

## SDS-PAGE delle proteine estratte

### 1. Caricamento delle proteine estratte

- 1.1. Scongellare le proteine estratte nella precedente esperienza in ghiaccio.
- 1.2. Calcolare quanti  $\mu\text{l}$  di estratto dovete utilizzare per caricare  $150 \mu\text{g}$  di proteine totali.
- 1.3. Prima di caricare le proteine nei pozzetti, aggiungere di Laemmli Sample Buffer 4X, portandolo a concentrazione finale 1X.
- 1.4. Calcolare la diluizione:

$$462 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\frac{15.000 \text{ ng}}{462 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 32 \mu\text{l}$$

Reagente	Concentrazione	Quantità
Laemmli Sample Buffer	4X	<del>10</del> 11 $\mu\text{l}$
Proteine	150 $\mu\text{g}$	32 $\mu\text{l}$
	<b>TOTALE</b>	43 $\mu\text{l}$

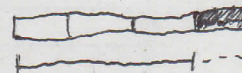
- 1.5. Bollire la miscela a  $99^\circ\text{C}$  per 10'.
- 1.6. Caricare sul pozzetto assegnatovi.

$$4 \cdot x = 1 (y - x)$$

$$x = \frac{1}{4} (y - x) \quad x = \frac{1}{3}$$

### 2. Corsa elettroforetica 1'20 circa.

- 2.1. Connettere la camera di corsa con l'alimentatore.
- 2.2. Impostare una ddp di 120 V costanti.
- 2.3. Verificare la corretta partenza della corsa.
- 2.4. Attendere la fuoriuscita del fronte contrassegnato dal colorante utilizzato in fase di caricamento.
- 2.5. Durante la corsa, procedere al punto 3.



### 3. Preparazione del gel di acrilamide

- 3.1. Questa fase verrà eseguita col nostro supporto.
- 3.2. Predisporre l'apparato per allestire un casting del gel elettroforetico.
- 3.3. Calcolare la quantità necessaria di ogni reagente per preparare il Running/Resolving Gel:

Resolving Gel	Concentrazione	Quantità
Acrylamide/bis	40%	3,2
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	25%	2,0
10% SDS solution	1%	0,8
10% Ammonio persolfato	1%	0,8
TEMED	0,1%	0,08
<del>dal H<sub>2</sub>O</del> <del>PBS</del> <del>1*</del>	a volume totale	1,12
	<b>TOTALE</b>	<b>8 ml</b>

- 3.4. Miscelare tutto su Falcon da 50 ml.
- 3.5. Aliquotare velocemente la miscela tra i vetri del gel; tenere l'eccesso nella Falcon per confronto.
- 3.6. Stratificare sino a riempimento con alcol isopropilico.
- 3.7. Attendere la polimerizzazione (confermata dall'eccesso sulla Falcon).

→ PESO-O<sub>2</sub> (e' un depolimerizzante)



3.8. Durante la polimerizzazione del Resolving Gel, preparare il Electrode Running Buffer: 10x

	Concentrazione	Quantità
Tris base	3%	9
Glycine	14,4%	43,2
SDS 10% solution	0,1%	3
	<b>TOTALE</b>	<b>300 ml</b>

3.9. A questo punto, a polimerizzazione del primo gel avvenuta, eliminare l'isopropanolo.

3.10. Asciugare con un pezzetto di carta bibula.

3.11. Calcolare la quantità necessaria di ogni reagente per preparare lo Stacking Gel:

Stacking Gel	Concentrazione	Quantità
Acrylamide/bis	61%	3,05
1,5M Tris-HCl, pH 6,8	25%	1,25
10% SDS solution	1%	0,05
10% Ammonio persolfato	1%	0,05
TEMED	0,2%	0,01
ddH <sub>2</sub> O	a volume totale	0,59
	<b>TOTALE</b>	<b>5 ml</b>

3.12. Miscelare tutto su Falcon da 50 ml.

3.13. Aliquotare velocemente la miscela tra i vetri del gel; tenere l'eccesso nella Falcon per confronto.

3.14. Inserire il pettine per formare i pozzetti di caricamento.

3.15. Attendere la polimerizzazione di questo gel.

#### 4. Colorazione del gel

4.1. Smontare i vetri che racchiudono i gel di corsa; per questa fase attendere il nostro supporto.

4.2. Lavare i gel 3 volte per 5' in ddH<sub>2</sub>O.

4.3. Porre i gel in 10 ml di Coomassie Blue Staining.

4.4. Colorare per circa 1h.

4.5. Lavare i gel 5 volte in ddH<sub>2</sub>O.

POZZETTO N° 4

1 2 3 4

marker