

## **SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 24**

**TITOLO:** Farmacologia e Fisiologia Cellulare– Pharmacology and Cellular Physiology

**Responsabile scientifico:** Bruno D'Agostino

**Settore/i Scientifico-Disciplinari di riferimento:**

BIO/14-BIO/09

**RADoR:** Bruno D'Agostino, Pieter De Lange

**Tipologia:** BIOLOGICO

**Gruppi afferenti:** Farmacologia e Fisiologia

### **LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE**

- Piano seminterrato del Corpo A del DISTABIF (locale 1A2.1)
- dimensioni: 41 m<sup>2</sup>
- n. 6 postazioni di lavoro

### **ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO**

- PCR-real time
- Immunoblotting
- Immuno-staining in situ
- Elisa
- Preparazione e processamento di campioni istologici animali e umani non infettivi
- Immunoprecipitazione
- Isolamento acidi nucleici

### **RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE**

#### **1. PCR-real time**

L'attività va svolta sotto cappa a flusso laminare e muniti di camice e guanti monouso in nitrile. I campioni da sottoporre all'analisi vengono addizionati alle soluzioni idonee mediante micropipette e puntali sterili e RNAasi free e aggiunti in piastre per sistema PCR. Le piastre vengono, quindi, caricate nello strumento e avviato il programma idoneo.

#### **PRIMA DELL'UTILIZZO DELL'HPLC**

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).
- Assicurarsi che la cappa a flusso laminare funzioni adeguatamente e il flusso sia impostato con corretti parametri di sicurezza.

#### **DURANTE L'UTILIZZO**

- Verificare il corretto avvio delle analisi.
- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti della strumentazione.
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR).

#### **DOPO L'UTILIZZO**

- Spegnere la strumentazione, procedere al riordino banco di lavoro.
- Procedere al corretto smaltimento dei rifiuti prodotti.

## **2. Immunoblotting**

Lisati proteici saranno separati su gel di acrilammide mediante elettroforesi verticale e successivamente trasferiti su filtri per elettroforesi orizzontale (ellettroblotting). L'attività di immuno-detezione va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I filtri posti in petri, vengono trattati con soluzioni di blocco di siti aspecifici, anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Dopo l'incubazione i filtri verranno lavati con apposite soluzioni (salina tamponato da TRIS con un sapone (Tween))

## **3. Immuno-staining in situ**

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni, fissati su vetrini, vengono trattati con soluzioni di blocco di siti aspecifici, anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Solitamente, le soluzioni utilizzate sono costituite da Tween-20 e TritonX-100 e da albumina sierica bovina in concentrazioni che possono andare da 0,1 a 0,5% a seconda della tipologia di campione. Dopo il tempo necessario di incubazione e dopo aver inserito vetrini copri oggetto, i campioni vanno conservati a -20°C.

## **4. Elisa**

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni vanno caricati in piastre da 96 pozzetti e trattati con soluzioni contenenti anticorpi primari e secondari mediante micropipette e puntali sterili. Solitamente, le soluzioni utilizzate sono costituite da anticorpi coniugati con perossidasi in concentrazioni che possono variare a seconda della tipologia di produttore. Dopo il tempo necessario di incubazione va letta l'assorbanza di ciascun campione mediante lettore di piastre.

## **5. Preparazione e processamento di campioni istologici animali e umani non infettivi.**

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso e mascherina in caso di manipolazione di sostanze tossiche. I campioni raccolti devono essere conservati in formalina o buffer idoneo fino all'inizio delle analisi. I campioni vengono processati mediante impiego di xylene e alcol a diverse concentrazioni per effettuare la disidratazione del tessuto e la successiva inclusione in paraffina. Dal blocchetto di paraffina è possibile ottenere sezioni di tessuto da fissare su vetrino per effettuare colorazioni immunoistochimiche o di immunofluorescenza. Il tessuto può essere congelato anche "a secco" per poi includerlo in soluzione indicata per l'estrazione di acidi nucleici e/o proteine. Alcuni campioni biologici come i lavaggi broncoalveolari (BAL) possono essere conservati a 4 °C fino ad una settimana per misurare mediatori molecolari e/o estrarre cellule.

## **6. Immunoprecipitazione**

L'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso. I campioni proteici verranno incubati in una soluzione contenente biglie dotate di uno specifico anticorpo, dopodiché le biglie saranno centrifugate per procedere con la procedura di immunoblotting (punto 2)

## **7. Isolamento acidi nucleici**

Per l'isolamento del DNA, l'attività va svolta sul banco di lavoro munendosi di camice e guanti monouso in nitrile. Ai campioni vengono aggiunte soluzioni contenenti TrisHCl 0.01M e EDTA 0.001M e soluzioni contenenti TrisHCl 0.01M, EDTA 2mM e NaCl 400 mM mediante micropipette e puntali sterili. I campioni vengono, quindi sottoposti a centrifugazione. Successivamente vengono aggiunti 350ul di proteinasi K e 100 ul di SDS AL 10% e lasciati a bagno a 37°C overnight. Il giorno successivo si aggiungono 2ml di NaCl e si effettua un'ulteriore centrifuga. Dopo l'aggiunta di isopropanolo glaciale ed etanolo al 75% il campione viene lasciato asciugare e quantificato.

Per l'isolamento dell'RNA l'attività va svolta sotto cappa a flusso laminare e muniti di camice e guanti monouso in nitrile. Il campione viene trattato con 1ml di reagente Trizol per 50-100mg di tessuto e lasciato incubare. Vengono poi aggiunti 0.2 ml di cloroformio e sottoposti a centrifugazione. La fase acquosa

recuperata viene trattata con isopropanolo glaciale e centrifugata. Il pellet di RNA viene solubilizzato con etanolo 75%, viene lasciato asciugare all'aria e quantificato.

#### **LISTA DELLE ATTREZZATURE PRESENTI:**

1. Incubatore a CO2 per colture cellulari
2. Sistema per RT-PCR
3. Sistema per trasferimento proteine su filtro (Western blotting)
4. Vortex
5. Basculante (n.2)
6. Pompa peristaltica
7. Pompa a vuoto (n.2)
8. PH metro
9. Sistema per perfusione e ventilazione polmonare per roditori
10. Agitatore termoregolato
11. Bagnetto termostato
12. Termomixer
13. Centrifuga da banco per eppendorf da 1.5 e 2 ml
14. Bilancia

#### **LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE GENERALE (DPG):**

1. Cappa a flusso laminare (BIOBASE UNIDIREZIONALE VERTICAL CLASSE I)

#### **LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALI (DPI) AD USO PERSONALE DEGLI OPERATORI:**

- Guanti monouso in nitrile
- Guanti monouso in lattice
- Occhiali di protezione
- Mascherine FP3
- Camice monouso

#### **Categorie ISI WEB di riferimento:**

Pharmacology, Physiology

#### **Categorie ERC di riferimento:**

- **LS1 Molecules of Life: Biological Mechanisms, Structures and Functions**
  - ✓ LS1\_2 Biochemistry
  - ✓ LS1\_3 DNA and RNA biology
  - ✓ LS1\_9 Molecular mechanisms of signalling processes
- **LS2 Integrative Biology: from Genes and Genomes to Systems**
  - ✓ LS2\_3 Epigenetics
  - ✓ LS2\_4 Gene regulation
- **LS3 Cell Biology, Development, Stem Cells and Regeneration**
  - ✓ LS3\_5 Cell signaling and signal transduction, exome biology
  - ✓ LS3\_6 Organelle biology and trafficking
- **LS4 Physiology in Health, Disease and Ageing**
  - ✓ LS4\_4 Endocrinology
  - ✓ LS4\_7 Nutrition and exercise physiology
  - ✓ LS4-9 Metabolism and metabolic disorders, including diabetes and obesity
- **LS5 Neuroscience and Disorders of the Nervous System**

- ✓ LS5\_1 Neuronal cells
- **LS7 Prevention, Diagnosis and Treatment of Human Diseases**
  - ✓ LS7\_7 Pharmacology and toxicology

[SCHEDE DI SICUREZZA](#)