



## **NORME GENERALI DI COMPORTAMENTO DA OSSERVARE NEI LABORATORI DIDATTICI**

- **Indossare Dispositivi di protezione individuale (DPI): camice (protezione del corpo) e guanti (protezione delle mani);**
- **indossare scarpe chiuse;**
- **raccogliere, ove richiesto, i capelli dietro la nuca;**
- **attenersi al corretto smaltimento di qualsiasi tipo di rifiuto;**
- **leggere le schede di rischio e sicurezza dei diversi reagenti utilizzati riportate alla fine della dispensa;**
- **leggere le schede di sicurezza e di uso degli apparecchi utilizzati**

**Tutte le fasi operative dell'esercitazione sono eseguite dagli studenti sotto la supervisione del docente Responsabile Attività Didattica e di Ricerca in Laboratorio (RADRL)**

## **Titolo esercitazione: Purificazione mediante cromatografia di affinità della Ss- $\beta$ Galattosidasi (Ss $\beta$ Gly) e sua caratterizzazione**

L'esercitazione si divide in quattro parti ciascuna delle quali caratterizzata da una metodica sperimentale specifica:

- 1)** purificazione, a partire da un estratto proteico, della proteina Ss- $\beta$  Galattosidasi (Ss $\beta$ Gly), espressa come proteina di fusione GST-Ss $\beta$ Gly in *Escherichia coli* (vedi esercitazioni del corso di Biologia Molecolare): **cromatografia di affinità.**
- 2)** Determinazione della concentrazione proteica dei campioni in dotazione: **metodo colorimetrico di Bradford.**
- 3)** Analisi elettroforetica della proteina purificata per valutarne peso molecolare e grado di purezza: **Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS PAGE).**
- 4)** analisi dell'attività enzimatica della proteina purificata mediante saggio di attività galattosidasi: **dosaggio spettrofotometrico.**

### **1° parte - Purificazione della Ss $\beta$ Galattosidasi mediante cromatografia di affinità e digestione proteolitica con trombina – operazioni preliminari condotte dal docente.**

L'estratto proteico di partenza contiene la proteina chimerica GST-Ss $\beta$ Gly, espressa in cellule di *Escherichia coli*. Tale proteina è costituita dall'enzima Glutathione S-Tranferasi (GST) e dall'enzima termostabile dell'archaeon termofilo *Sulfolobus solfataricus*, la Ss $\beta$  Galattosidasi (Ss $\beta$ Gly). Le due proteine, GST e Ss $\beta$ Gly, sono unite da un peptide di connessione contenente la sequenza amminoacidica LVPRGS, sito di idrolisi della proteasi trombina.

Al fine di purificare la proteina Ss $\beta$ Gly mediante cromatografia di affinità e digestione con trombina, la proteina GST-Ss $\beta$ Gly presente nell'estratto di *E. coli* è stata preliminarmente legata alla fase stazionaria costituita da Glutathione (GSH) immobilizzato su biglie di Sefarosio (resina GSH Sefarosio 4B). Il legame della proteina chimerica GST-Ss $\beta$ Gly sulla resina è mediato dall'enzima GST che presenta un'alta affinità per il GSH.

## PROTOCOLLO SPERIMENTALE 1° PARTE

### Purificazione di SsβGly mediante cromatografia di affinità

- **Riempimento della colonna cromatografica con resina GST-Sepharose 4B attivata:**  
Aggiungere in colonna 2 mL di resina attivata e lavare con 20 mL di tampone PBS<sup>A</sup>.
- **Proteolisi della proteina di fusione GST- SsβGly mediante soluzione contenente trombina:**
  - Aggiungere 3 mL di miscela PBS contenente 30 U di trombina<sup>B</sup>
  - Incubare 1 h a temperatura ambiente ponendo la colonna, leggermente inclinata, su un agitatore basculante.
- **Eluizione della proteina SsβGly**
  - lavare la resina con 5 mL di tampone PBS
  - e raccogliere l'eluato in frazioni da 0.5 mL.

### Soluzioni da utilizzare:

<sup>A</sup> PBS: 0.137M NaCl<sup>1</sup>, 0.01M Fosfato di Sodio<sup>2</sup>, 0.0027M Fosfato di Potassio<sup>3</sup>, 1% Triton X-100<sup>4</sup>

<sup>B</sup> Soluzione Trombina: trombina 1 U/ml in PBS<sup>5</sup>

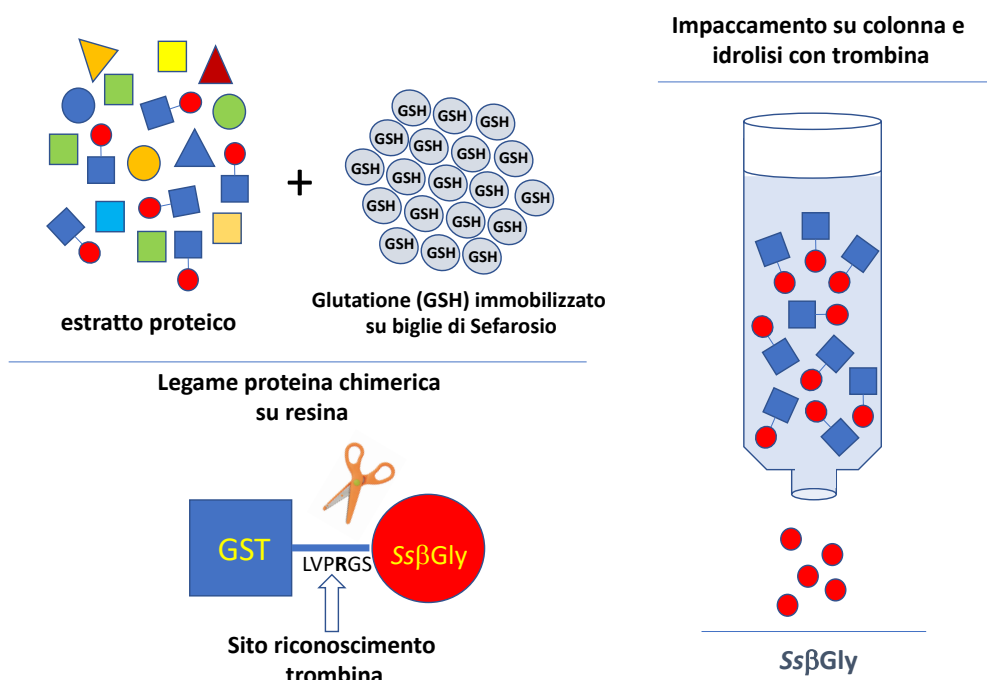
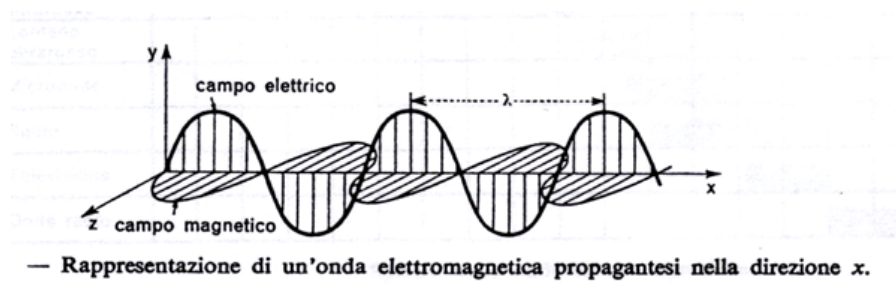


Fig. 1 Purificazione mediante cromatografia di affinità di SsβGly

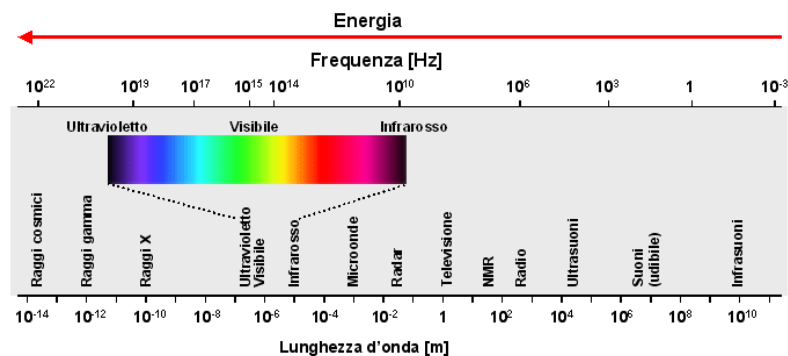
## 2° parte. Determinazione spettrofotometrica della concentrazione proteica di una miscela proteica con metodo colorimetrico indiretto di Bradford

### Note di spettrofotometria

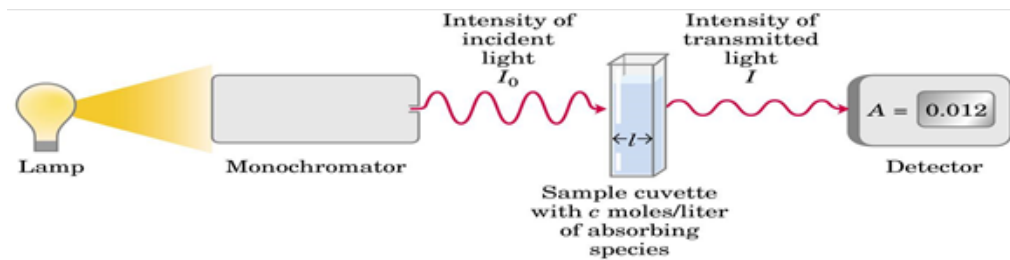
Le tecniche spettroscopiche si basano sull'interazione, cioè lo scambio di energia, della radiazione elettromagnetica con la materia. Tale energia radiante può essere rappresentata come 1) un'onda elettromagnetica fatta di un insieme fluttuante di campi elettrici e magnetici che si propagano nello spazio in modo periodico o 2) come una serie di pacchetti discreti d'energia, i fotoni.



La lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) è definita come la distanza tra due punti dell'onda aventi la stessa fase. L'energia di questa onda elettromagnetica varia in funzione delle differenti lunghezze d'onda. Lo spettro elettromagnetico rappresenta l'insieme delle radiazioni ed è costituito da una serie di fotoni o d'onde elettromagnetiche d'energia crescente. Esso viene diviso in regioni caratteristiche corrispondenti a campi ben definiti di energia.



La regione dello spettro maggiormente usata per rilevare proteine in soluzione riguarda lunghezze d'onda che vanno approssimativamente tra i  $120 \sim 400$  nm per l'ultravioletto (anche se la zona utilizzata è più ristretta) e i  $400 \sim 800$  nm per il visibile.



L'interazione dell'energia radiante a determinate lunghezze d'onda con la materia viene rivelata da un apposito strumento, lo **spettrofotometro**. Ogni sostanza avrà una propria caratteristica lunghezza d'onda a cui assorbirà la luce incidente e la misura di tale assorbimento in funzione della lunghezza d'onda costituisce una sorta di "impronta digitale" della sostanza.

Dalla misura dell'assorbanza di una soluzione proteica si possono ricavare due tipi di informazioni differenti a seconda del campione:

- una informazione qualitativa, cioè verificare se nella soluzione sono presenti questo tipo di molecole
- una informazione di concentrazione se trattasi di specie pura.

**Per la misurazione della concentrazione di una specie pura in soluzione**, esiste un'equazione che permette di calcolare la concentrazione di una sostanza in soluzione ed è la legge di Lambert-Beer, la quale può essere enunciata come segue: la quantità di luce assorbita da una soluzione è funzione della concentrazione della sostanza assorbente e della lunghezza del cammino ottico. L'equazione risulta essere:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

**A** = Assorbanza misurate come densità ottiche (OD), cioè il valore che si legge sullo spettrofotometro;

**$\epsilon$**  = Coefficiente di estinzione (Molare o mg/ml), cioè corrisponde all'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda a cui la sostanza mostra il massimo di assorbimento, quando il campione è in concentrazione di 1 M o 1 mg/ml e il cammino ottico è di 1 cm.

**l** = cammino ottico, cioè lo spessore del campione, ovvero la distanza percorsa dalla luce nell'attraversare il campione.

**Per la determinazione della concentrazione di una miscela proteica si utilizza il metodo colorimetrico indiretto.**

In una miscela in cui sono presenti diverse specie proteiche, ognuna con il proprio coefficiente di estinzione, non è possibile applicare la legge di Lambert e Beer. In questo caso per determinare la

concentrazione proteica della miscela, si procede per via indiretta tramite metodo colorimetrico. Quantità note di una proteina di riferimento, generalmente l'albumina di siero bovino (BSA), sono mescolate a quantità fisse di un reattivo che si lega alle proteine sviluppando una colorazione che avrà un massimo di assorbimento ad una determinata lunghezza d'onda. Nella esercitazione proposta verrà utilizzato il reattivo di Bradford che utilizza il Coomassie Blu in soluzione acida. Il colorante si lega alle proteine sviluppando un cromoforo che ha un massimo di assorbimento a 595 nm. L'aumento di assorbanza del campione a 595 nm è proporzionale alla quantità di proteine totali presenti nel campione

Si costruisce quindi una "retta di taratura" facendo reagire il reattivo di Bradford con quantità note e crescenti (1 – 2 – 4 – 8 µg) di una soluzione di BSA.

Facendo poi reagire x volumi della miscela proteica, a concentrazione ignota, con il reattivo di Bradford, dal valore di assorbanza, tramite la retta di taratura costruita, si potrà risalire alla quantità di proteine presenti nel campione e poi alla concentrazione proteica dividendo per il volume utilizzato.

## PROTOCOLLO SPERIMENTALE 2° PARTE

### Determinazione della concentrazione proteica mediante metodo colorimetrico indiretto.

- **Costruzione della retta di taratura mediante utilizzo di diverse quantità di BSA**

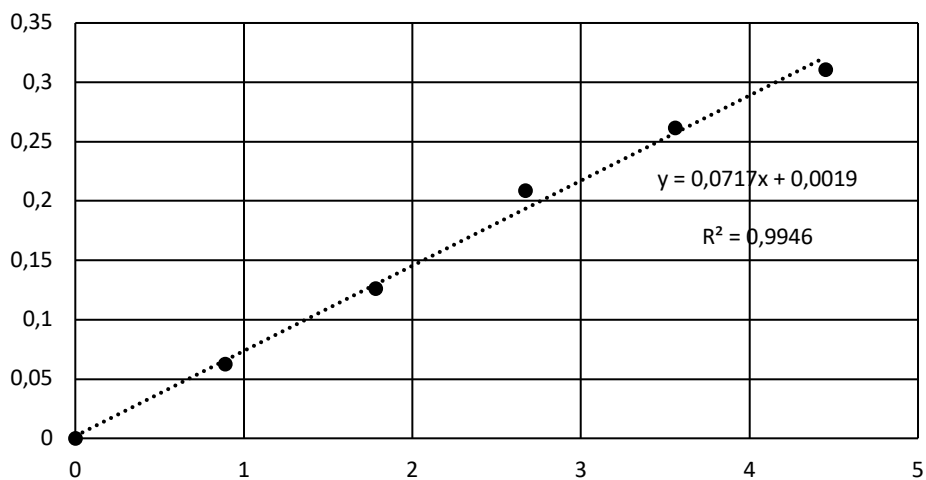
La proteina di riferimento usata per la costruzione della retta di taratura è BSA<sup>6</sup> ( $\epsilon = 0,67 \text{ OD}_{280\text{nm}}$ ) e la sua concentrazione è stata preventivamente determinata applicando la legge di Lambert-Beer. La soluzione di BSA da utilizzare nella presente esercitazione ha una concentrazione pari a 0.5 µg/µl.

1) Preparare nei tubi 1-5 le soluzioni secondo lo schema sotto riportato;

| Tubo | Campione         | H <sub>2</sub> O | Reattivo di Bradford <sup>7</sup> | O.D. 595nm | µg |
|------|------------------|------------------|-----------------------------------|------------|----|
| 1    | Bianco           | 600 µl           | 400 µl                            | 0          | 0  |
| 2    | BSA 1 µg = 2 µl  | 598 µl           | 400 µl                            |            | 1  |
| 3    | BSA 2 µg = 4 µl  | 596 µl           | 400 µl                            |            | 2  |
| 4    | BSA 4 µg = 8 µl  | 592 µl           | 400 µl                            |            | 4  |
| 5    | BSA 8 µg = 16 µl | 584µl            | 400 µl                            |            | 8  |

- 2) Mescolare e determinare allo spettrofotometro per ogni soluzione la corrispondente assorbanza a 595 nm;
- 3) Riportare in tabella i valori di Assorbanza in funzione della quantità di BSA utilizzata per allestire le soluzioni;
- 4) Costruzione del grafico mediante Microsoft Excel:
  - riportare i valori delle quantità di BSA ( $\mu\text{g}$ ) e i rispettivi valori di assorbanza a 595nm ottenuti;
  - creare un grafico a dispersione (XY) come riportato nell'esempio.

Retta di taratura con BSA



**Esempio di costruzione di retta di taratura con BSA utilizzando il metodo colorimetrico di Bradford**

- 5) Determinare l'equazione della retta ( $y = mx+c$ )
    - Selezionare uno dei punti sul grafico;
    - aprire il menu col tasto destro e quindi scegliere "aggiungi linea di tendenza";
    - selezionare le opzioni Lineare;
    - visualizzare l'equazione sul grafico [ $y = mx+c$ ]
    - visualizzare il valore di  $R^2$  sul grafico.
- y: valore di assorbanza a 595nm  
 x: valore dei  $\mu\text{g}$  di BSA utilizzati  
 m: coefficiente angolare espresso come  $(A_{595\text{nm}})/(\mu\text{g BSA})$ .  
 c: intercetta sull'asse Y  
 $R^2$ : coefficiente di correlazione lineare al quadrato.  $R^2$  indica la bontà della regressione lineare e quindi la qualità della retta di calibrazione eseguita. Matematicamente il valore  $R^2$  va da 0 a 1



dove  $[R^2 = 1]$  indica una retta perfetta. Per una corretta determinazione del titolo proteico totale di una soluzione, la retta di calibrazione deve avere un valore di  $R^2 \geq 0.99$

- **Determinazione della concentrazione proteica dell'eluato**

Al fine di determinare la concentrazione dell'eluato, è necessario procedere alla misurazione spettrofotometrica (a 595nm) di aliquote di volumi noti del campione mescolato insieme al reattivo di Bradford in H<sub>2</sub>O come fatto per la costruzione della retta di taratura.

- 1) Preparare le miscele nei tubi 6 e 7 contenenti differenti volumi dell'eluato (campione) come mostrato nella tabella.
- 2) Mescolare e misurare l'assorbanza a 595nm
- 3) Riportare in tabella i valori di Assorbanza in funzione dei volumi utilizzati dell'eluato.

| Tubo | Campione      | H <sub>2</sub> O | Reattivo di Bradford | O.D. 595nm | µg |
|------|---------------|------------------|----------------------|------------|----|
| 6    | Eluato = 2 µl | 598 µl           | 400 µl               |            |    |
| 7    | Eluato = 5 µl | 595 µl           | 400 µl               |            |    |

4) Determinazione della concentrazione dell'eluato

Dalla retta di calibrazione precedentemente ottenuta è possibile determinare la quantità di proteine presenti nell'eluato applicando la seguente formula

$$x = (y - q) / m$$

dove x rappresentano i µg di proteine, y rappresenta il relativo valore di Assorbanza a 595nm, m e q rappresentano, rispettivamente, la pendenza e l'intercetta della retta di taratura

$$\mu\text{g} = [(O.D_{595} - q) / m]$$

La concentrazione proteica [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] sarà determinata dividendo il valore dei  $\mu\text{g}$  ottenuti per il volume di eluato utilizzato. La concentrazione proteica dell'eluato sarà una media aritmetica dei valori ottenuti.

### **3° parte. Analisi elettroforetica della proteina purificata e valutazione del peso molecolare e grado di purezza**

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS<sup>8</sup> (Sodio Dodecil Solfato), nota come SDS-PAGE, è il tipo di elettroforesi più utilizzato in biochimica analitica, in quanto permette di stabilire con buona accuratezza sia il grado di purezza della proteina che si sta purificando sia il suo peso molecolare. Nella presente esercitazione si utilizzeranno gel pronti all'uso (PreCast). In questo caso l'acrilammide polimerizzata non comporta alcun rischio se muniti di dispositivi di protezione individuali, quali camice e guanti.

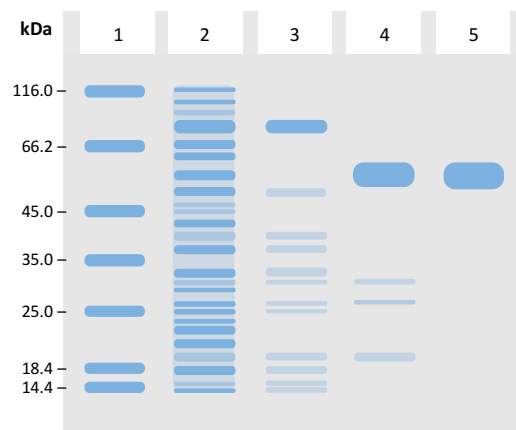
Le frazioni eluite dalla colonna, insieme agli appositi controlli e marcatori di peso molecolare, verranno analizzati su SDS-PAGE. I campioni, prima di essere caricati sul gel, verranno denaturati al calore mediante incubazione a 100°C. Terminata la corsa elettroforetica, il gel sarà colorato per evidenziare le bande proteiche. La digestione proteolitica della proteina chimerica (85 kDa) determinerà il rilascio di Ss $\beta$ Gly che ha una mobilità elettroforetica corrispondente a un peso molecolare atteso di circa 56kDa.

## **PROTOCOLLO SPERIMENTALE 3° PARTE**

### **Analisi delle frazioni eluite mediante SDS-PAGE**

- Preparazione dei campioni da caricare su SDS-PAGE:
  - 1) 5  $\mu\text{l}$  di Miscela di proteine standard + 5  $\mu\text{l}$  di tampone di caricamento<sup>9</sup>
  - 2) 10  $\mu\text{l}$  di estratto grezzo non digerito con trombina + 10  $\mu\text{l}$  di tampone di caricamento
  - 3) 10  $\mu\text{l}$  di campione legato alla resina + 10  $\mu\text{l}$  di tampone di
  - 4) 10  $\mu\text{l}$  di eluato + 10  $\mu\text{l}$  di tampone di caricamento
  - 5) 10  $\mu\text{l}$  di Ss $\beta$ Gly pura (controllo positivo) + 10  $\mu\text{l}$  di tampone di caricamento
- Incubare le miscele 5 min a 100 °C
- Caricare con le apposite pipette i campioni nei pozzetti del gel

- Collegare i cavetti dell'apparecchio elettroforetico al generatore di corrente ed avviare l'elettroforesi a 100 Volt per ~60 min
- Seguire la corsa elettroforetica fino a che il tracciante, il Blu di Bromofenolo, non arriva alla fine del gel
- Spegnerne l'alimentatore
- Separare le lastrine e immergere il gel nella soluzione di colorazione (Instant Blue<sup>14</sup>)
- Decolorazione del gel in acqua
- Analisi del profilo elettroforetico della proteina SsβGly



A titolo esemplificativo, in figura è riportato un gel di riferimento in cui sono stati caricati i campioni relativi a differenti passaggi di purificazione:

**Linea 1:** Marcatori di peso molecolare;

**Linea 2:** Estratto grezzo, rappresenta il prodotto della lisi dei batteri

**Linea 3:** Campione legato alla resina non ancora trattato con trombina

**Linea 4:** Eluato dopo trattamento con trombina.

**Linea 4 (SsβGly pura):** aliquota di proteina pura;

La proteina chimerica ha un peso molecolare complessivo di circa 84 kDa mentre l'enzima, oggetto della presente esercitazione, è costituito da 4 subunità identiche di 56 kDa ciascuna, per una struttura quaternaria tetrameric con un peso molecolare totale di 240 kDa. Tuttavia, le condizioni denaturanti dell'elettroforesi implica la separazione delle subunità, queste ultime evidenziabili su gel come una singola banda con mobilità elettroforetica corrispondente a un peso di circa 56 kDa.

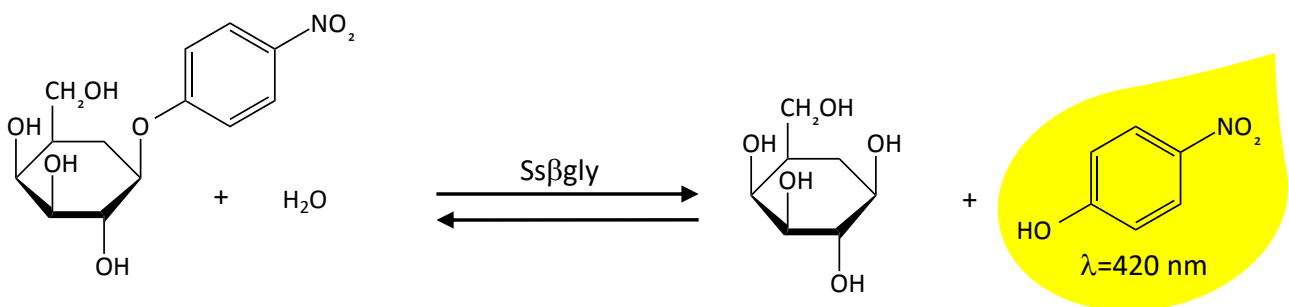
#### 4° parte. Analisi dell'attività enzimatica della proteina purificata mediante saggio di attività galattosidasi: dosaggio spettrofotometrico

Le glicosil idrolasi (EC 3.2.1.X) sono un gruppo di enzimi largamente diffusi in tutti i domini degli esseri viventi, ed in base a dati strutturali e biochimici, sono stati classificati attualmente in 166 famiglie. Questi enzimi catalizzano l'idrolisi di legami *O*- e/o *N*-glicosidici presenti nei carboidrati. La  $\beta$ -galattosidasi (EC 3.2.1.23) del archaeon ipertermofilo *Saccharolobus solfataricus* ( $Ss\beta$ Gly) è un tetramero di circa 240 kDa composto da quattro subunità identiche.

$Ss\beta$ Gly idrolizza specificatamente substrati naturali ed artificiali contenenti galattosio o glucosio legato in beta.

Il para-nitrofenil- $\beta$ -D-Galattopiranoside (pNpGal) è uno dei substrati artificiali idrolizzati da  $Ss\beta$ Gly ed è utilizzato di routine per misurare l'attività enzimatica delle  $\beta$ -galattosidasi.  $Ss\beta$ Gly idrolizza il legame *O*-glicosidico producendo galattosio e para-nitro-fenolo, il quale, in forma libera, si presenta di colorazione gialla a pH neutri/alcalini, permettendo la rilevazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 420 nm ( $\epsilon_{mM} = 17.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a pH 10.0 e a temperatura ambiente).

La reazione enzimatica è catalizzata secondo lo schema seguente:



Lo scopo di questa parte della esercitazione è quella di valutare l'attività enzimatica di  $Ss\beta$ Gly attraverso un saggio spettrofotometrico. Il saggio prevederà due step: 1) allestimento della miscela di reazione e misura spettrofotometrica 2) calcolo delle Unità enzimatiche e dell'Attività specifica.

## Saggio di attività di SsβGly

Il saggio dell'enzima SsβGly è eseguito ad una temperatura di 65 °C, e ad un pH di 6.5, utilizzando come substrato della reazione il para-nitrofenil-β-D-Galattopiranoside (pNpGal)<sup>15</sup> che rappresenta un analogo sintetico del disaccaride lattosio (Glucosio-beta-1,4-Galattosio). Parallelamente verrà incubata una miscela alle stesse condizioni ma priva dell'enzima. Questa mix è definita **Bianco** ed è indispensabile per sottrarre alla miscela di reazione contenente l'enzima (**Reazione**) il valore di assorbanza dovuto alla possibile degradazione chimica del substrato.

Un' unità enzimatica (U) è definita come la quantità di enzima richiesta per convertire 1 μmol di substrato in prodotto in 1 min in condizioni di temperatura definite e a un valore di forza ionica e pH ottimale. L'attività specifica di un enzima (U/mg di proteine) rappresenta un parametro che può essere utilizzato per valutare il suo grado di purezza.

### Protocollo Sperimentale 4° Parte

Soluzioni da utilizzare

- A) Soluzione di pNpGal in H<sub>2</sub>O alla concentrazione di 20 mM
- B) Soluzione di tampone sodio fosfato 200 mM, pH 6.5.
- C) H<sub>2</sub>O .
- E) Soluzione contenente SsβGly eluita dalla cromatografia precedente.
- D) soluzione di sodio carbonato 1M, pH 10.0.

- Preparazione della mix di saggio (**Reazione**) (volume finale 200 μL)
  - In una provetta da 1.5 mL di plastica pipettare 50 μL di tampone fosfato 200 mM pH 6.5 (concentrazione finale 50 mM).
  - aggiungere 50 μL di pNpGal 20 mM (concentrazione finale 5 mM)
  - Portare a volume finale con H<sub>2</sub>O tenendo conto del volume di enzima da utilizzare\*
  -

\*Il volume di enzima utilizzato per il saggio sarà dipenderà dalla concentrazione dell'enzima/eluato a disposizione e sarà comunicato dal docente RADRL durante l'esercitazione.

- Preparazione del bianco della reazione (**Bianco**) (volume finale 200 μL)

- In una provetta da 1.5 mL di plastica pipettare 50  $\mu$ L di tampone fosfato 200 mM pH 6.5 (concentrazione finale 50 mM).
  - aggiungere 50  $\mu$ L di pNpGal 20 mM (concentrazione finale 5 mM)
  - aggiungere 100  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O
- Avvio del saggio enzimatico
    - Preincubare 2 minuti a 65 °C le provette del **Bianco** e della **Reazione**.
    - al termine della preincubazione aggiungere \_\_\_  $\mu$ L di Frazione\* contenente Ss $\beta$ Gly alla provetta della Reazione ed incubarla a 65°C per 2 minuti.
    - Al termine dell'incubazione trasferire le provette della Reazione e del Bianco in ghiaccio ed aggiungere in ciascuna 800  $\mu$ L di sodio carbonato 1M pH 10.0

\*Il volume di enzima utilizzato per il saggio sar  dipender  dalla concentrazione dell'enzima/eluato a disposizione e sar  comunicato dal docente RADRL durante l'esercitazione.

- Lettura spettrofotometrica a 420 nm.
  - Trasferire in una cuvetta la soluzione del Bianco e in una cuvetta la soluzione della Reazione.
  - Inserire nello spettrofotometro la cuvetta contenente il Bianco e premere "Zero"
  - Rimuovere la cuvetta contenente il Bianco ed inserire la cuvetta contenente la reazione.
  - Premere "Read" e annotare il valore di O.D. misurato.

L'enzima catalizza l'idrolisi del substrato producendo galattosio e para-nitrofenolo<sup>16</sup> (CAS-Number: 100-02-7; scheda di sicurezza allegata al presente documento).

Nelle condizioni di saggio utilizzate il cromoforo presenta un coefficiente di estinzione millimolare ( $\epsilon$ ) pari a 17.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> alla lunghezza d'onda di 420 nm.

È quindi possibile calcolare, utilizzando la legge di Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ ), la concentrazione di para-nitrofenolo prodotta e da queste le  $\mu$ moli di para-nitrofenolo prodotto al termine della reazione. Dividendo le  $\mu$ moli prodotte per il tempo di reazione (2 min) si otterr  quindi il valore di unit  enzimatiche (U).

Dividendo il valore di Unità enzimatiche misurate per la quantità espressa in mg dell'enzima utilizzato sarà possibile ottenere l'attività specifica U/mg.

| <b>Campione</b>                     | <b>O.D. a 420 nm</b> | <b>μmoli di para-nitrofenolo prodotte</b> | <b>Unità enzimatiche (U)</b> | <b>mg di Enzima usati</b> | <b>Attività specifica (U/mg)</b> |
|-------------------------------------|----------------------|---|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Misurazione 1 (Eluato)              |                      |   |                              |                           |                                  |
| Misurazione 2 (Ss $\beta$ Gly pura) |                      |   |                              |                           |                                  |

NUMERI IDENTIFICATIVI DELLE SOSTANZE CHIMICHE UTILIZZATE (CAS) E RELATIVE FRASI DI  
RISCHIO E DI SICUREZZA

<sup>1</sup> NaCl CAS Number 7647-14-5

<sup>2</sup> Fosfato di Sodio CAS Number 10101-89-0

<sup>3</sup> Fosfato di Potassio CAS Number 7778-53-2

<sup>4</sup> Triton X-100 Detergente non ionico. CAS Number: 9002-93-1. Irritante e corrosivo a contatto con gli occhi e le mani a concentrazioni elevate. Non critico alle concentrazioni utilizzate nelle esercitazioni e muniti di guanti.

<sup>5</sup> trombina CAS Number: 9002-04-4

<sup>6</sup> BSA: CAS Number 9048-46-8

<sup>7</sup> reattivo di Bradford: CAS Number: 6104-58-1 (Coomassie); CAS Number: 7664-38-2 (Acido fosforico); CAS Number 67-56-1 (metanolo)

<sup>8</sup> SDS: CAS Number: 151-21-3

<sup>9</sup> Tampone di caricamento, preparato preventivamente dal docente RADRL, è così costituito: 62.5 mM Tris-HCl<sup>10</sup> pH 6.8. 2% SDS<sup>11</sup>, 25% glicerolo<sup>12</sup>, 0.01% Blu di bromofenolo<sup>13</sup>.

<sup>10</sup> Tris-HCl: Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato. Utilizzato per la preparazione di tamponi. CAS number 1185-53-1. Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

<sup>11</sup> SDS (sodio dodecilsolfato): CAS number 151-21-3. Tossico se inalato o ingerito. Non comporta criticità alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

<sup>12</sup> Glicerolo; CAS number 56-81-5 Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

<sup>13</sup> Blu di bromofenolo: indicatore della corsa elettroforetica. Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e se muniti di guanti.

<sup>14</sup> Instant Blue CAS Number 7664-38-2 (Il numero CAS è dell'acido fosforico)

<sup>14</sup> para-nitrofenil-β-D-Galattopiranoside (pNpGal) (CAS-Number: 3150-24-1, scheda di sicurezza allegata al presente documento)

<sup>15</sup> Marcatori di peso molecolare

<sup>16</sup> para-nitrofenil-β-D-Galattopiranoside: CAS Number 3150-24-1

<sup>17</sup> para-nitrofenolo (CAS-Number: 100-02-7; scheda di sicurezza allegata al presente documento)

*Marco Morcchi*