

Purificazione del lisozima da albume di uovo

a cura di G. Nappo e A. Croce

Il lisozima è un piccolo enzima di circa 14 kDa, che degrada la parete dei batteri. Presente in moltissimi tessuti vegetali e animali, quello più studiato e utilizzato è estratto da albume d'uovo, che ne è particolarmente ricco. Infatti, è possibile purificarlo sfruttando delle resine cariche negativamente che si legano al lisozima, essendo questa l'unica proteina dell'albume ad essere dotata di carica positiva.

Obiettivo

Purificare il lisozima da albume d'uovo utilizzando una cromatografia a scambio ionico con biglie di metilcellulosa (CM), dotate di carica negativa. Le biglie vengono separate dalla soluzione attraverso brevi centrifugazioni a bassa velocità.

Procedimento

1. Rompere l'uovo e separare l'albume dal tuorlo.
2. Misurare il volume dell'albume con un cilindro graduato.
3. Aggiungere una quantità di PBS pari al volume dell'albume.
4. Filtrare l'albume diluito attraverso una garza.
5. Prelevare 300 µl di campione per successive analisi (A).
6. Pipettare 1.5 ml di campione in una provetta da 2 ml.
7. Risospendere le biglie CM-Sepharose invertendo più volte la provetta in cui sono contenute.
8. Aggiungere 150 µl di biglie CM-Sepharose al campione utilizzando un puntale tagliato. Incubare per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente.
9. Centrifugare 2 minuti a 500 *xg*.
10. Utilizzando una siringa da insulina ●, prelevare il supernatante per successive analisi (S). Attenzione a non aspirare le biglie!
11. Aggiungere 1.5 ml di acqua distillata.
12. Centrifugare 2 minuti a 500 *xg*.
13. Utilizzando una siringa da insulina ●, rimuovere il supernatante facendo attenzione a non aspirare le biglie.
14. Ripetere i passaggi 11, 12 e 13 altre 4 volte.
15. Aggiungere 1.5 ml di soluzione di eluizione e incubare per 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente.
16. Centrifugare 2 minuti a 500 *xg*.
17. Utilizzando una siringa da insulina ●, prelevare il supernatante per successive analisi (IP). Attenzione a non aspirare le biglie!



Tempo previsto

Circa 4 ore

Materiale e Reagenti

- ✓ Guanti
- ✓ Provette
- ✓ Portaprovette
- ✓ Puntali
- ✓ Cilindro graduato
- ✓ Siringhe da insulina
- ✓ PBS
- ✓ Biglie CM-Sepharose Fast Flow SIGMA (Cat. CCF100)
- ✓ Acqua distillata
- ✓ Soluzione di eluizione (NaCl 0.5 M)
- ✓ Tampone di caricamento 4X (250 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 400 mM DTT, 40% glicerolo, 0.004% blu di bromofenolo)
- ✓ Lisozima commerciale (1 mg/ml)

Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Centrifuga da banco
- ✓ Agitatore per provette

Preparazione dei campioni per elettroforesi su gel di poliacrilammide

1. Allestire la diluizione 1:25 del campione A e S: trasferire in due provette pulite 144 μl di acqua.
2. Aggiungere 6 μl di campione A in una delle due provette e 6 μl di campione S nell'altra.
3. Mescolare le due provette per inversione.
4. Nominare quattro provette da 1.5 ml pulite "A", "S", "IP" e "L".
5. Nella provetta A trasferire 5 μl di acqua, 5 μl di tampone di caricamento e 10 μl di campione A diluito 1:25.
6. Nella provetta S trasferire 5 μl di acqua, 5 μl di tampone di caricamento e 10 μl di campione S diluito 1:25.
7. Nella provetta IP trasferire 5 μl di tampone di caricamento e 15 μl di campione IP.
8. Nella provetta L trasferire 10 μl di acqua, 5 μl di tampone di caricamento e 5 μl di lisozima commerciale.