SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 45
Proteomica e spettrometria di massa – Proteomics and mass spectrometry

Settore Scientifico-Disciplinare di riferimento: BIO/10

Responsabile: ANGELA CHAMBERY

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*: (*Il locale e le dimensioni saranno inseriti dalla Commissione)
- n. postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Estrazione di proteine e peptidi da matrici biologiche per analisi proteomiche
2. Digestioni con enzimi proteolitici
3. Preparazione di soluzioni tampone
4. Marcatura dei peptidi mediante tag isobarici per analisi quantitative di spettrometria di massa
5. Analisi quantitative mediante microarray immunologici in sospensione

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Estrazione di proteine e peptidi da matrici biologiche per analisi proteomiche

Le matrici oggetto di studio sono sottoposte a lisi in opportuni tamponi, in ghiaccio, mediante l'utilizzo di un sonicatore provvisto di sonda. I lisati vengono poi chiarificati sia mediante l'utilizzo di enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici sia mediante centrifugazione. I surnatanti ottenuti vengono poi utilizzati per successive 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.

PRIMA DELL'UTILIZZO:

- Al primo utilizzo leggere le istruzioni per l'utilizzo del sonicatore
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio)
- Assicurarsi che tutti i prodotti di scarto del processo di lisi vengano raccolti in appositi contenitori di raccolta.
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

DURANTE L'UTILIZZO:

- Accertarsi del corretto posizionamento della sonda del sonicatore
- Non avvicinarsi al sonicatore mentre è in funzione
- 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
- Pulire la sonda del sonicatore
- Smaltire i rifiuti solidi e/o liquidi prodotti seguendo le procedure indicate dal RADoR
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR)
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria

2. Digestioni con enzimi proteolitici

Le digestioni mediante l'impiego di enzimi proteolitici consentono di ottenere miscele di peptidi che saranno poi analizzati mediante spettrometria di massa. I lisati ottenuti al termine della procedura di estrazione vengono trattati aggiungendo una specifica quantità di enzima ed incubando in un bagnetto termostatato dopo uno step di riduzione ed alchilazione.

PROCEDURA:

- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali protettivi e camice da laboratorio)
- Eseguire la procedura riduzione/alchilazione sotto cappa chimica
- Aggiungere la quantità prestabilita di enzima ed incubare a 37°C

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 l'operatore deve al primo utilizzo 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 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. Marcatura dei peptidi mediante tag isobarici per analisi quantitative di spettrometria di massa

La marcatura isobarica è una strategia di quantificazione proteica basata sull'utilizzo della spettrometria di massa. I peptidi o le proteine vengono marcate con vari gruppi chimici accomunati dall'essere isobari, ovvero dotati della medesima massa complessiva. I tag isobarici sono costituiti da tre regioni: reporter, balance e regioni reattive. Le regioni reporter, dotate di pesi molecolari più bassi (light) per la presenza di isotopi leggeri, sono abbinate a regioni di bilanciamento contenenti isotopi ad alto peso molecolare (heavy), in modo tale che l'intero tag legato al peptide determini lo stesso shift di peso molecolare per tutti i precursori. La procedura di marcatura viene eseguita in eppendorf seguendo le istruzioni fornite dalla ditta costruttrice.

PROCEDURA:

- ridurre con tris-(2-carbossimetil)-fosfina (TCEP) 10 mM per un'ora a 55°C e alchilare con iodoacetamide 18 mM per 30 minuti a temperatura ambiente ed al buio uguali quantità di campioni proteici, sotto cappa
- sottoporre i campioni a precipitazione overnight, aggiungendo acetone freddo sotto cappa
- centrifugare a 8.000 g per 10 minuti e a 4°C
- risospendere i pellet in 100 µL di tampone TEAB 100 mM
- digerire le proteine con tripsina utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1:40 overnight a 37°C
- solubilizzare 0.8 mg di reagenti di marcatura in 41 µL di acetonitrile anidro e, quindi, aggiungerli a ciascun campione, incubando per un'ora a temperatura ambiente
- interrompere la reazione aggiungendo idrossilammina al 5% ed incubando per 15 minuti a temperatura ambiente, in agitazione

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

4. Analisi quantitative di analiti mediante microarray immunologici in sospensione

Il sistema Bio-Plex utilizza la tecnologia xMAP che permette l'analisi contemporanea di diversi campioni, utilizzando un set di beads, rilevabili in modo differenziale, come substrato di cattura degli analiti in soluzione e metodi di rilevamento in fluorescenza. Il saggio viene eseguito in piastre da 96 pozzetti seguendo le istruzioni fornite dalla ditta costruttrice.

PROCEDURA:

- incubare le beads coniugate con l'anticorpo di cattura con antigeni standard o campioni per un tempo specifico come da istruzioni fornite dalla ditta fornitrice
- lavare la piastra, utilizzando la stazione di lavaggio, per rimuovere l'eccesso di analita non legato
- incubare la piastra con anticorpi biotinilati

- effettuare un secondo lavaggio
- incubare le beads con un substrato a base di streptavidina-ficoeritrina
- effettuare un terzo lavaggio finalizzato alla rimozione della SA-PE in eccesso
- effettuare la lettura della piastra utilizzando il sistema Bioplex MAGPIX

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

Lista delle attrezzature presenti:

- piastra riscaldante/agitante (n. 3)
- centrifughe per eppendorf (n. 2)
- vortex
- agitatore basculante
- agitatore per micropiastre
- frigorifero-congelatore combinato
- congelatore -20 °c
- alimentatore per corse elettroforetiche (n. 1)
- sonicatore con sonda
- pH metro
- conduttimetro
- bilancia analitica
- bilancia di precisione
- ionizzatore antistatico
- sistema per il trasferimento di proteine su membrane Trans Blot Turbo
- analizzatore immunologico in multiplexing Bioplex MAGPIX
- stazione di lavaggio per micropiastre

Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori:
Occhiali di protezione,
Guanti in nitrile e in lattice
Camice da laboratorio

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