

## ***I campioni: tipologia, preparazione ed inoltro***

### *Sequenziamento di proteine*

Ogni campione deve essere chiaramente individuabile mediante una sigla. Nel caso in cui l'utente conosca già la natura della proteina da analizzare, è opportuno che questo venga segnalato all'operatore, specificando anche l'origine del campione, in modo da favorire il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in banca dati (Swiss-Prot; EMBL).

I campioni proteici da analizzare per la sequenza N-terminale possono essere consegnati: essiccati, in soluzione o su gel/membrana (nell'ultimo caso si prega di contattare preventivamente il tecnico per accordi relativi ai tempi e modi di consegna). In ogni caso è preferibile che siano contenuti in provette di vetro opportunamente chiuse. Il campione essiccato viene ripreso in una soluzione 1:1 di acido acetico:acqua, nel caso di campioni in soluzione, sia la tipologia dei tamponi che il volume utilizzato sono ininfluenti ai fini dell'analisi.

La proteina in soluzione deve essere consegnata congelata al fine di evitare eventuali modificazioni a carico di particolari amminoacidi. Le quantità di campione da analizzare possono essere diverse, ma non devono comunque essere inferiori a 250 pmoli. È importante specificare il grado di purezza del campione allegando eventualmente un tracciato elettroforetico. Si possono analizzare proteine con grado di purezza compreso tra il 70 e il 100%.

Il campione in fase liquida viene caricato su una colonna bifasica, in accordo con le metodiche proposte dal costruttore; quindi il campione è sottoposto alla procedura di sequenziamento.

Nel caso di campioni trasferiti su membrana, ricordando che la resa ottenuta è inferiore a quella per un campione liquido; la quantità minima di proteina elettrotrasferita deve essere pari almeno a 500 pmoli.

### **I campioni consegnati su PVDF/ZITEX devono essere sottoposti alla seguente procedura di western blot:**

- tagliare la membrana in dimensioni analoghe al gel da elettroeluire;
- attivare la membrana per pochi secondi in metanolo puro;
- equilibrare la membrana per 15 minuti circa nella soluzione di trasferimento: CAPS (acido 3-[cicloesilamino] 1-propansulfonico) 10 mM in metanolo 10%, pH 11;
- equilibrare il gel da elettroforesi nella soluzione di trasferimento per almeno 5 minuti;
- assemblare il sandwich (porre, eventualmente, una seconda membrana -preparata come la prima- per essere sicuri di recuperare tutta la proteina dal gel); porre estrema attenzione per evitare la formazione di bolle;
- effettuare l'elettroblot (condizioni di elettroeluzione diverse a seconda del tipo di sistema di trasferimento usato: in genere si consigliano 50 mA per 50 minuti);
- recuperare la membrana e colorarla con una soluzione di blue Coomassie R-250 0.1% in metanolo 50% per circa 15 minuti;
- lavare la membrana con una soluzione decolorante costituita da metanolo 50%, effettuando vari cambi di decolorante sino ad ottenere bande blu evidenti;
- reidratare la membrana con frequenti lavaggi in acqua bidistillata;
- lasciare asciugare a temperatura ambiente la membrana al riparo da contaminazioni;
- congelare la membrana a -20°C se non viene utilizzata immediatamente;
- colorare anche il gel usato per l'elettroeluzione con il metodo classico (fissazione e decolorazione con una soluzione di metanolo 50% e acido acetico 10%, colorante Blue Coomassie 0.1% in metanolo 40% ed acido acetico 1%). La colorazione del gel serve per verificare la corretta eluzione della proteina dal gel alla membrana

La membrana deve essere consegnata a 4°C ed avvolta da alluminio per evitare contaminazioni; la banda relativa alla proteina non deve essere già stata tagliata e deve essere indicata, nel caso in cui siano presenti più bande. È indispensabile che l'elettroeluzione sia stata condotta in CAPS per evitare il blocco dell'N-terminale da parte di altri elettroeluenti, ed in soluzioni prive di acido acetico (che potrebbe interferire durante il sequenziamento, riducendo la resa) (Matsudaira P., J. Biol. Chem., vol 262 (21), 1987, pp. 10035-38).

### *Analisi di amminoacidi*

Per quanto riguarda invece l'analisi degli amminoacidi, gli idrolizzati proteici possono essere consegnati in soluzione di HCl 0.1N (minima concentrazione 200 pmoli/μl) oppure essiccati, preferibilmente in provette di vetro opportunamente chiuse. È possibile anche consegnare campioni non ancora idrolizzati, poiché il laboratorio è attrezzato per operare l'idrolisi acida di proteine e peptidi. In questo caso il campione può essere consegnato essiccato oppure solubilizzato in tampone volatile. Nel caso si debba effettuare un dosaggio di amminoacidi liberi, il campione può essere inviato in tampone purchè venga specificata almeno approssimativamente la concentrazione degli amminoacidi che si ritiene sia presente nel campione, in modo da permettere una opportuna diluizione in acido. Le condizioni di analisi prevedono in ogni caso che il campione sia portato in soluzione di HCl 0.1N in concentrazione pari a 100 pmoli/μl.

### ***Sicurezza ed igiene del lavoro***

È indispensabile evidenziare eventuali rischi associati alla manipolazione del campione, durante lo svolgimento dell'analisi in tutte le sue fasi (preparativa, strumentale, di recupero e conservazione).

La natura dei campioni da sottoporre ad analisi dovrà essere tale da garantire presso il Centro Grandi Strumenti adeguati standard di sicurezza ed igiene del lavoro, nel rispetto delle norme vigenti ed in relazione alle risorse strutturali ed organizzative disponibili.