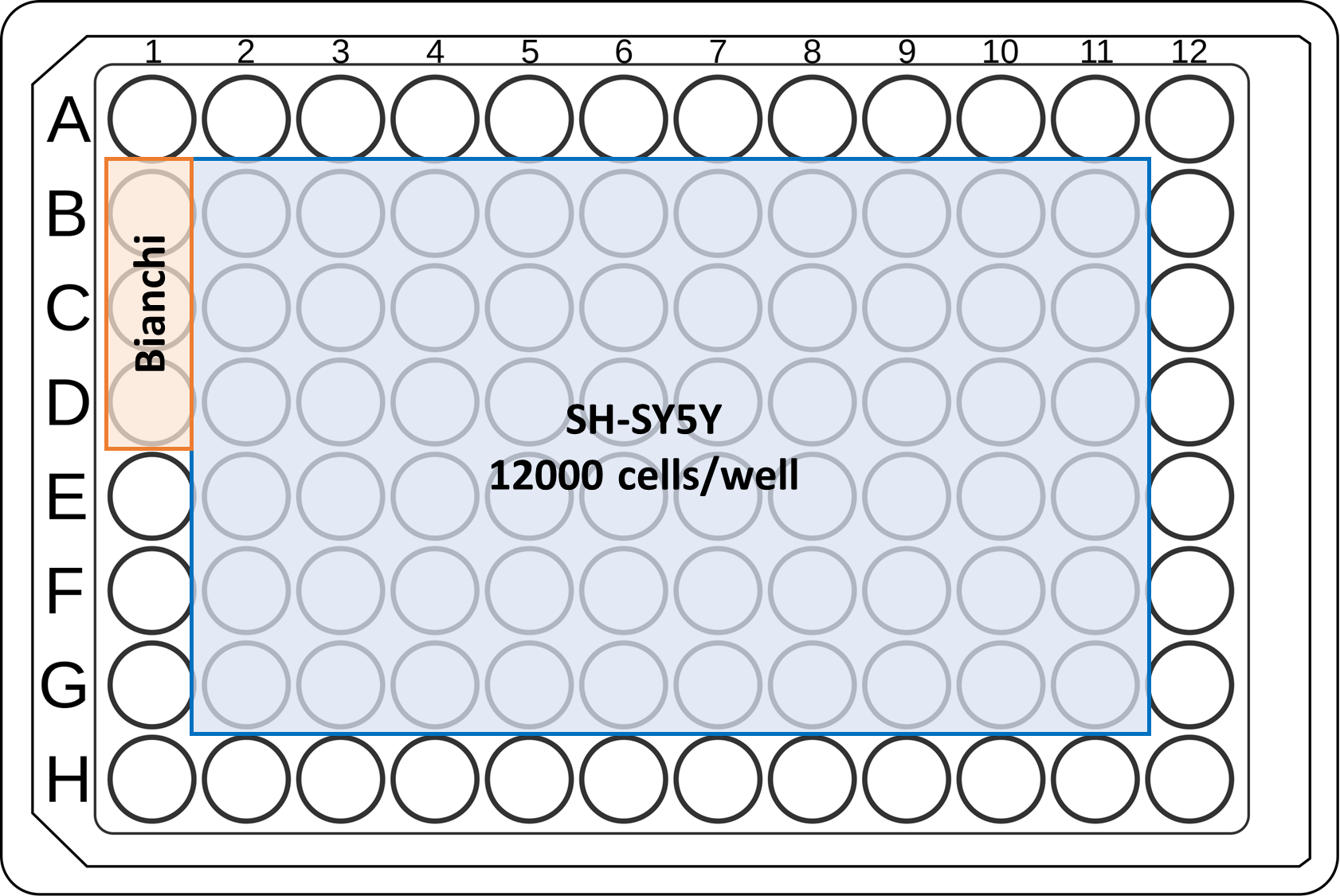
Piastrare 12.000 cellule in 60 pozzetti di una piastra multiwell da 96 secondo lo schema sotto riportato.

* Aspirare il mezzo dalla piastra contenente le cellule
* Fare due lavaggi con 4 mL PBS
* Aggiungere alle cellule la tripsina (1 mL) distribuendola, mediante blanda oscillazione della piastra, su tutta la sua superficie
* Rimettere le cellule con la tripsina nell’incubatore a CO2 lasciandole 2-3 minuti.
* Una volta verificato che tutte le cellule si siano staccate mediante osservazione al microscopio, raccogliere le cellule: prelevare 5 mL di mezzo di coltura e aggiungere alla piastra con le cellule.
* Risospendere le cellule nella piastra stessa, evitando il più possibile di formare bolle e cercando di separare più possibile le cellule tra di loro.
* Una volta risospese, aspirare tutto il liquido, contenete le cellule, dalla piastra e trasferirlo in un tubo sterile da 15 mL.
* Contare le cellule con la camera di Burker.

NB: Fare i calcoli come se si dovessero seminare 70 pozzetti (leggero eccesso). Quindi preparare una sospensione cellulare con 12.000 x 70 cellule = 840.000 cellule, in volume totale di 200 µL x 70 = 14 mL di terreno totale. Depositare 200 µL di sospensione cellulare in ogni pozzetto secondo lo schema indicato utilizzando la pipetta multicanale.

B= bianchi, solo terreno.

Riempire i restanti pozzetti con 200 µL di PBS per evitare l’evaporazione del terreno.



**CONTA DELLE CELLULE CON CAMERA DI BURKER**

* Prelevare una quantità sufficiente per riempire la griglia (10-15µL) sotto il vetrino monouso.
* Contare le cellule, contando le cellule presenti in tre riquadri della griglia secondo la diagonale segnata sotto.

Immagine che contiene linea, bianco e nero, monocromatico

Descrizione generata automaticamente

Immagine che contiene diagramma, linea

Descrizione generata automaticamente

Ingrandimento di uno dei riquadri,

le cellule nere sono da contare le cellule bianche no

Numero delle cellule/mL= cellule contate nei 3 riquadri x104

3

**Giorno 2: Cambio mezzo**

Preparare i terreni come segue:

-CONTROLLO SOLVENTE: 10 ml di terreno + 10 µL DMSO (concentrazione finale di DMSO 0.1%)

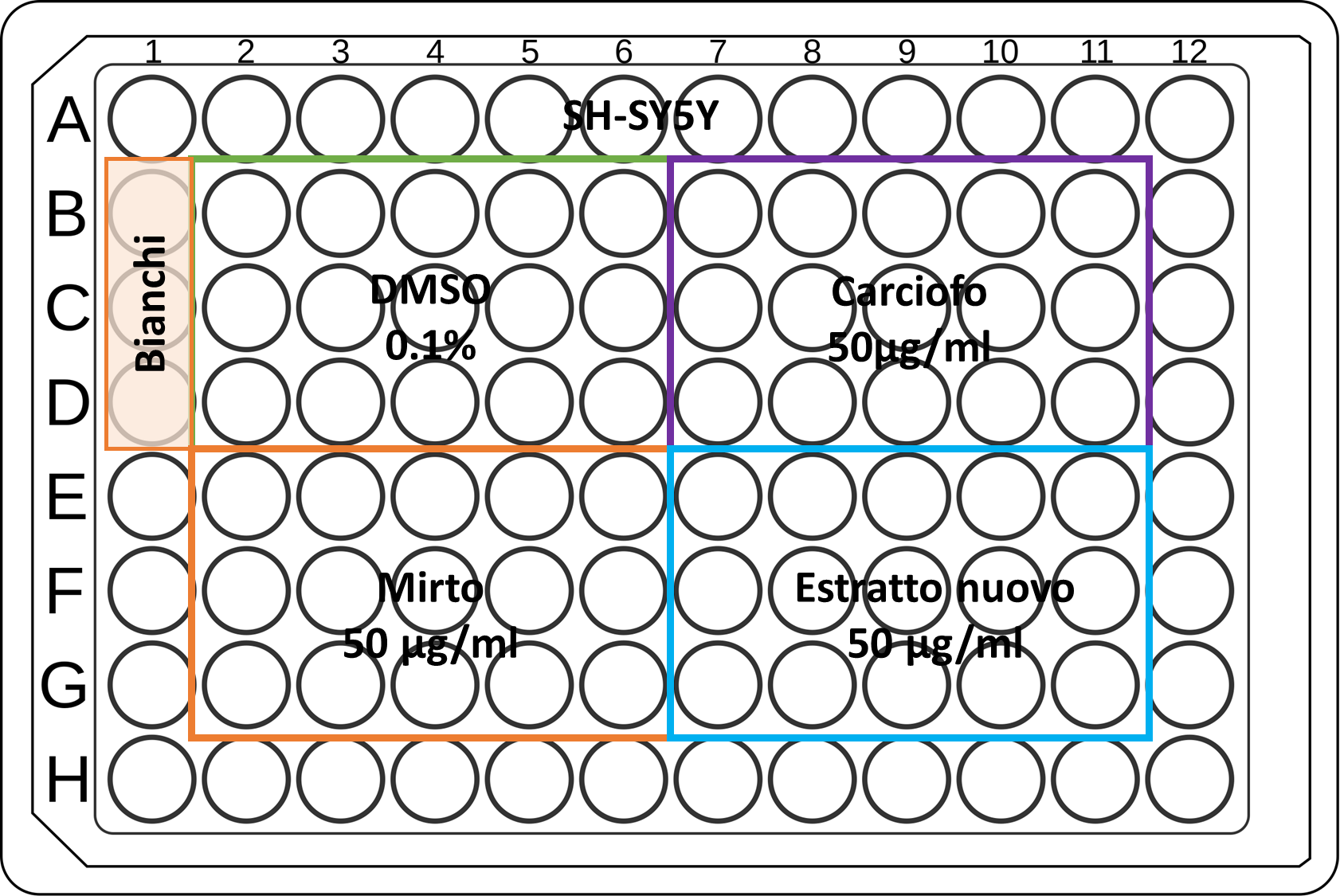
-Estratto di *Cynara cardunculus*: 10 ml di terreno + 10 µL estratto di carciofo 50 mg/ml (1000x)

-Estratto di *Myrtus communis*: 10 ml di terreno + 10 µL estratto di carciofo 50 mg/ml (1000x)

-ESTRATTO NUOVO di ciascun gruppo: 10 ml di terreno + 10 µL nuovo estratto 50 mg/ml (1000x), diverso per ciascun gruppo (preparato nel modulo Molecole bioattive naturali).

Poiché tutti gli estratti sono preparati in DMSO 100%, il controllo solvente presenterà la stessa quantità dello stesso solvente.

Utilizzando una pipetta multicanale aspirare il mezzo di crescita dai pozzetti, facendo attenzione a non toccare le cellule, e sostituirlo con 200 µL di terreno contenente i diversi estratti, secondo lo schema sotto riportato.



**Giorno 3: trattamento con H2O2**

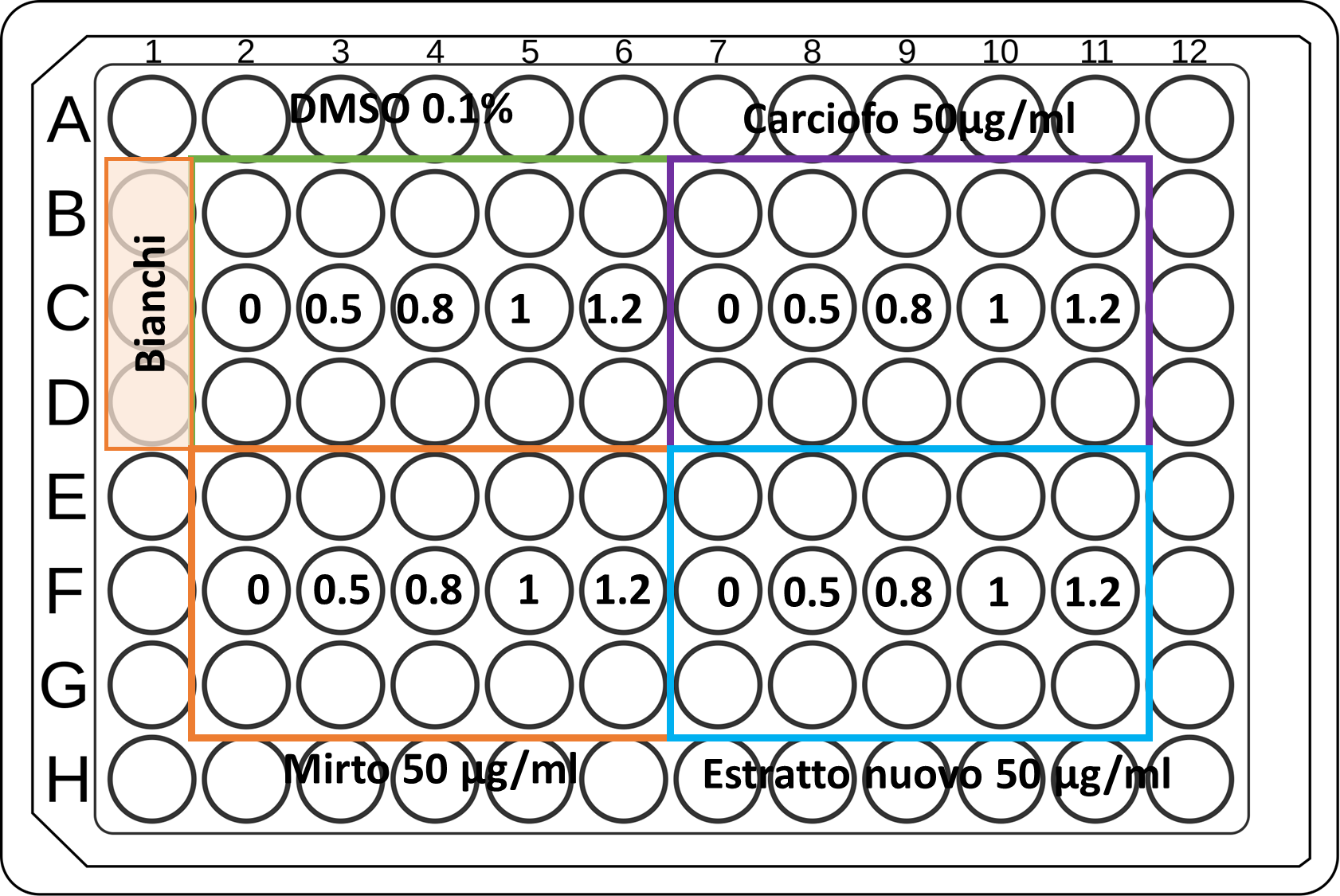
Preparare 20 provette da 1.5 ml contenenti 800 µL dei 4 terreni preparati ieri (DMSO, CARCIOFO, MIRTO, ESTRATTO NUOVO) contenenti diverse concentrazioni di acqua ossigenata: 0, 0.5 mM, 0.8 mM, 1 mM, 1.2 mM, a partire da uno stock 1 M.

Prima di procedere calcolare le quantità da prelevare secondo la tabella sotto riportata (da compilare):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **[H2O2]** | **Fattore di diluizione** | **Volume da prelevare** |
| 0 | - | - |
| 0.5 mM |  |  |
| 0.8 mM |  |  |
| 1 mM | 100x | 8 µL |
| 1.2 mM |  |  |

Attenzione: dovranno essere preparate 4 serie di provette con i 4 diversi terreni addizionati delle diverse quantità di acqua ossigenata.

Utilizzando una pipetta multicanale aspirare il mezzo di crescita dai pozzetti, facendo attenzione a non toccare le cellule, e sostituirlo con 200 µL di terreno contenente i diversi estratti, secondo lo schema sotto riportato.



**Giorno 4: saggio MTT**

Allestire in una piastra da 90 mm vuota la miscela per il saggio MTT: 8 ml terreno + 800 µl reagente MTT.

Usando una pipetta multicanale, eliminare il terreno dai pozzetti e aggiungere 100 µl della miscela preparata. Rimettere la piastra in incubatore a 37°C per 2-4h.

Osservare al microscopio la comparsa dei precipitati di formazano nelle cellule. Aggiungere 100 µl di tampone di solubilizzazione (senza togliere il terreno con l’MTT!!) e spipettare bene con la pipetta multicanale fino a completa solubilizzazione. Leggere assorbanza a 630 nm e analizzare i dati tramite il file Excel fornito.

Tampone di solubilizzazione:

10% Triton X-100

* 1. N HCl

in isopropanolo

**Esperienza 2: VALUTAZIONE DELL’ATTIVITA’ DELLA Glutatione S-transferasi**

La GST è un enzima in grado di catalizzare la coniugazione di glutatione ridotto (GSH) con substrati endogeni o xenobiotici a scopo di detossificare e mediare la protezione dallo stress ossidativo. Noi valuteremo l’attività di questo enzima in presenza/assenza degli estratti ottenuti in risposta al trattamento con acqua ossigenata (H2O2).

**Giorno 1: Trattamento delle cellule**

Ogni gruppo riceve 4 petri da 60 mm di cellule SH-SY5Y SYNUCLEIN (cellule di neuroblastoma transfettate stabilmente per esprimere livelli più alti di α-synuclein), pretrattate dai docenti per 24h con i 4 diversi terreni:

-CONTROLLO SOLVENTE

-CARCIOFO

-MIRTO

-ESTRATTO NUOVO (diverso per ogni gruppo)

Preparare 11 ml di ciascun terreno in 4 tubi da 15 ml, come segue:

11 ml di terreno + 11 µL DMSO (concentrazione finale di DMSO 0.1%) + 8.8 µL H2O2 1M (concentrazione finale 0.8 mM H2O2)

Ciascun gruppo eliminerà il terreno e lo sostituirà con 5 ml dei 4 terreni contenenti gli estratti e 0.8 mM H2O2

-CONTROLLO SOLVENTE

-CARCIOFO

-MIRTO

-ESTRATTO NUOVO (relativo a ciascun gruppo)

**Giorno 2: Preparazione dei lisati cellulari per attività enzimatica**

* Lavare le cellule con 2 mL di PBS 1X (2 volte), in modo da eliminare ogni residuo di terreno di coltura e anche residui cellulari.
* Aggiungere 100 µL di buffer di lisi\*, staccare le cellule meccanicamente con la spatola (scraper).
* Raccogliere il lisato con p200 e trasferirlo in tubi da 1.5 mL
* Centrifugare la soluzione a 13000 rpm (rotazioni per minuto) per 15 minuti a 4°C, quindi prelevare il surnatante e trasferirlo in un tubo nuovo da 1.5 mL.
* Si procede con il dosaggio delle proteine (vedi dopo).

\***buffer di lisi:** 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10% glicerolo, 5 mM EDTA, inibitori delle proteasi

**DOSAGGIO DELLE PROTEINE CON IL METODO BRADFORD**

**Allestimento della retta di taratura**

La retta di taratura viene allestita usando Albumina di Siero Bovino (BSA) a concentrazione nota. Nel nostro caso si usano 3 diverse quantità: 2.5, 5, e 7.5 µg di BSA.

Lo stock di BSA fornito ha una concentrazione di 100 ng/µl, quindi

2.5 µg = 25 µl

5 µg = 50 µl

7.5 µg = 75 µl

Il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford viene effettuato in un volume finale di 1 mL, direttamente nelle cuvette, con:

• BSA alle diverse concentrazioni (vedi schema sopra)

• reagente Bradford 200 µl (reagente 5x)

• H2O fino al volume finale di 1 mL

Il colorante di Bradford si lega ai gruppi amminici e carbossilici degli amminoacidi, in particolare dell’arginina, conferendo una colorazione blu alla soluzione in funzione della concentrazione proteica in essa contenuta.

Per preparare il dosaggio proteico compilare la seguente tabella:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | H20 | Bradford 5x | BSA 100 ng/µl | Campione |
| 1 | Bianco |  |  |  |  |
| 2 | BSA 2.5 µg |  |  |  |  |
| 3 | BSA 5 µg |  |  |  |  |
| 4 | BSA 7.5 µg |  |  |  |  |
| 5 | Estratto (una cuvetta per ciascun estratto 🡪7 cuvette totali) |  |  |  |  |

Bisogna sempre preparare anche un “bianco”, cioè un campione che contiene solo H2O + Bradford (800 µl di H2O + 200 µl Bradford). Questo campione serve a dare uno zero allo spettrofotometro.

Una volta preparati i campioni per la retta di taratura, si preparano i campioni per determinare la concentrazione dei nostri lisati cellulari.

Questi campioni vengono preparati usando gli stessi reagenti (H2O e Bradford) ma utilizzando le seguenti quantità:

* Estratto proteico o lisato cellulare: 2 µl
* H2O: 798 µl
* Bradford: 200 µl

Una volta preparati sia i campioni per la retta di taratura che i campioni da determinare (lisati cellulari), vengono mischiati utilizzando il Parafilm bene e lasciati a temperatura ambiente almeno 5 minuti.

Dopo 5 minuti tutti vengono letti allo spettrofotometro a 595 nm.

Per una misurazione sufficientemente precisa i valori letti devono oscillare tra 0.1 e 0.8 OD. A valori più alti la misurazione perde la sua accuratezza e quindi è necessario diluire l’estratto cellulare.

Per iniziare la misurazione si tara lo spettrofotometro sul bianco, cioè si azzera l’apparecchio.

Quindi si leggono i campioni e tutti i valori vengono segnati.

**Calcolo della concentrazione proteica**

Per calcolare la concentrazione proteica dei nostri estratti si usa la retta di taratura di BSA, costruita su excel, nel seguente modo:



Assorbanza

595 nm

[BSA] µg/mL nel saggio

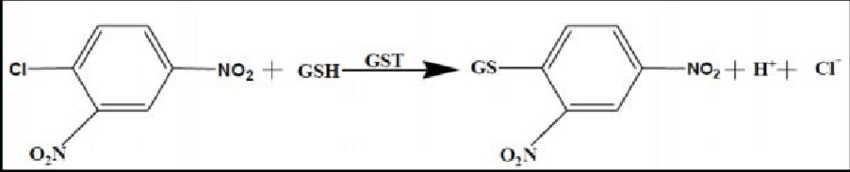
Servendosi della retta di taratura è possibile estrapolare i valori di concentrazione dei campioni (lisati).

**SAGGIO DELLA GLUTATIONE-S-TRANSFERASI (GST)**

**Giorno 3**

L’attività della GST viene misurata attraverso un saggio allo spettrofotometro secondo il seguente schema:

GSH + CDNB 🡪GS-DNB + HCl



Misuriamo quindi la detossificazione da un substrato artificiale (CDNB) in presenza di GSH da parte della GST presente negli estratti cellulari.

**Procedimento:**

* Mettere in ciascuna cuvetta:

900 μl tampone 100 mM KPO4 pH 6.5

50 μl 20 mM GSH

50 μl 20 mM CDNB

Si azzera lo spettrofotometro e si fa partire la reazione aggiungendo 50 μg di estratto. Se segue la cinetica nel tempo (3 min) a 340 nm.

* Calcolare l’attività della GST (mM/min\*µg di estratto) nel seguente modo:

**U GST/µg = (ΔA340nm/ min) / (1 cm \* 9.6 mM-1 cm-1 \* 50 µg di estratto)**

ε =9.6 (mM-1 cm-1), coefficiente di estinzione molare dei coniugati GS-CDNB a 340 nm.

Calcolare l’attività per tutti gli estratti e valutare le differenze rispetto all’estratto delle cellule nel terreno di controllo (solo solvente).

**ESPERIENZA 3: ANALISI ATTIVAZIONE APOPTOSI TRAMITE WESTERN BLOT**

Lo stress ossidativo può indurre apoptosi nelle cellule. Noi valuteremo l’attivazione della apoptosi in presenza/assenza dei nostri estratti in risposta all’acqua ossigenata.

**Giorno 1: Trattamento delle cellule**

Ogni gruppo riceve 3 petri da 60 mm di cellule SH-SY5Y SYNUCLEIN (cellule di neuroblastoma transfettate stabilmente per esprimere livelli più alti di α-synuclein), pretrattate dai docenti per 24h con i 3 diversi terreni:

-CONTROLLO SOLVENTE

-CARCIOFO

-ESTRATTO NUOVO (diverso per ogni gruppo)

Ciascun gruppo eliminerà il terreno e lo sostituirà con i 3 terreni contenenti gli estratti e 0.8 mM H2O2 (preparati insieme a quelli per i trattamenti delle altre piastre, vedi sopra):

-CONTROLLO SOLVENTE

-CARCIOFO

-ESTRATTO NUOVO

**Giorno 2: Preparazione dei lisati cellulari per valutare l’attivazione dell’apoptosi**

In questo caso raccoglieremo sia le cellule ancora vive (adese alla piastra) che quelle morte (in sospensione). Per ognuna delle 3 piastre trattate procedere come segue:

* Raccogliere il terreno (contenente le cellule morte) in un tubo da 15 ml
* Lavare le cellule con 2 mL di PBS 1X (2 volte), in modo da eliminare ogni residuo di terreno di coltura
* Aggiungere 500 µL di tripsina e mettere in incubatore 2-3 min
* Raccogliere le cellule staccate in tripsina sempre nello stesso tubo
* Centrifugare la soluzione a 1200 rpm (rotazioni per minuto) per 5 minuti, quindi rimuovere molto bene tutto il surnatante
* Aggiungere 50 µL di buffer di lisi e trasferire in una eppendorf da 1.5 mL, aspettare 5 minuti
* Centrifugare la soluzione a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C, quindi prelevare il surnatante (estratto totale) e trasferirlo in un tubo nuovo da 1.5 mL.
* Si procede con il dosaggio delle proteine (vedi sopra).

\***buffer di lisi:** 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10% glicerolo, 5 mM EDTA, inibitori delle proteasi

**Preparazione dei campioni in Laemli buffer**

I campioni da caricare sul gel vengono preparati miscelando un volume di campione corrispondente a 30 µg di estratto ad un opportuno volume di Laemli buffer 4X (volume finale di 30 µL).

NOTA: le quantità da caricare potranno variare in base alla concentrazione degli estratti ottenuti da ciascun gruppo.

Estratto proteico volume corrispondente a 30 µg

Laemli buffer (4x) 7.5 µL

Acqua fino a volume finale di 30 uL

Il Laemli buffer contiene BBF, un colorante anionico che serve per visualizzare la corsa, in quanto possiede una mobilità elettroforetica superiore a quella delle proteine, glicerolo, che ha la funzione di appesantire il campione consentendone la stratificazione sul fondo del pozzetto, β-mercaptoetanolo che riduce i ponti disolfuro delle proteine favorendone la denaturazione, SDS (sodiododecilsofato), un detergente anfipatico che legandosi alle proteine conferisce loro una carica netta negativa e consentirà la migrazione elettroforetica indipendentemente dalle cariche presenti sulle proteine, facendo sì che esse vengano separate solo in base alla differente massa molecolare.

Una volta allestiti i campioni, si denaturano le proteine trattando a 95°C per 5 minuti.

**Giorno 1: Preparazione gel per SDS-PAGE**

Si tratta di un’elettroforesi condotta in condizioni denaturanti e si utilizza un sistema discontinuo di gel di poliacrilammide: un “running gel” a pH 8.8, con una percentuale di poliacrilammide che può variare tra il 7 e il 15% (nel nostro caso 10%) e uno “stacking gel” a pH 6.8, con una percentuale di poliacrilammide del 4%. La presenza dello stacking gel consente una compattazione delle bande proteiche che entrano sotto forma di bande molto sottili nel running gel, dove verranno separate in base alla loro massa molecolare.

I gel ed i tamponi necessari alla separazione elettroforetica sono allestiti come indicato di seguito (1 gel ogni 4 gruppi).

**Running gel 10% (10 mL)**

|  |  |
| --- | --- |
| H2O distillata | 3.2 mL |
| 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.4% SDS | 2 mL |
| Acrilammide/bisacrilammide 30% | 2.7 mL |
| Ammonio persolfato (10%) | 52 µL |
| TEMED | 8 µL |

**Stacking gel 4% (3 mL)**

|  |  |
| --- | --- |
| H2O distillata | 1.8 mL |
| 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0.4% SDS | 787 µL |
| Acrilammide/bisacrilammide 30% | 480 µL |
| Ammonio persolfato (100 mg/mL) | 20 µL |
| TEMED | 8 µL |

N.B.: ammonio persolfato e TEMED vengono aggiunti alle soluzioni pochi attimi prima del caricamento nel gel caster.

**Giorno 3: Caricamento del gel**

I campioni precedentemente preparati vengono caricati sul gel in presenza anche di una miscela di proteine markers. Si avrà a disposizione un gel ogni quattro gruppi.

Ogni gruppo caricherà i propri 3 estratti su gel. Prima di caricare decidere e segnarsi l’ordine di caricamento!

Buffer di corsa

25 mM Tris, glicina 250 mM pH 8.3, 0.1% SDS

Gli apparati per elettroforesi sono collegati ad un generatore di corrente, viene applicata una corrente costante di 20 mA per lastrina (amperaggio costante). La corsa viene interrotta quando il colorante tracciante (blu di bromofenolo) raggiunge il fondo del running gel.

**Western blotting**

La tecnica consiste nel trasferimento su filtro nitrocellulosa di proteine precedentemente separate mediante SDS-elettroforesi su gel di poliacrilammide.

Il filtro di nitrocellulosa viene fato aderire al gel, eliminando con attenzione tutte le bolle d’aria presenti tra i due strati. Il gel ed il filtro vengono quindi posti tra fogli di carta imbevuti nel tampone di trasferimento. Si forma così un *sandwich* che consente una perfetta adesione tra gel e filtro.

Le proteine, cariche negativamente, migrano verso il polo positivo, escono dal gel e si legano al filtro di nitrocellulosa. Il trasferimento viene condotto in un apparato per il blotting rapido (Turbo Blot).

Al termine del trasferimento si procede alla immunodecorazione nel modo seguente:

* saturazione 60 minuti a temperatura ambiente in una soluzione al 5% (p/v) di latte in polvere senza grassi sciolto in TBS 1X Tween-20 0.1%;
* Taglieremo il filtro in due parti, in corrispondenza del protein marker da 52 kDa, perché synuclein è 18 kDa, PARP è 116-89 kDa); incubazione over night 4°C con gli anticorpi primari (anticorpo anti PARP e anti-synuclein) diluiti 1:1000 in TBS1X, latte 5%, Tween-20 0.1%.

**Giorno 4:**

* 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con una soluzione TBS-Tween20 0.1% (v/v);
* Incubazione di 1h con l’anticorpo secondario anti-rabbit (anticorpo anti-IgG di coniglio) coniugato alla perossidasi di rafano, diluito 1:5000 in TBS1X, latte 5%, Tween20 0.1%;
* 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con una soluzione TBS-Tween20 0.1% (v/v).

Si procede poi alla rivelazione tramite il metodo ECL Plus *Western Blotting detection System*. Tale sistema si basa su un fenomeno di chemioluminescenza, un semplice metodo che consente di evidenziare specifici antigeni mediante l’utilizzo di anticorpi legati alla perossidasi di rafano.

La soluzione test contiene H2O2, luminolo ed un *chemical enhancer*. La perossidasi catalizza la seguente reazione: 2 H2O2→ 2 H2O + O2.

L'ossigeno liberato ossida il luminolo che emette luce. L'emissione viene aumentata dal *chemical enhancer*. La luce emessa durante un'esposizione di tempo variabile è in funzione dell'intensità del segnale.

Il filtro immunodecorato viene coperto con la soluzione ECL preparata al momento dell'uso unendo le soluzioni di luminolo e di perossido di idrogeno in un rapporto volumetrico 1:1. Successivamente il segnale viene rilevato mediante il sistema Chemidoc e viene acquisita l’immagine.