

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA GENERALE E APPLICATA

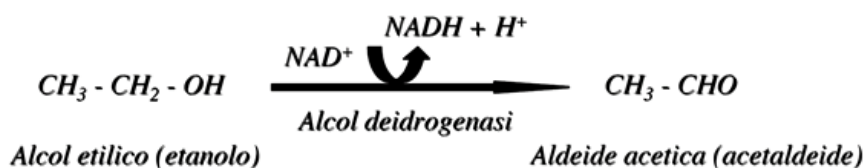
Corso di Tecniche biomolecolari applicate

Modulo "Analisi di Macromolecole"

1. Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE nativa)

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 (ADH) (EC 1.1.1.1) del batterio termofilo *Bacillus stearothermophilus* e una sua versione mutagenizzata (con una sostituzione amminoacidica di carica); in particolare si identificheranno le attività enzimatiche su un gel nativo e si determinerà il Peso Molecolare degli enzimi denaturati attraverso SDS-PAGE.

L'ADH catalizza l'ossidazione di alcoli primari in presenza del coenzima NAD^+ , 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 $NAD^+/NADH$) per unità di tempo è misura dell'attività enzimatica.



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 le 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:

	estratto μl	tampone di caricamento per gel nativo 2X μl
1	10	10
2	10	10

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

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

Analisi del gel:

- Determinare la purezza relativa dei campioni.
- Identificare le differenti attività alcool deidrogenasiche su gel e associarle a bande proteiche specifiche.

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

In condizioni denaturanti (riscaldamento) è possibile ottenere complessi proteina–sodio-dodecil-solfato (SDS); l'aggiunta di riducenti (2- mercaptoetanololo) 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 SDS 0,1%;
- C. **soluzione denaturante per campioni:** Tris.HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 4%, 2-mercaptoetanololo 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:

	Campione μl	tampone di caricamento per gel denaturante 2X μl	H ₂ O μl
1	2,5	5	2,5
2	5	10	5
3	5	10	5

1. Marker di peso molecolare (ColorBurst Electrophoresis Marker, Sigma)
2. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "wild type"
3. Estratto di *E. coli* contenente l'ADH di *Bacillus stearothermophilus* "Glu11-Lys".

Procedimento:

Dopo aver sistemato le 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 (cm) 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 riportando i dati in tabella

	Marker/	PM kDa	Log ₁₀ PM	m.e
1	Red	175		
2	Red	130		
3	Blue	95		
4	Red	70		
5	Red	62		
6	Red	51		
7	Blue	42		
8	Red	29		
9	Red	22		
10	Red	14		
11	Blue	10.5		

3. Determinazione dell'attività della Fosfatasi Alcalina e del pH ottimale

Le fosfatasi catalizzano l'idrolisi degli esteri dell'acido fosforico. Vi sono fosfatasi acide e alcaline che si distinguono per il pH a cui esplicano la loro massima attività. Oltre a questi due tipi di fosfatasi, relativamente aspecifiche, esistono altre fosfatasi specifiche per determinati esteri fosforici (ad esempio il glucosio-6-fosfatasi, la fruttosiodifosfatasi ecc..).

La fosfatasi alcalina (fosfoidrolasi di un monoestere fosforico, EC 3.1.3.1) è presente nei procarioti e negli eucarioti; nei mammiferi si distinguono forme isoenzimatiche tessuto-specifiche che differiscono per carica netta, sensibilità ad inibitori e al riscaldamento. È particolarmente abbondante nella bile e negli osteoblasti. La determinazione della fosfatasi alcalina nel siero è largamente impiegata nella pratica del laboratorio clinico come elemento diagnostico in parecchie malattie. La fosfatasi alcalina è presente anche nel latte e viene inattivata dal calore. Il dosaggio dell'enzima nel latte rappresenta quindi un indice dell'avvenuta pastorizzazione (test di pastorizzazione).

Il migliore substrato per il dosaggio della fosfatasi alcalina è il 4-nitrofenilfosfato. Tale composto non è certamente un substrato fisiologico dell'enzima, tuttavia viene rapidamente idrolizzato *in vitro* dalla fosfatasi, dando un prodotto di idrolisi, il 4-nitrofenolo, che in ambiente alcalino sviluppa una colorazione gialla con un massimo di assorbimento a 405 nm:



L'enzima dalla mucosa intestinale bovina utilizzato per l'esperienza in oggetto è un omodimero di 70 kDa; ciascuna subunità contiene 2 atomi di zinco con un ruolo catalitico e strutturale.

L'enzima è dosato in miscele di reazione di 1 ml contenenti concentrazioni crescenti di 4-nitrofenilfosfato, in tampone Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8,5. Dopo l'aggiunta dell'enzima in cuvetta si agita con Parafilm e si segue in continuo l'aumento di assorbanza a 405 nm a temperatura ambiente. Dal valore del $\Delta A/\text{min}$, noto il coefficiente di estinzione mM del p-nitrofenolo a tale lunghezza d'onda ($18.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), si calcolano le Unità enzimatiche contenute nel campione.

La dipendenza dell'attività della fosfatasi alcalina dal pH

Sono disponibili le seguenti soluzioni:

-5 mM 4-nitro-fenil-fosfato;

-fosfatasi alcalina 0.8 mg/ml.

Tamponi a diverso pH

0,1 M Tris-HCl pH 7/10mM MgCl₂

0,1 M Tris-HCl pH 7.5/10mM MgCl₂

0,1 M Tris-HCl pH 8.5/10mM MgCl₂

0,1 M glicina-Tris-HCl pH 9/10mM MgCl₂

0,1 M glicina-NaOH pH 10/10mM MgCl₂

0,1 M glicina-NaOH pH 11

Allestire miscele di reazione che differiscano per il valore del pH. Dosare l'attività con circa 4 -12 µg di fosfatasi alcalina secondo il seguente schema:

	H ₂ O	tampone	p-nitro-fenilfosfato 5mM	MgCl ₂ 2M	Fosfatasi alcalina	ΔOD/min	U/ml	U/mg
pH 7	285 µl	500 µl	200 µl	-	15 µl			
pH 7.5	285 µl	500 µl	200 µl	-	15 µl			
pH 8	285 µl	500 µl	200 µl	-	15 µl			
pH 9	295 µl	500 µl	200 µl	-	5 µl			
pH 10	295 µl	500 µl	200 µl	-	5 µl			
pH 11	282.5 µl	500 µl	200 µl	2.5 µl	15 µl			

2. Seguire l'aumento di assorbanza a 405 nm; il coefficiente di estinzione millimolare del p-nitrofenolo è pari a 18.2.

3. Calcolare le unità di attività enzimatica.

4. Riportare l'attività specifica (U/mg) in funzione del pH.