

ZIMOGRAFIA

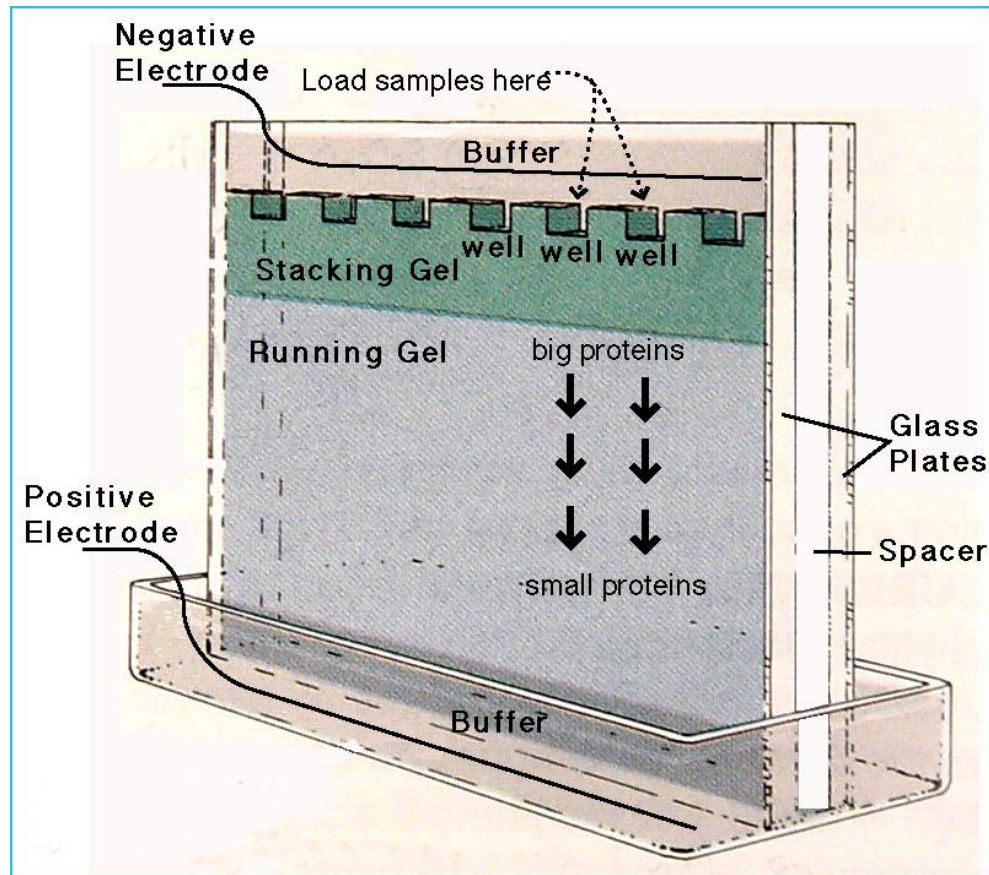
La zimografia è una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilammide che permette la visualizzazione del numero e del peso molecolare approssimativo delle proteasi in un campione, in base all'idrolisi del substrato specifico, incorporato nel gel.

Il principio di base dell'elettroforesi è la migrazione delle proteine in seguito all'applicazione di un campo elettrico, in presenza di SDS, un detergente anionico che si lega fortemente alle proteine mascherandone la carica netta e mantenendo costante il rapporto Massa/Carica.

Nel caso delle GELATINASI, MMP-9 ed MMP-2, il substrato utilizzato è la GELATINA alla concentrazione finale dello 0,1%.

La corsa è effettuata in condizioni **denaturanti**, ma **non riducenti** cioè caricando immediatamente il campione dopo aver aggiunto tampone di denaturazione non riducente (contenente SDS, glicerolo, blu di bromofenolo in Tris/HCl 0,5M pH 6.8, senza β -mercaptoetanololo) senza sottoporlo a bollitura.

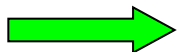
- Il **Running Gel**, che serve per separare le proteasi in base alle loro dimensioni, è di circa 6 ml di volume finale, e viene fatto polimerizzare tra due lastre di vetro verticali separate da due spaziatori, in un apposito supporto.
- A polimerizzazione avvenuta viene aggiunto lo **Stacking Gel**, che serve per compattare le proteine contenute nel campione lungo un unico fronte di corsa, e viene inserito il pettine per la formazione dei pozzetti dove vengono caricati i campioni.



- La corsa elettroforetica viene condotta, infine, dopo aver posto il gel nell'apparato di elettroforesi applicando una corrente di 200 V per circa 45-60 minuti.
- Al termine, il gel è sottoposto a due lavaggi da 30 minuti ciascuno in Triton 2.5 %, così da rimuovere l'SDS presente nel gel.
- Il gel viene posto in una vaschetta ed incubato 18 ore in una stufa a 37°C nell'apposito Tampone di Rinaturazione, il quale crea l'ambiente ottimale per far avvenire la reazione enzimatica di proteolisi e di digestione della gelatina.
- La degradazione della gelatina è resa visibile colorando il gel con colorante contenente Comassie Brilliant Blue G-250 per alcuni secondi ad elevata temperatura e, in seguito, decolorandolo attraverso ripetuti lavaggi in acqua bidistillata.
- Le aree del gel in cui sono localizzate le proteasi si presentano come bande bianche sullo sfondo blu omogeneo del gel.

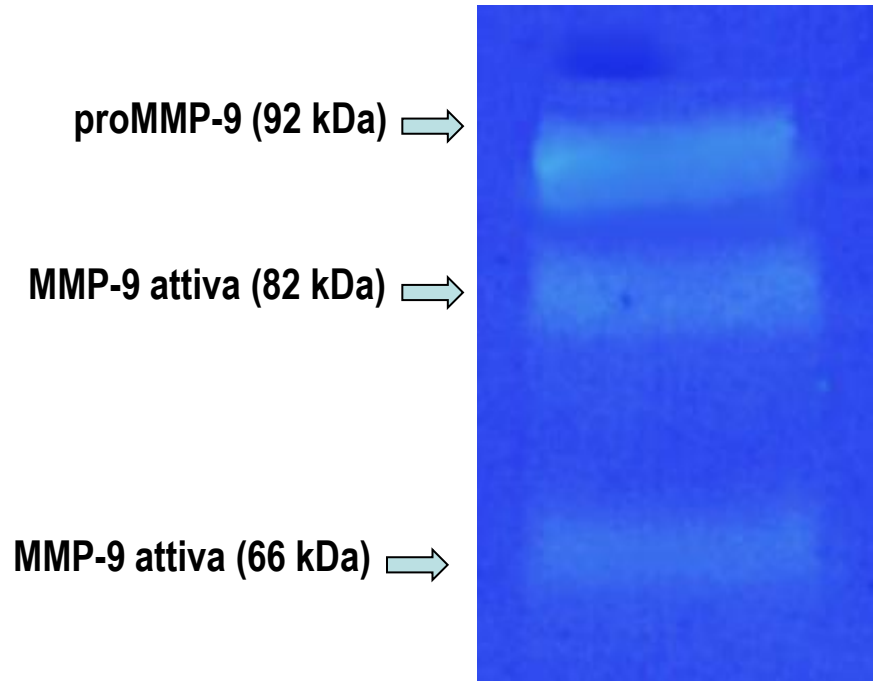


Sfondo blu omogeneo: **GELATINA NON DIGERITA** (colorante legato)



Bande bianche: **GELATINA DIGERITA dalle metalloproteasi**
(colorante non legato)

- Questo è un **metodo molto sensibile** che permette la visualizzazione anche di **pg** (picogrammi) di metalloproteasi nel campione analizzato.



Soluzione Stacking Gel	500 μl Acrilammide 20% 8 μ l Temed 930 μ l acqua bidistillata 500 μ l Tris/HCl 0,5M pH 6.8 20 μ l SDS 10% 20 μ l ammonio persolfato 10%
Soluzione Running Gel con Poliacrilamide 10%,	1,5 ml Acrilamide 40% 15 μ l Temed 2,9 ml acqua bidistillata 600 μl Gelatina 10 mg/ml 900 μ l Tris/HCl 1.5M pH 8.8 60 μ l SDS 10% 30 μ l ammonio persolfato 10%
Tampone di Corsa	Glicina 192mM, Tris base 25mM, SDS 0.1% in acqua bidistillata
Tampone di Sviluppo per zimografia pH 7.6	NaCl 0.2M, Tris base 50mM, CaCl ₂ 5mM in acqua bidistillata
Colorante per Gel	Comassie Brilliant Blue G-250 0.8%, HCl 45 mM in acqua bidistillata