

RELAZIONE LABORATORIO DI BIOCHIMICA A-K**DATA:** 03/10/2023

LETT ERA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	O	Q	R	S	T	U	V	Z	W	Y
N.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4

INSERISCI DI SEGUITO IL CODICE NUMERICO CORRISPONDENTE ALLE PRIME 4 CIFRE DEL CODICE FISCALE

Cod. FISCALE:

Assorbanza Misurata :

C	S	T	
3	8	9	

ESERCITAZIONE N.1**DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA MEDIANTE IL SAGGIO DI QUANTIFICAZIONE BRADFORD**

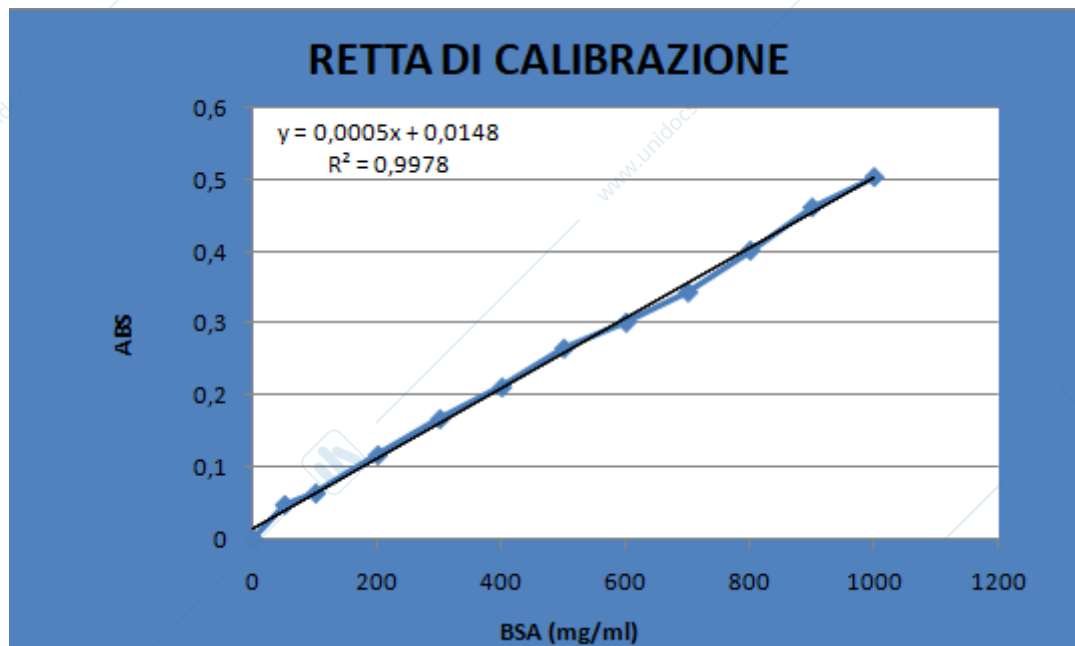
Costruire retta di calibrazione del contenuto proteico (espresso come mg/ml di BSA) dai dati riportati in tabella

	[BSA] (mg/ml)	ABS
Std 0	0	0
Std 1	50	0,048
Std 2	100	0,064
Std 3	200	0,117
Std 4	300	0,167
Std 5	400	0,211
Std 6	500	0,265
Std 7	600	0,301
Std 8	700	0,343

Std 9	800	0,401
Std 10	900	0,461
Std 11	1000	0,503

Calcolare il contenuto proteico, dalla retta di calibrazione tenuto conto che l'estratto proteico ha un valore di :

Assorbanza Misurata: 0,389



$$y = 0,0005x + 0,0148$$

$$0,389 = 0,0005x + 0,0148$$

$$x = 748,4 \text{ mg/ml}$$

Concentrazione proteica: 748,4 mg/ml

Considerando che l'estratto proteico ha un valore di assorbanza pari a **0,389**, calcolando il contenuto proteico, tramite la retta di calibrazione, la concentrazione proteica risulta essere **748,4 mg/ml**

ESERCITAZIONE N.2

SDS-PAGE

Preparazione dell'estratto proteico per l'elettroforesi.

DENATURAZIONE DEL CAMPIONE – SAMPLE BUFFER.

PROTOCOLLO ANALITICO: Per la denaturazione del campione viene impiegato un buffer **concentrato 2 X**, costituito da 2% SDS, 20% glicerolo, 20 mM Tris-Cl, pH 6,8, 2 mM di etilene diammina tetraacetico (EDTA), 160 mM di ditiotreitolo (DTT) e 0,1 mg/ml di colorante blu bromfenolo. Una buona denaturazione si ottiene miscelando un'aliquota di campione a una concentrazione finale di 4 mg/ml di proteina con 1 aliquota di sample buffer concentrato 2X (diluizione 1:1). In modo da ottenere una concentrazione proteica finale di **2 mg/ml di proteina** con 1% SDS, 10% glicerolo, 10 mM Tris-Cl, pH 6,8, 1 mM di etilene diammina tetraacetico (EDTA), un agente riducente come ditiotreitolo (DTT) o 2-mercaptoetanololo. E riscaldando per 5 minuti la miscela in un bagno d'acqua impostato a 95°C

CALCOLARE LA QUANTITÀ DI ESTRATTO PROTEICO A CONCENTRAZIONE X mg/ml (VEDI IL RISULTATO OTTENUTO DALL'ESERCITAZIONE 1) DA PRELEVARE PER PREPARARE 10 ml DI ESTRATTO PROTEICO A CONCENTRAZIONE 4 mg/ml.

La concentrazione proteica nell'estratto che presenta un'assorbanza pari a 0,389 risulta essere 748,4 mg/ml. Applicando la seguente formula, possiamo calcolare la quantità di estratto proteico da prelevare per preparare 10 ml di estratto proteico a concentrazione 4 mg/ml

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$4 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} = 748,4 \text{ mg/ml} \times V2$$

$$V2 = 0,05 \text{ ml (50 } \mu\text{l)}$$

CHE PIPETTA VIENE UTILIZZATA PER IL PRELIEVO? (INDICARE IL RANGE DI IMPIEGO DELLA PIPETTA)

Per il prelievo si utilizza una micropipetta P100, in quanto preleva volumi con un range

10-100 μl

RISPONDERE ALLE SEGUENTI DOMANDE

SUPPONENDO DI PREPARARE 200 μ l DELL'ESTRATTO PROTEICO DENATURATO (A CONCENTRAZIONE DI 2 mg/ml DI PROTEINA). QUANTO CAMPIONE A CONCENTRAZIONE PROTEICA DI 4 mg/ml OCCORRE PRELEVARE?

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$2 \text{ mg/ml} \times 0,2 \text{ ml} = 4 \text{ mg/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{2 \text{ mg/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{4 \text{ mg/ml}} = 0,1 \text{ ml} = 100 \mu\text{l}$$

CHE PIPETTA VIENE UTILIZZATA PER IL PRELIEVO? (INDICARE IL RANGE DI IMPIEGO DELLA PIPETTA)

Per il prelievo si utilizza una micropipetta P100, in quanto preleva volumi con un range 10-100 μ l

QUANTO BUFFER CONCENTRATO 2 X OCCORRE PRELEVARE?

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$4 \text{ mg/ml} \times 0,1 \text{ ml} = 2 \text{ mg/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{4 \text{ mg/ml} \times 0,1 \text{ ml}}{2} = 0,2 \text{ ml} = 200 \mu\text{l}$$

considerato che abbiamo 100 μ l di campione, si esegue la seguente operazione

$$V2 = \frac{200 \mu\text{l}}{2} = 100 \mu\text{l} \text{ di buffer da prelevare}$$

(rapporto 1:1)

CHE PIPETTA VIENE UTILIZZATA PER IL PRELIEVO? (INDICARE IL RANGE DI IMPIEGO DELLA PIPETTA)

Per il prelievo si utilizza una micropipetta P100, in quanto preleva volumi con un range 10-100 μ l

IMPORTI DA CARICARE NEL POZZETTO

TENENDO CONTO CHE IN OGNI POZZETTO DEL GEL OCCORRE CARICARE 20 μ g DI PROTEINA . QUAL È IL VOLUME DI CAMPIONE CHE OCCORRE PRELEVARE E CARICARE NEL POZZETTO DEL GEL DI SDS?

Avendo una concentrazione di 2 mg/ml, cioè 2000 μ g di proteina per 1000 μ g di campione; se volessimo ottenere 20 μ g di proteina dobbiamo fare la seguente proporzione:

$$2000 \mu\text{g} : 1000 \mu\text{l} = 20 \mu\text{g} : x \mu\text{l}$$

$$x = \frac{1000 \mu\text{l} \times 20 \mu\text{g}}{2000 \mu\text{g}}$$

$$x = \frac{20000}{2000} = 10 \mu\text{l}$$

ESERCITAZIONE N.3

ANALISI WESTERN BLOT

ESEGUIRE UN'ANALISI CRITICA DEL SEGUENTE ARTICOLO (IN ALLEGATO IL FILE PDF). (VEDI PARAGRAFI 5 E 6)

In vitro assessment of nutraceutical compounds and novel nutraceutical formulations in a liver-steatosis-based model

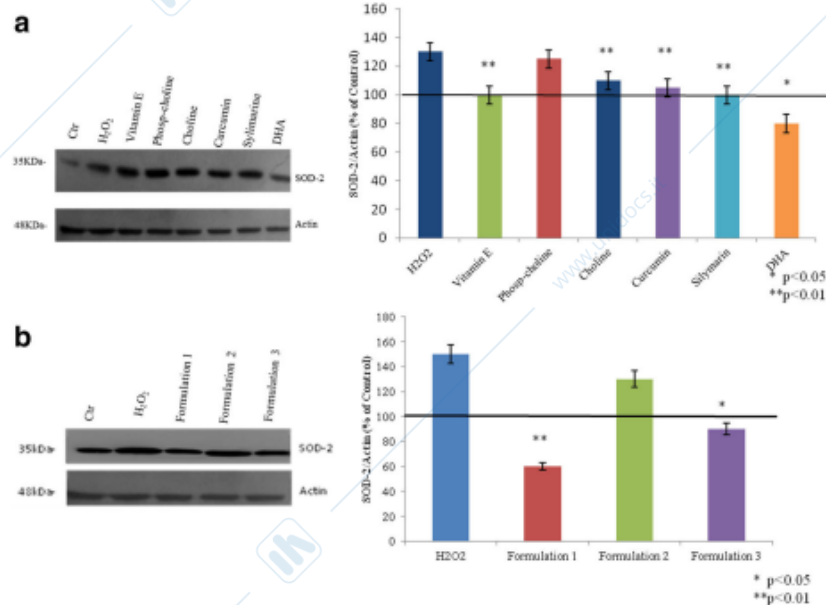
Valutazione in vitro di composti nutraceutici e nuove nutraceutici formulazioni in un modello basato sulla steatosi epatica

SPECIFICARE LO SCOPO DELLA RICERCA. COSA È STATO OSSERVATO MEDIANTE ANALISI WESTERN BLOT? QUALE PROTEINA HOUSEKEEPING È

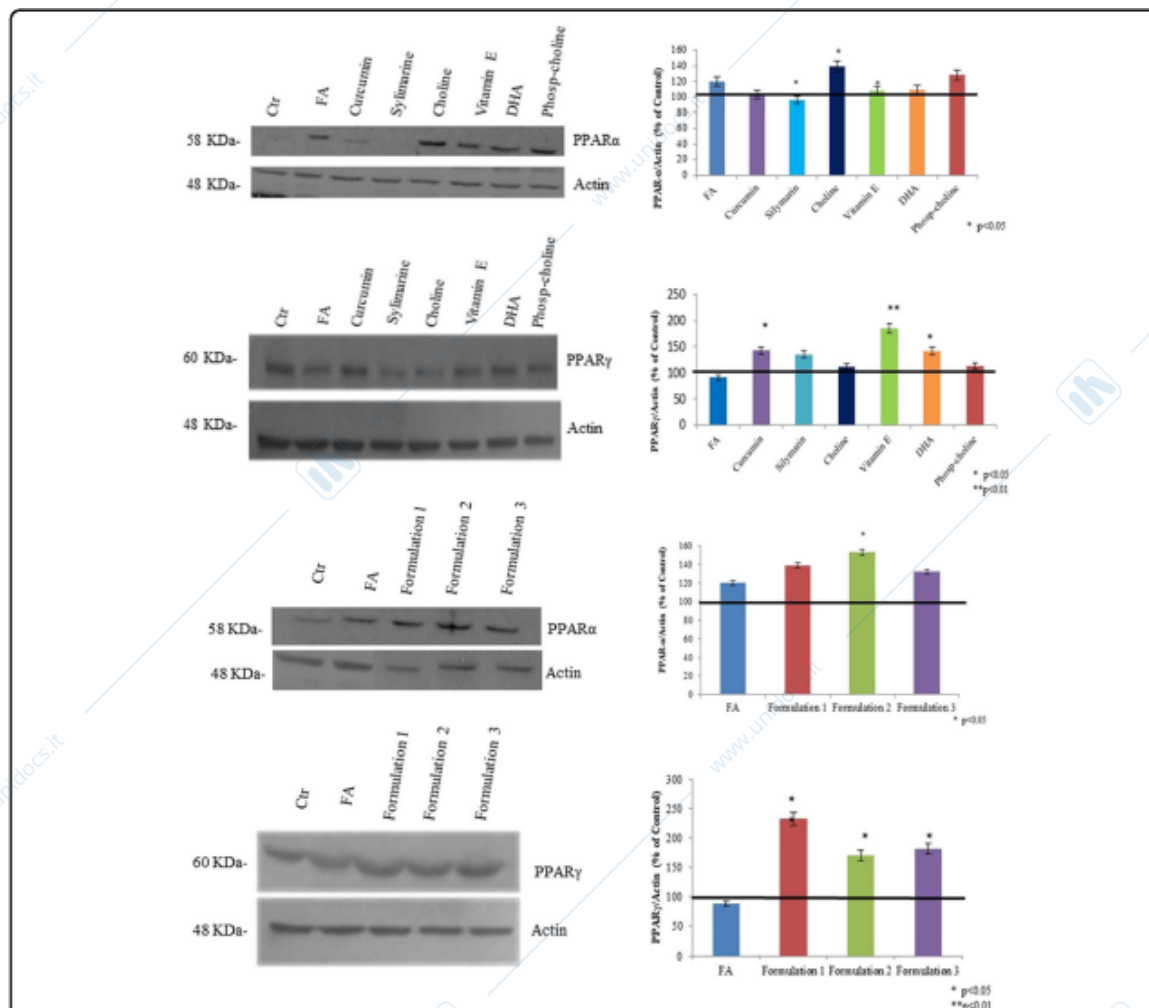
STATA UTILIZZATA E PERCHÉ? GLI ANTICORPI ED IL METODO DI DETECTION IMPIEGATI. QUALI RISULTATI SONO STATI OTTENUTI?

Questo **studio** mira a determinare un meccanismo capace di combinare diversi composti nutraceutici al fine di valutare gli effetti sinergici su un modello di steatosi in vitro rispetto al loro uso separato. In particolar modo, sono state analizzate tre diverse formulazioni a base di **silimarina**, **curcumina**, **vitamina E**, **acido docosaesaenoico (DHA)**, **colina** e **fosfatidilcolina**. La steatosi è una malattia epatica cronica che dipende dall'accumulo di acidi grassi intracellulari. Ad oggi, non è stato autorizzato nessun trattamento per la steatosi .

Per ogni proteina analizzata si è usato il metodo di analisi western blotting, un metodo che permette di identificare una specifica proteina, contenuta all'interno di una determinata miscela di proteine, identificata grazie all'uso di specifici anticorpi. La **Beta-actina** (PROTEINA HOUSEKEEPING) è comunemente usata come controllo del caricamento Western blot poiché è espressa in tutti i tipi di cellule eucariotiche e non è influenzata dai trattamenti cellulari. L'actina viene utilizzata per normalizzare i risultati.



Nella fase di analisi western blotting le proteine sono state estratte utilizzando il tampone R0278, successivamente sono state determinate le concentrazioni utilizzando un reagente di dosaggio proteico. Nelle analisi western blotting, sono stati utilizzati anticorpi quali, anti-topo, anti-coniglio e anti-capra coniugati con perossidasi di rafano (metodo di detection impiegato). Le **analisi western blotting** hanno mostrato una significativa riduzione della SOD-2 in presenza di DHA da solo. Inoltre si evince dai risultati che PPAR α è stato aumentato in presenza di acidi grassi, forse come risposta fisiologica cellulare. Questo incremento è più evidente quando le cellule HepG2 sono state trattate con composti nutraceutici, in particolare in presenza di colina.



I risultati ottenuti possono essere considerati un supporto adeguato per affrontare la malattia da steatosi accanto al regime dietetico obbligatorio.

