

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 46

Purificazione di proteine - Protein purification

Settore Scientifico-Disciplinare di riferimento: BIOS-07/A

Responsabile: ANTIMO DI MARO

RADoR: ANTIMO DI MARO, ANGELA CHAMBERY, ROSITA RUSSO

Tipologia: CHIMICO

Gruppi afferenti: Biochimica delle proteine, proteomica e spettrometria di massa

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- Riportare: piano, corpo, (locale);
- dimensioni
- n. postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Estrazione e purificazione di proteine e peptidi da matrici alimentari mediante l'utilizzo di cromatografie a bassa e media pressione (FPLC)
2. Tecniche elettroforetiche per la separazione di proteine, peptidi e acidi nucleici
3. Preparazione di soluzioni tampone
4. Utilizzo dello spettrofotometro per analisi quali-quantitative delle macromolecole biologiche

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Estrazione e purificazione di proteine e peptidi da matrici naturali mediante l'utilizzo di cromatografie a bassa e media pressione (FPLC)

Le matrici oggetto di studio sono sottoposte ad omogeneizzazione mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore meccanico e gli estratti ottenuti vengono poi chiarificati mediante centrifugazione. I campioni ottenuti vengono sottoposti a tecniche cromatografiche a bassa e media pressione (FPLC). Le proteine separate vengono poi raccolte in provette di polipropilene e conservate per ulteriori analisi. Durante la fase di preparazione occorre indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio) e al termine smaltire i rifiuti solidi e/o liquidi prodotti seguendo le procedure indicate da RADoR.

1a. CROMATOGRAFIA A BASSA PRESSIONE

PRIMA DELL'UTILIZZO:

- Al primo utilizzo leggere la scheda di sicurezza della matrice (resina) con cui si vuole impaccare la colonna cromatografica
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio)
- Assicurarsi che tutti i liquidi di scarto del processo cromatografico vengano raccolti in apposite taniche di raccolta
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

DURANTE L'UTILIZZO:

- Accertarsi del corretto avvio della procedura di separazione
- Non intervenire di propria iniziativa durante il processo di separazione cromatografico
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR)
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

DOPO L'UTILIZZO:

- Procedere alla pulizia e al riordino del proprio banco di lavoro
- Svuotare la tanica di raccolta degli scarti quando presenti liquidi per una frazione compresa fra $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ dell'intero volume del contenitore

- Smaltire i rifiuti solidi e/o liquidi prodotti seguendo le procedure indicate dal RAdoR

1b. CROMATOFRAFIA A MEDIA PRESSIONE (FPLC)**PRIMA DELL'UTILIZZO:**

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio)
- Assicurarsi che tutti i liquidi di scarto del processo cromatografico vengano convogliati in apposite taniche di raccolta
- Filtrare i tamponi prima del loro utilizzo
- Centrifugare e filtrare il campione prima dell'analisi
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

DURANTE L'UTILIZZO:

- Accertarsi del corretto avvio della procedura di separazione
- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti di essa
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RAdoR)
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

DOPO L'UTILIZZO:

- Procedere alla pulizia e al riordino del proprio banco di lavoro
- Svuotare la tanica di raccolta degli scarti quando presenti liquidi per una frazione compresa fra $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ dell'intero volume del contenitore
- Smaltire i rifiuti solidi e/o liquidi prodotti seguendo le procedure indicate dal RAdoR

2. Tecniche elettroforetiche per la separazione di proteine, peptidi e acidi nucleici

L'elettroforesi monodimensionale su gel precast e di agarosio consente di separare le macromolecole biologiche come proteine e acidi nucleici in base al peso molecolare. Pertanto, i campioni opportunamente preparati vengono caricati sul gel e al termine della corsa elettroforetica, il gel viene prima colorato e successivamente decolorato fino alla completa visualizzazione delle bande.

PROCEDURA:

- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali protettivi e camice da laboratorio)
- Eseguire la procedura di polimerizzazione del gel sotto cappa chimica
- Preparare la cameretta elettroforetica ed assicurarsi che il banco di lavoro sia completamente asciutto
- Dopo la corsa elettroforetica, eseguire la procedura di colorazione e decolorazione sotto cappa chimica
- Al termine dell'attività, pulire e riordinare il banco di lavoro e smaltire i rifiuti prodotti negli appositi contenitori seguendo le procedure indicate dal RAdoR

3. Preparazione di soluzioni tampone

Per la preparazione delle soluzioni tampone, al primo utilizzo, l'operatore deve leggere la scheda di sicurezza della polvere utilizzata. Dopodiché l'operatore deve indossare gli appositi DPI (guanti di protezione, occhiali protettivi se necessario, mascherina se necessario e camice da laboratorio). Generalmente, la polvere viene pesata in apposite vaschette, sciolta in un becker contenente acqua e un'ancoretta magnetica, posizionato su una piastra agitante (agitazione magnetica) e/o riscaldante in funzione della soluzione. Al termine della solubilizzazione, la soluzione viene portata al pH e al volume richiesto. Le soluzioni che maggiormente vengono preparate sono: tampone fosfato, Tris-HCl, sodio acetato, cloruro di sodio, tamponi per la corsa elettroforetica. Quando necessario, le soluzioni tampone vengono sterilizzate in autoclave, utilizzando gli appositi DPI (guanti resistenti al calore, visiera e camice). Al termine dell'attività l'operatore deve pulire il banco di lavoro, lavare la vetreria e smaltire gli eventuali rifiuti prodotti in accordo con le procedure indicate dal RAdoR

4. Utilizzo dello spettrofotometro per l'analisi quali-quantitativa di macromolecole biologiche

Per le analisi spettrofotometriche, al primo utilizzo, l'operatore deve leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore e successivamente indossare i DPI necessari (guanti protettivi e camice da laboratorio). Per le analisi è richiesto l'utilizzo di pipette pasteur e di cuvette monouso in plastica o di cuvette in quarzo, a seconda della misura da effettuare. Durante le analisi, segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR. Al termine della misura ripulire la postazione utilizzata e smaltire i rifiuti prodotti in accordo con le procedure indicate dal RAdoR.

Lista delle attrezzature presenti:

- piastra riscaldante/agitante (n. 4)
- centrifuga per eppendorf
- vortex
- basculante
- spettrofotometro monoraggio
- pompe peristaltiche (n. 3)
- pompa a membrana da vuoto
- frigorifero + 4 °C
- congelatore -20 °C
- alimentatore per corse elettroforetiche (n. 3)
- bagnetto termostato
- sistema FPLC con rilevatore UV-Vis
- omogeneizzatore

Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)

- cappa chimica
- armadio per liquidi infiammabili

Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori:

- occhiali di protezione
- guanti in nitrile e in lattice
- camice da laboratorio
- guanti per autoclave

Categorie ISI WEB di riferimento

Biochemistry and Molecular Biology
Biochemical Research Methods
Food Science and Technology

Categorie ERC di riferimento

LS1_2 Biochemistry
LS2_8 Proteomics

[SCHEDE DI SICUREZZA](#)