

# CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA

## ESERCITAZIONE DEL CORSO DI ANALISI DI MACROMOLECOLE

Anno accademico 2016-2017

L'esperimento consiste nella analisi di due estratti proteici frazionati al calore provenienti da cellule di *Escherichia coli* trasformate con un plasmide contenente la sequenza codificante l'alcool deidrogenasi del batterio termofilo *Bacillus stearthermophilus* e di una sua versione mutagenizzata (con una sostituzione aminoacidica di carica); in particolare si doserà l'attività enzimatica a diverse temperature, si identificheranno le attività enzimatiche su un gel nativo e si determinerà il Peso Molecolare degli enzimi denaturati attraverso SDS-PAGE.

### 1. Dosaggio di attività enzimatica

L'ADH catalizza l'ossidazione di alcoli primari in presenza del coenzima NAD<sup>+</sup>, ad un pH ottimale di 8.0; durante la reazione inversa le aldeidi sono ridotte in presenza di NADH ad un pH ottimale intorno alla neutralità. La variazione di assorbanza a 340 nm (variazione del rapporto forma ossidata e ridotta NAD<sup>+</sup>/NADH) per unità di tempo è misura dell'attività enzimatica.

### ADH



#### **Saggio di attività dell'alcool deidrogenasi:**

- 1. miscela di reazione: 2 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM Etanolo in tampone sodio-fosfato 0.025 M, pH 8.** Mescolare 5.0 ml di tampone sodio-fosfato 0.1 M, pH 8, 0.8 ml di NAD<sup>+</sup> 0.05 M, 4 ml di etanolo 0.1 M e portare a 20 ml con H<sub>2</sub>O;
- 2. allestire i saggi di attività mescolando in una cuvetta 1 ml di miscela di reazione e 5-15 µl di estratto;**
- 3. registrare l'incremento di assorbanza a 340 nm in funzione del tempo;**

4. **calcolare le  $\mu\text{moli}$  di NADH formate in 1 ml di miscela di reazione:** dividere l'incremento di assorbanza per minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) per il coefficiente di estinzione millimolare ( $\mu\text{moli/ml}$ ) del NADH (OD a 340 nm  $\cong$  6. 2);
5. **calcolare le unità di attività enzimatica/ml di soluzione saggiata, tenendo conto dei  $\mu\text{l}$  delle frazioni utilizzati per il saggio.** (Una unità enzimatica è la quantità di enzima che converte in prodotto una  $\mu\text{mole}$  di substrato per minuto a 65°C nelle condizioni ottimali per il saggio)

- Dosare l'attività alle varie temperature, riportare i risultati nella tabella e costruire il grafico dell'attività in funzione della temperatura.

	$\Delta\text{O.D./min}$	Unità/ml	Att. Sp U/mg
<b>40°C</b>			
<b>50°C</b>			
<b>60°C</b>			
<b>70°C</b>			
<b>80°C</b>			

## **2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE nativa)**

L'elettroforesi di proteine in condizioni native, consente di individuare una particolare proteina anche in base alla sua attività biologica. Le proteine sono caricate su un gel di poliacrilammide ed analizzate in base alla carica netta che presentano al valore del pH del gel; pertanto la separazione si basa sia sulla diversa mobilità elettroforetica che sugli effetti di setaccio molecolare del gel. L'enzima di interesse può essere identificato incubando il gel, dopo la separazione elettroforetica, in un'opportuna soluzione contenente un substrato in grado di fornire un prodotto colorato laddove è presente l'enzima.

All'interno dello stesso gel saranno caricati dei duplicati dello stesso campione. A separazione ultimata, il gel è tagliato in due e, mentre una parte viene colorata per l'attività, l'altra viene colorata con Coomassie per la determinazione delle proteine totali; in questo modo è possibile

analizzare il contenuto proteico del campione in esame e identificare la banda corrispondente all'enzima di interesse.

Si caricheranno estratti proteici contenenti due isoenzimi alcool deidrogenasi che differiscono per una sola sostituzione amminoacidica di carica.

### **Preparazione del gel:**

Dopo aver sistemato la lastrine contenenti il gel nell'apposito apparecchio, ed aver riempito le apposite vaschette con il tampone di corsa, i campioni vengono stratificati nei diversi pozzetti, utilizzando il pipettatore automatico.

Collegati gli elettrodi all'alimentatore di corrente (25 mA), si fa avvenire la corsa elettroforetica sino a quando il tracciante (Blu di Bromofenolo) raggiunge l'estremità del gel.

Ad elettroforesi terminata, smontato l'apparecchio, il gel viene liberato dalle lastrine, diviso in due ed una metà è immersa nella soluzione di colorante Coomassie blu per circa 15 minuti e poi nella soluzione di decolorante, l'altra è sottoposta a colorazione di attività. Tale colorazione consiste nell'incubare il gel in cui sono state separate le proteine per 5 min a 60°C con una soluzione tampone contenente il substrato, il coenzima specifico, e alcune sostanze specifiche che in seguito al trasferimento di elettroni formano dei prodotti colorati. Nel caso specifico, in seguito all'attività catalizzata dall'ADH, il NADH prodotto trasferisce gli elettroni ricevuti al nitroblutetrazolio che riducendosi si trasforma in un prodotto colorato che può essere visualizzato come una banda su gel. La reazione è bloccata con 10% acido acetico.

### **Soluzioni:**

A. gel di poliacrilammide al 7% (lower) e al 5% (upper);

B. tampone di corsa: Tris-glicina pH 8.3;

C. soluzione per campioni: Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 2-mercaptoetanol 7 mM, glicerolo 10%, Blu di Bromofenolo 1%.

D. Soluzione per la colorazione del gel: Blu di Coomassie 0.3% in acido acetico 10%, metanolo 25 %.

E. Soluzione di decolorazione delle proteine: 30 % etanolo, 10% acido acetico.

F. Soluzione di colorazione di attività (30 mL) : 25 mM Na-P pH 8, 30 mM Etanolo, 2 mM NAD, 0.33 mg/ml Nitro Blue-Tetrazolio, 0.06 mg/ml Fenazina Metasolfato. (Sono fotosensibili, tenerli al riparo dalla luce).

### **Campioni:**

1. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "wild type" con tampone di caricamento.

2. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "Glu11-Lys" con tampone di

caricamento.

3. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "wild type" con tampone di caricamento.

4. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "Glu11-Lys" con tampone di caricamento.

**Analisi del gel:**

- Determinare la purezza relativa dei campioni.

- Identificare le differenti attività alcool deidrogenasiche su gel e associarle a bande proteiche specifiche.

**3. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)**

In condizioni denaturanti (riscaldamento) e' possibile ottenere complessi proteina-sodio-dodecil-solfato (SDS); l'aggiunta di riducenti (2- mercaptoetanolo) provoca inoltre la rottura dei ponti disolfuro. I complessi SDS-proteina sottoposti ad elettroforesi migrano verso l'anodo perché l'SDS conferisce una carica unitaria negativa alle proteine. Quindi, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, le proteine a minor peso molecolare si muovono più velocemente, mentre quelle a maggior peso molecolare migrano più lentamente.

Le proteine dopo separazione sono visualizzate mediante Coomassie Blue, che evidenzia nel gel una serie di bande a seconda del numero di proteine presenti nel campione.

**Soluzioni:**

A. gel di poliacrilammide al 12.5% (lower) e al 5% (upper);

B. tampone di corsa Tris-glicina pH 8.3;

C. soluzione denaturante per campioni: Tris.HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 4%, 2-mercaptoetanolo 7 mM, glicerolo 10%, Blu di Bromofenolo 1%.

D. soluzione per la colorazione del gel: Blu di Coomassie 0.3% in acido acetico 10%, metanolo 25%.

E. soluzione per la decolorazione del gel: acido acetico 10%, metanolo 25%.

**Campioni :**

1. Miscela di proteine di peso molecolare noto

2. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "wild type" con tampone di caricamento.

3. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "Glu11-Lys" con tampone di caricamento.

**Procedimento:**

Dopo aver sistemato la lastrine contenenti il gel nell'apposito apparecchio, e aver riempito le apposite vaschette con il tampone di corsa, i campioni vengono stratificati nei diversi pozzetti, utilizzando il pipettatore automatico. Collegati gli elettrodi all'alimentatore di corrente (25 mA), si fa avvenire la corsa elettroforetica sino a quando il tracciante (Blu di Bromofenolo) raggiunge l'estremità del gel.

Ad elettroforesi terminata, smontato l'apparecchio il gel viene liberato dalle lastrine e immerso nella soluzione di colorante per circa 15 minuti e poi nella soluzione di decolorante.

**Analisi del gel:**

-Calcolare la migrazione elettroforetica (mm) dei marcatori di peso molecolare e allestire la retta mettendo in grafico il logaritmo del peso molecolare (ordinate) in funzione della migrazione (ascisse).

- Calcolare il peso molecolare dell'ADH.