SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n.47

Laboratorio di Sintesi Organica di Biomolecole – Laboratory Of Organic Synthesis Of Biomolecules

Settore/i Scientifico-Disciplinari di riferimento: CHIM06, CHIM08, CHIM09, CHIM03

Responsabile: Prof.ssa Anna Messere

RADoR: Prof.ssa Anna Messere

Tipologia: Chimico

Gruppi afferenti: DRUG DISCOVERY: PROGETTAZIONE, SINTESI E VEICOLAZIONE, STRUTTURA E FUNZIONE DI PEPTIDI, PROTEINE E ACIDI NUCLEICI, STRUTTURA E BIOATTIVITA' DI MOLECOLE ORGANICHE

- 1 piano, corpo A del DISTABIF
- Dimensioni 23 m^2
- n. 4 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

Nel laboratorio di Sintesi Organica di Biomolecole si sintetizzano nuove molecole bioattive, di natura oligonucleotidica, peptidica ed eterociclica, mediante avanzate strategie di sintesi chimica in soluzione e in fase solida, manuale e automatizzata. I prodotti di sintesi sono isolati e caratterizzati mediante cromatografia LC-HPLC, purificati con cromatografia ad alta risoluzione. Si eseguono studi conformazionali, di biostabilità e di riconoscimento del target in vitro.

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. PROTOCOLLO SINTESI IN FASE SOLIDA CONENZIONALE E US-ASSISTED

- Indossare camice, guanti, mascherina e occhiali da laboratorio.
- Pesare i mg di resina in base alla scala voluta e al loading della stessa, secondo la formula:

loading della resina:1000 mg= scala di sintesi: mg da pesare

- Sotto cappa, iniziare la sintesi in fase solida indossando occhialini e mascherina FFP2.
- Sospendere la resina e mettere sotto agitazione (piastra con agitatore magnetico): 1h in DMF, drenare, e 30min in DCM, drenare.
- Defmoc del gruppo protettore della resina: 20min in agitazione con una soluzione di Piperidina al 20% in DMF (soluzione di deblock)
- Kaiser test (+).
- **Funzionalizzazione della resina**: preparare una soluzione con 3eq di amminoacido, 3eq di attivanti, 6 eq di DIPEA. Sciogliere la soluzione in 1-2ml di DMF e aggiungerla al supporto solido. Lasciare in agitazione per 2-3h oppure in sonicatore per 30min.
- Kaiser test (-).
- In caso di kaiser test (+), procedere con la reazione di acetilazione (**capping**): preparare una soluzione di 0.5 M anidride acetica e 0.125 M DIPEA in DMF, per 15 min in agitazione oppure per 3 min in sonicatore.
- Procedere con successivo **defmoc** del primo amminoacido aggiunto sulla resina: aggiungere 1 ml di soluzione di deblock alla resina, 7 min in agitazione oppure 2 cicli in sonicatore, rispettivamente da 1min e da 30sec.
- Kaiser test (+).
- Procedere con il **coupling** del successivo amminoacido secondo procedura descritta sopra.
- Kaiser test (-).
- All'occorrenza, eseguire dopo la reazione di coupling, la fase di capping.
- Procedere con questi cicli ripetuti di defmoc-kaiser-coupling-kaiser fino all'ottenimento della sequenza desiderata.

2. PROTOCOLLO CLEAVAGE DEI PEPTIDI

- Indossare guanti, camice, mascherina FFP2 e occhiali di protezione e lavorare sotto cappa.
- Al reattore contenente il peptide legato alla resina (secca), viene aggiunta una soluzione di 3ml (per 150mg di resina) 95% TFA, 2.5% TIS e 2.5% di acqua.

- Il tappo del rettore viene bucato con un aghetto per evitare che la soluzione vada sottopressione.
- Si lascia su piastra per agitazione con magnete interno al reattore, per 3h.
- Dopo le 3h, si recupera l'eluato dal reattore in una falcon. Qui, si aggiunge dietil etere freddo per la precipitazione del peptide sul fondo dalla falcon.
- Lasciare la falcon contenente il peptide in freezer per 30min per favorire la precipitazione in etere.
- Centrifugare per 5min, dopodiché, con l'aiuto di una pasteur, allontanare il surnatante, lasciando il peptide come pellet bianco.
- Aggiungere etere freddo e ripetere per altre due volte la centrifugazione e l'eliminazione del surnatante.
- Il pellet rimanente viene sciolto nel solvente più appropriato (miscela H_2O/ ACN) per l'analisi.

3. PROTOCOLLO UTILIZZO SPETTROFOTOMETRO UV

UTILIZZARE CUVETTA PER UV in quarzo da 1ml.

- Indossare camice da laboratorio, occhiali, mascherina e guanti di protezione.
- Togliere anidrifcante dall'interno dello strumento.
- Premere pulsante ON sul retro.
- Esce schermata con richiesta Pssw: cliccare su Enter
- In Mode menu, cliccare sul punto 2: Spectrum
- Impostare in Spectrum:
    1. Measure mode: Abs
    2. Scan range. impostare il range in nm desiderato
    3. Rec. Range: impostare il range sull'ordinata
    4. Scan speed: Fast
    5. Scan pitch: AUTO
    6. No. of scans: 1
    7. Display mode: Sequential
    8. Auto-Print: OFF
- Aggiungere il bianco in cuvetta e posizionarla all'interno dell'apposita cella, in modo che le pareti trasparenti della cuvetta siano frontali alla direzione del fascio di luce; quindi premere su Base correction (F1) e aspettare il segnale acustico
- Togliere dalla cuvetta il bianco e aggiungere la soluzione da esaminare e riporre la cuvetta nella cella.
- Cliccare sul pulsante Autozero per azzerare l'ordinata all'inizio della corsa
- Premere poi su Start e attendere uscita dello spettro e segnale acustico finale
- Per leggere l'Abs al lambda max del cromoforo in esame, premere su GOTO WL, digitare la lunghezza d'onda d'interesse.
- Premere su Return per tornare indietro alla home Spectrum.
- Togliere la cuvetta dalla cella
- Spegnere lo strumento
- Reinserire nello scomparto interno l'anidrificante.
- Sotto cappa chimica, operare il lavaggio della cuvetta dopo l'uso. Asciugare e riporre a posto.

4. PROTOCOLLO UTILIZZO SINTETIZZATORE

- 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 e mascherina).
- Assicurarsi che i liquidi di scarto siano convogliati in tanica di raccolta.
- Accendere lo strumento e il corrispettivo software sul correlato computer e procedere all'apertura dell'azoto che convoglia un flusso continuo al sistema, assicurandosi di adoperare il giusto flusso di azoto.
- Procedere alla costruzione e alla selezione del metodo di sintesi opportuno, verificandone tutte le caratteristiche (sequenza peptidica, tipologia di resina, scala di sintesi e la presenza o meno di monomeri modificati nella sequenza.
- Pesare monomeri e attivanti. Sciogliere nell'opportuno volume di opportuno solvente.
- Procedere al caricamento sul sintetizzatore dei monomeri, degli attivanti, della resina e dei solventi per la sintesi
- Avviare la sintesi nei tempi definiti dal sistema.

  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).
- Una volta ultimata la sequenza, procedere al recupero della resina e alla procedura per il lavaggio delle vie.
- Spegnere la strumentazione, procedere a pulizia superfici interne e a riordino del banco di lavoro.
- Svuotare la tanica di raccolta degli scarti quando presenti liquidi per una frazione compresa fra ½ e ¾ dell'intero volume del contenitore.
- Conservare le taniche degli scarti (NON ALO) sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio; trasferire poi all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR

5.PROTOCOLLO UTILIZZO BILANCIA

- 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 e mascherina).
- Assicurarsi che lo strumento sia "in bolla" come indicato dal sistema in caso contrario mettere in bolla la bilancia mediante i piedi regolabili con viti; la bolla d'aria della livella deve trovarsi dentro la zona segnata.
- Accendere lo strumento ed attendere la corretta accensione del display.
- Assicuratisi della pulizia della zona di pesata, procedere ad eventuale taratura dello strumento di raccolta, assicurandosi che la bilancia si sia stabilizzata al corretto peso visualizzato sul display (indicato dall'unità di misura). L'oggetto della pesata deve sempre essere messo in posizione centrale al piatto. Nel caso in cui si metta un contenitore di raccolta, si deve poi procedere all'azzeramento schiacciando il tasto tara
- Procedere alle pesate e assicurandosi che il valore di pesata raccolto sia quello alla corretta stabilizzazione dello strumento.
- Una volta ultimate le pesate, procedere allo spegnimento dello strumento e alla sua pulizia per evitare contaminazioni o errori di pesata futuri.

6. PROTOCOLLO UTILIZZO HPLC

- 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 e mascherina).
- Assicurarsi che i liquidi di scarto siano convogliati in tanica di raccolta.
- Assicurarsi che i contenitori degli eluenti in ingresso all'HPLC siano dotati di tappi di sicurezza, con chiusura ermetica e sistema filtrante.
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria nel locale.

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 a pulizia superfici interne e a riordino banco di lavoro.
- Svuotare la tanica di raccolta degli scarti quando presenti liquidi per una frazione compresa fra ½ e ¾ dell'intero volume del contenitore.

Conservare le taniche degli scarti (ALO) sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio; trasferire poi all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR.

7.PROTOCOLLO ESTRAZIONE IN DISCONTINUO

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio e mascherina).
- Preparare tutta la componente di vetreria necessaria al processo (imbuto separatore, anello di sostegno, beute etc.)
- Preparare il campione che viene solubilizzato, si consideri che la soluzione da separare sia costituita da un soluto (C) e da un diluente (A), così chiamato per evitare confusione con il solvente.
- Procedere all'aggiunta della soluzione estraente in modo che vi sia il passaggio del campione nella soluzione estraente. Ripetere la procedura più volte, come definito nel protocollo seguito.
- Lavare la soluzione estraente con soluzioni differenti a seconda del protocollo.

• Procedere alla rimozione delle tracce acquose con l'ausilio di un anidrificante (sodio solfato) • Filtrare la soluzione e poi rimuovere il solvente con l'utilizzo di un evaporatore rotante, in modo da ottenere una polvere o un olio, a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto. • Lavare tutta la vetreria e riposizionarla negli armadi.
7.PROTOCOLLO COLONNA CROMATOGRAFICA
• Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite. • Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio e mascherina). • Scegliere le dimensioni della colonna cromatografica in base al quantitativo di campione da separare. • Scegliere la fase mobile in base alla solubilità del campione. • Inserire ovatta sul fondo della colonna con una bacchetta di vetro. • Pesare rapidamente i grammi di SiO_2 (fase stazionaria) in una beuta e miscelarli accuratamente con il solvente prescelto (fase mobile). • Tenendo chiuso il rubinetto, versare nella colonna la sospensione di gel di silice (SiO_2) servendosi di un imbuto. • Far fluire l'eccesso di solvente dalla colonna lasciando un sottile strato di solvente (ricordarsi di riversarlo nel cilindro e calcolare il volume morto) sulla silice. • Chiudere la colonna e aggiungere, con una pipetta, la soluzione del campione sulla silice facendola scorrere lungo le pareti per un caricamento omogeneo. • Aprire la colonna e far adsorbire dalla fase stazionaria questa soluzione. • Lavare il pallone con il solvente, prelevare con la pipetta e lavare con questi le pareti della colonna • Far adsorbire dalla fase stazionaria questa soluzione e subito dopo aggiungere lentamente lungo le pareti il solvente fino alla sommità della colonna. • Far fluire l'eluente attraverso la colonna e raccogliere frazioni successive e numerate in diverse provette (volume di raccolta ca. 15 ml) • Mantenere il livello alto del solvente nella colonna aggiungendo solvente in piccoli volumi fino all'eluizione completa della banda colorata del primo prodotto. • Raccogliere tutte le frazioni ritenute necessarie (servendosi di TLC per verificare l'effettiva presenza del prodotto) • Fermare la colonna. • Assicurarsi della presenza del prodotto mediante TLC, riunire le provette che lo contengono in un pallone tarato e se necessario isolare anche gli altri prodotti eseguendo le stesse operazioni. • Portare a secco i palloni al rotavapor e pesare dopo completo allontanamento del solvente.

Elenco delle attrezzature presenti nel laboratorio:

- Reverse-phase HPLC (Shimadzu Model SPD-40 V)
- Sintetizzatore automatico di peptidi Light Blue CEM
- Centrifuga per Eppendorf
- Bilancia analitica
- Piastre riscaldanti con agitatore magnetico x2
- Pompa da vuoto
- Sonicatore x2

Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)

- Cappa chimica
- Armadio per infiammabili
- Armadio acidi-basi

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

- Camice da laboratorio
- Occhiali di protezione
- Mascherina FFP2
- Guanti in nitrile e in lattice

Categorie ISI WEB di riferimento: Chemistry, Organic Chemistry, Medicinal Chemistry, Multidisciplinary

Categorie ERC di riferimento: PE5_17, PE5_7, PE5_11, PE5_18.

Rifiuti Prodotti:

- **Liquidi Alogenati** (Codice 07.01.03) descrizione: Solventi organici alogenati, soluzioni di lavaggio e acque madri. Lo smaltimento viene effettuato con taniche chiuse e sigillate che presentano l'opportuna etichetta che ne indica il contenuto e classe di pericolo. Una volta sigillate ed etichettate vengono portare nell'apposito magazzino temporaneo di smaltimento rifiuti, collocandole nella propria sezione del magazzino dopo aver compilato la relativa scheda deposito temporaneo di rifiuti speciali pericolosi, firmata dal RADoR.
- **Liquidi non Alogenati** (Codice 07.01.04) descrizione: Solventi organici non alogenati, soluzioni di lavaggio, acque madri. Lo smaltimento viene effettuato con taniche chiuse e sigillate che presentano l'opportuna etichetta che ne indica il contenuto e classe di pericolo. Una volta sigillate ed etichettate vengono portare nell'apposito magazzino temporaneo di smaltimento rifiuti, collocandole nella propria sezione del magazzino dopo aver compilato la relativa scheda deposito temporaneo di rifiuti speciali pericolosi, firmata dal RADoR.
- **Rifiuti Solidi Contaminati** (Codice 16.05.06) descrizione: Imballaggi di laboratorio chimicamente contaminati (Guanti, Falcon, Eppendorf e Pasteur).
  Lo smaltimento viene effettuato in contenitori chiusi e sigillati che presentano l'opportuna etichetta che ne indica il contenuto e classe di pericolo. Una volta sigillate ed etichettate vengono portare nell'apposito magazzino temporaneo di smaltimento rifiuti, collocandole nella propria sezione del magazzino dopo aver compilato la relativa scheda deposito temporaneo di rifiuti speciali pericolosi, firmata dal RADoR.
- **Imballaggi** (Codice 15.01.10) descrizione: Flaconi solventi vuoti chimicamente contaminati. Lo smaltimento viene effettuato in contenitori chiusi e sigillati che presentano l'opportuna etichetta che ne indica il contenuto e classe di pericolo. Una volta sigillate ed etichettate vengono portare nell'apposito magazzino temporaneo di smaltimento rifiuti, collocandole nella propria sezione del magazzino dopo aver compilato la relativa scheda deposito temporaneo di rifiuti speciali pericolosi, firmata dal RADoR.
- In caso di bottiglie in vetro contenenti solventi bassobollenti si effettua bonifica e riciclo del contenitore e smaltimento in isola ecologica.