

Esercitazione sulla denaturazione delle proteine

Scopo dell'esercitazione: valutare come la variazione di condizioni ambientali possa influire sul mantenimento della struttura nativa delle proteine, e di conseguenza sulle loro caratteristiche e funzioni.

Metodi utilizzati: denaturazione termica, con pH, con solvente, salting-out, saggio della catalasi.

Materiali:

- | | | |
|--------------------------------|--|---|
| - Albume d'uovo | - Provette di plastica | - Solfato di ammonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
| - Acqua distillata | - Provette di vetro | - Perossido di idrogeno 2% (H_2O_2) |
| - Etanolo | - Bacchetta di vetro | - Tubi con tappo a vite da 50 mL |
| - Acido cloridrico (HCl) 1M | - DPI (occhiali e guanti) | - Portaprovette da 13 mL e 50 mL |
| - Idrossido di sodio (NaOH) 1M | - Pipette Pasteur, pipette Gilson p200 e p1000 con puntali | - Spatoline e navicelle per pesata |
| - Campione di mela | - Cloruro di sodio (NaCl) | - Termoblock con acqua |

PROCEDURE

1. Denaturazione termica

- Con una pipetta **Pasteur** trasferire 4 mL di albume d'uovo in una provetta **di vetro**.
- Inserire la provetta nel termoblock con l'acqua bollente, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al tempo (vedi schema a fine protocollo).

2. Denaturazione con variazione di pH

- Con una pipetta **Pasteur** trasferire 5 mL di albume d'uovo in due diverse provette di plastica.
- In una provetta aggiungere ripetutamente all'albume 100 μL di HCl 1M (max. 3 mL) usando la pipetta **Gilson**, mescolando con la bacchetta di vetro, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al volume di HCl aggiunto (vedi schema a fine protocollo).
- Nella seconda provetta, aggiungere ripetutamente all'albume 100 μL di NaOH 1M (max. 3 mL) usando la pipetta **Gilson**, mescolando con la bacchetta di vetro, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al volume di NaOH aggiunto (vedi schema).
- Valutare eventuali differenze tra l'utilizzo dell'acido e della base.

3. Denaturazione con solvente

- Con una pipetta **Pasteur** trasferire 5 mL di albume d'uovo in una provetta di plastica.
- Aggiungere ripetutamente all'albume 100 μL di etanolo (max. 3 mL) usando la pipetta **Gilson**, mescolando con la bacchetta di vetro, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al volume di etanolo aggiunto.

3. Salting-out (precipitazione con denaturazione parziale)

- Con una pipetta **Pasteur** trasferire 3 mL di albume d'uovo in due diverse provette di plastica.
- Preparare per pesata 20 mL di soluzione 5M sia di NaCl sia di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ portando a volume direttamente nei tubi a vite da 50 mL. (NB! mw NaCl = 58,44 - mw $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 132,14)
- In una provetta aggiungere ripetutamente all'albume 500 μL di NaCl 5M usando la pipetta **Gilson** (aggiungere max. 6 mL), mescolando con la bacchetta di vetro, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al volume di NaCl aggiunto.
- Nella seconda provetta, aggiungere ripetutamente all'albume 500 μL di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5M usando la pipetta **Gilson** (aggiungere max. 6 mL), mescolando con la bacchetta di vetro, osservare eventuali cambiamenti nella consistenza e nel colore dell'albume ed annotarli in base al volume di NaOH aggiunto.
- Valutare eventuali differenze tra l'utilizzo dei diversi sali.

4. Saggio funzionale di denaturazione al calore (saggio della catalasi).

- Con una spatolina frammentare in piccoli pezzi il campione di mela e smezzarlo in due provette **di vetro**.
- Inserire una delle due provette nel termoblock con l'acqua bollente per 5 o per 10 minuti, lasciare l'altra provetta sul bancone a temperatura ambiente.
- Aggiungere ad entrambi i campioni 5 mL di acqua ossigenata, osservare se vi è sviluppo di bolle e se vi sono differenze qualitative e quantitative del fenomeno tra i due campioni.

5. Curve di denaturazione

Organizzare i dati ottenuti per le diverse procedure per provare a tracciare una curva di denaturazione. Disegnare un grafico e porre in ascissa la variabile che avete modulato o monitorato (es. tempo di riscaldamento, HCl, NaCl, etc.) e in ordinata un valore numerico rapportato alla condizione del campione seguendo lo schema sottostante.

0 = completamente trasparente/nessun cambiamento

1 = leggero opalescenza/torbidità

2 = opalescenza/torbidità evidente, formazione di micro-aggregati

3 = presenza di aggregati o flocculi visibili

4 = presenza di grandi aggregati / coagulazione parziale

5 = completa coagulazione/gel o massa solida