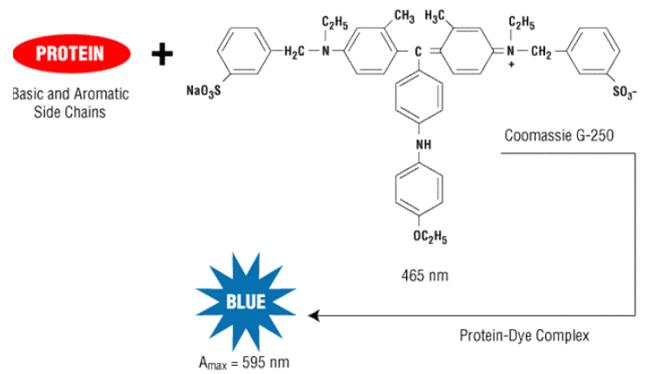
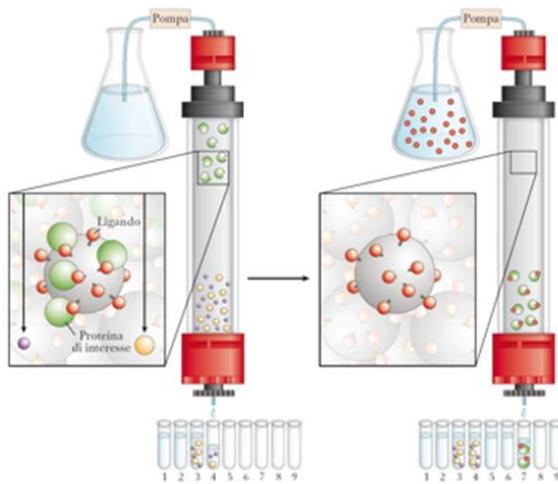


CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN BIOLOGIA

ESERCITAZIONE DI BIOCHIMICA

a.a. 2021/2022



NORME GENERALI DI COMPORTAMENTO DA OSSERVARE NEI LABORATORI DIDATTICI

- **Indossare Dispositivi di protezione individuale (DPI): camice (protezione del corpo) e guanti (protezione delle mani);**
- **indossare scarpe chiuse;**
- **raccogliere, ove richiesto, i capelli dietro la nuca;**
- **attenersi al corretto smaltimento di qualsiasi tipo di rifiuto;**
- **leggere le schede di rischio e sicurezza dei diversi reagenti utilizzati riportate alla fine della dispensa;**
- **leggere le schede di sicurezza e di uso degli apparecchi utilizzati**

Tutte le fasi operative dell'esercitazione sono eseguite dagli studenti sotto la supervisione del docente Responsabile Attività Didattica e di Ricerca in Laboratorio (RADRL)

Titolo esercitazione: Purificazione mediante cromatografia di affinità della Ss- β Galattosidasi (Ss β Gly) e sua caratterizzazione

L'esercitazione si divide in 4 parti ciascuna delle quali caratterizzata da una metodica sperimentale specifica:

- 1) purificazione, a partire da un estratto proteico, della proteina Ss- β Galattosidasi (Ss β Gly), espressa come proteina di fusione GST-Ss β Gly in *Escherichia coli* (vedi esercitazioni del corso di Biologia Molecolare): **cromatografia di affinità**.
- 2) Valutazione di peso molecolare e grado di purezza della proteina: **Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE)**.
- 3) Determinazione della concentrazione proteica: **metodo colorimetrico di Bradford**.
- 4) Dosaggio di attività enzimatica: **metodo spettrofotometrico**.

1° PARTE: Purificazione della Ss β Galattosidasi mediante cromatografia di affinità

A) Il legame della proteina chimerica alla resina e l'azione della trombina (operazioni preliminari condotte dal docente)

L'estratto proteico di partenza contiene la proteina chimerica GST-Ss β Gly, espressa in cellule di *Escherichia coli*, costituita dall'enzima Glutazione S-Tranferasi (GST) e dall'enzima termostabile Ss β Galattosidasi (Ss β Gly) dell'archaeon termofilo *Saccharolobus solfataricus*. GST e Ss β Gly sono unite da un peptide di connessione contenente la sequenza amminoacidica LVPRGS, sito di idrolisi della proteasi trombina. La proteina GST-Ss β Gly è stata preliminarmente legata alla fase stazionaria della resina costituita da Glutazione (GSH, il ligando) immobilizzato su biglie di Sefarosio (resina GSH Sefarosio 4B); il legame della proteina chimerica GST-Ss β Gly alla resina, quindi, è mediato dall'enzima GST che presenta un'alta affinità per il ligando GSH. La resina è stata a) lavata con 20 mL di tampone PBS (0.15 M NaCl¹, 0.02M Fosfato di Sodio² pH 7.3) con aggiunta di 1% Triton X-100³, b) risospesa in 1 mL di PSB fresco addizionato con 30 U di trombina⁴ (1 U/ml in PBS) e c) incubata per 16 ore a 4°C.

B) Eluizione della proteina Ss β Gly (ad opera degli studenti)

- Inserire l'apposito filtro all'interno della colonna vuota aiutandosi con una pasteur di plastica o con una pipetta facendo attenzione a non deformarlo.
- Lavare la colonna vuota con 4 ml di ddH₂O
- Versare la resina nella colonnina di plastica vuota posizionando al di sotto una provetta eppendorf.
- Raccogliere l'eluizione contenente l'enzima (Eluizione 1 - E1)
- Lavare la resina con 1 mL di tampone PBS per 3 volte raccogliendo frazioni da 1.0 ml (E2, E3 ed E4)

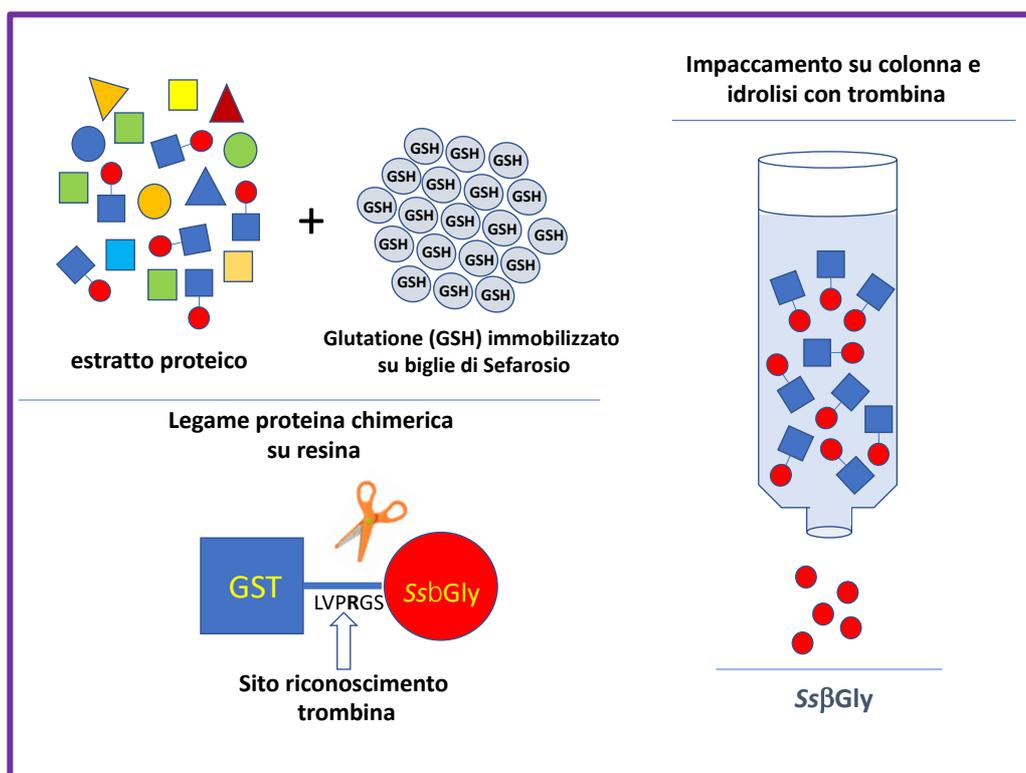


Fig. 1 Purificazione mediante cromatografia di affinità di SsbGly

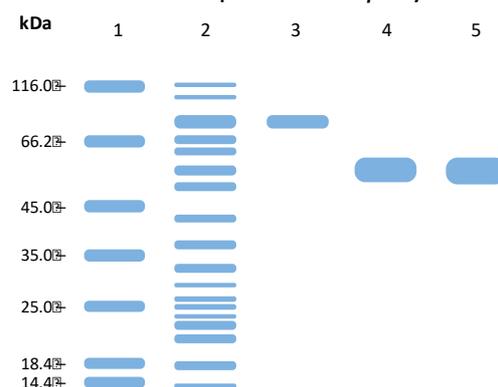
c) 2° PARTE: Valutazione di peso molecolare e grado di purezza della proteina: Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE).
 Questa esercitazione verrà condotta in modo virtuale interattivo.
 Un gel rappresentativo della procedura di purificazione verrà mostrato dal docente al momento dell' esercitazione.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS⁷ (Sodio Dodecil Solfato), nota come SDS-PAGE, è il tipo di elettroforesi più utilizzato in biochimica analitica, in quanto permette di stabilire con buona accuratezza sia il grado di purezza della proteina che si sta purificando sia il suo peso molecolare. Nella presente esercitazione si utilizzeranno gel pronti all'uso (PreCast). In questo caso l'acrilammide polimerizzata non comporta alcun rischio se muniti di dispositivi di protezione individuali, quali camice e guanti.

Le frazioni eluite dalla colonna, insieme agli appositi controlli e marcatori di peso molecolare, verranno analizzati su SDS-PAGE. I campioni, prima di essere caricati sul gel, verranno denaturati al calore mediante incubazione a 100°C. Terminata la corsa elettroforetica, il gel sarà colorato per evidenziare le bande proteiche. La digestione proteolitica della proteina chimerica (85 kDa) determinerà il rilascio di SsβGly che ha una mobilità elettroforetica corrispondente a un peso molecolare atteso di circa 56kDa.

Analisi delle frazioni eluite mediante SDS-PAGE

- Preparazione dei campioni da caricare su SDS-PAGE:
 - 1) 5 μl di Miscela di proteine standard + 5 μl di tampone di caricamento⁸
 - 2) 10 μl di estratto grezzo non digerito con trombina + 10 μl di tampone di caricamento
 - 3) 10 μl di campione legato alla resina + 10 μl di tampone di
 - 4) 10 μl di eluato + 10 μl di tampone di caricamento
 - 5) 10 μl di SsβGly pura (controllo positivo) + 10 μl di tampone di caricamento
- Incubare le miscele 5 min a 100 °C
- Caricare con le apposite pipette i campioni nei pozzetti del gel
- Collegare i cavetti dell'apparecchio elettroforetico al generatore di corrente ed avviare l'elettroforesi a 100 Volt per ~60 min
- Seguire la corsa elettroforetica fino a che il tracciante, il Blu di Bromofenolo, non arriva alla fine del gel
- Spegner l'alimentatore
- Separare le lastrine e immergere il gel nella soluzione di colorazione (Instant Blue¹³)
- Decolorazione del gel in acqua
- Analisi del profilo elettroforetico della proteina SsβGly



A titolo esemplificativo, in figura è riportato un gel di riferimento in cui sono stati caricati i campioni relativi a differenti passaggi di purificazione:

Linea 1: Marcatori di peso molecolare;

Linea 2: Estratto grezzo, rappresenta il prodotto della lisi dei batteri

Linea 3: Campione legato alla resina non ancora trattato con trombina

Linea 4: Eluato dopo trattamento con trombina.

Linea 4 (SsβGly pura): aliquota di proteina pura;

La proteina chimerica ha un peso molecolare complessivo di circa 84 kDa mentre l'enzima, oggetto della presente esercitazione, è costituito da 4 subunità identiche di 56 kDa ciascuna, per una struttura quaternaria tetramericata con un peso molecolare totale di 240 kDa. Tuttavia, le condizioni denaturanti dell'elettroforesi implica la separazione delle subunità, queste ultime evidenziabili su gel come una singola banda con mobilità elettroforetica corrispondente a un peso di circa 56 kDa.

3° PARTE: Determinazione della concentrazione proteica: metodo colorimetrico di Bradford.

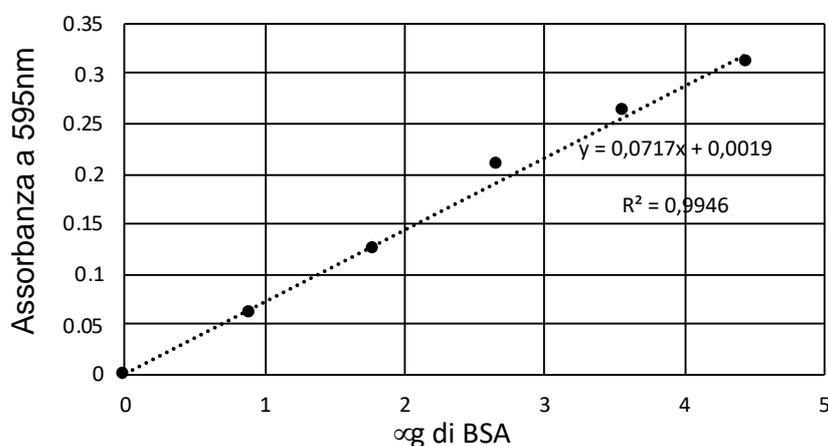
Il reattivo utilizzato contiene un colorante (Coomassie Brilliant Blue) che lega gli amminoacidi basici ed aromatici (soprattutto l'arginina) formando un addotto colorato in blu; entro un intervallo di linearità, maggiore è la quantità proteica, maggiore sarà l'intensità del colore e, quindi, l'assorbanza (A, in Densità Ottiche, O.D.) alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il metodo prevede la costruzione di una retta di taratura costruita con concentrazioni proteiche note. Noi utilizzeremo l'albumina di siero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) alla concentrazione di 0.15 µg/µl in acqua.

A) Allestire 9 cuvette di plastica, secondo lo schema seguente. Il volume totale deve essere 1 ml (1000 µl), cioè 500 µl di reattivo + 500 µl della somma BSA/campione e acqua.

Le cuvette da #2 a #6 serviranno a costruire la "retta di taratura". Le cuvette #7, #8 e #9 contengono volumi diversi del campione (l'eluato dalla resina contenente l'enzima).

#	BSA	Campione	H ₂ O	Reattivo ⁶	A (O.D.) a 595 nm
1	--	--	500 µl	500 µl	
2	20 µl (3 µg)	--	480 µl	500 µl	
3	30 µl (4,5 µg)	--	470 µl	500 µl	
4	40 µl (6 µg)	--	460 µl	500 µl	
5	60 µl (9 µg)	--	440 µl	500 µl	
6	80 µl (12 µg)	--	420 µl	500 µl	
7	--	30 µl	470 µl	500 µl	
8	--	40 µl	460 µl	500 µl	
9	--	50 µl	450 µl	500 µl	

B) Agitare con parafilm ogni cuvetta, misurarne l'assorbanza a 595 nm e riportare i valori in tabella. La cuvetta #1 costituirà il Bianco, data la sola presenza di acqua e reattivo: perciò, il suo valore di assorbimento deve essere sottratto a quello di ciascuna altra cuvetta.



Esempio di Retta di taratura utilizzando il metodo colorimetrico di Bradford;

Determinare l'equazione della retta ($y = mx+c$)

- Selezionare uno dei punti sul grafico;
- aprire il menu col tasto destro e quindi scegliere "aggiungi linea di tendenza";
- selezionare le opzioni Lineare;
- visualizzare l'equazione sul grafico [$y = mx+c$]
- visualizzare il valore di R^2 sul grafico.

y: valore di assorbanza a 595nm

x: valore dei μg di BSA utilizzati

m: coefficiente angolare espresso come $(A_{595\text{nm}})/(\mu\text{g BSA})$.

c: intercetta sull'asse Y

R^2 : coefficiente di correlazione lineare al quadrato. R^2 indica la bontà della regressione lineare e quindi la qualità della retta di calibrazione eseguita. Matematicamente il valore R^2 va da 0 a 1 dove [$R^2 = 1$] indica una retta perfetta. Per una corretta determinazione del titolo proteico totale di una soluzione, la retta di calibrazione deve avere un valore di $R^2 \geq 0.99$

Dalla retta di taratura è possibile determinare la quantità di proteine presenti nell'eluato applicando la seguente formula $x = (y - c) / m$, dove x rappresentano i μg di proteine, y rappresenta il relativo valore di Assorbanza a 595nm, m e c rappresentano, rispettivamente, la pendenza e l'intercetta della retta di taratura

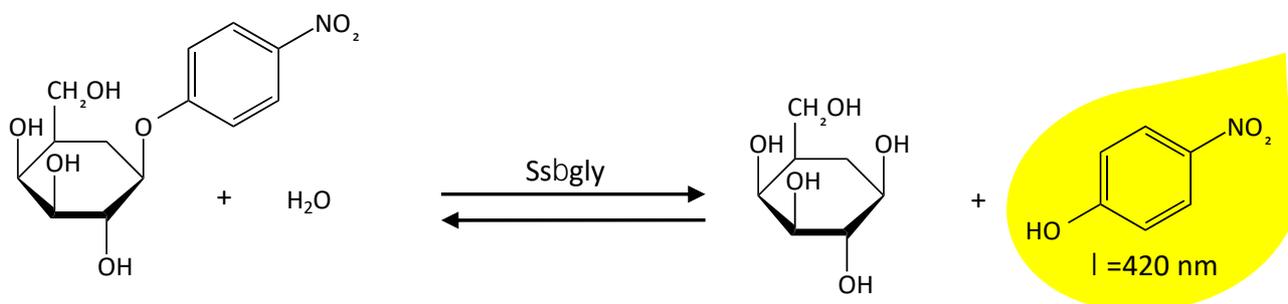
$$\mu\text{g} = [(O.D_{595} - c) / m]$$

La concentrazione proteica [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] sarà determinata dividendo il valore dei μg ottenuti per il volume di eluato utilizzato. La concentrazione proteica dell'eluato sarà una media aritmetica dei valori ottenuti.

4° PARTE: Dosaggio di attività enzimatica: metodo spettrofotometrico

Le glicosil idrolasi (EC 3.2.1.X), enzimi largamente diffusi in tutti i domini degli esseri viventi, sono stati classificati in 166 famiglie in base a dati strutturali e biochimici. Questi enzimi catalizzano l'idrolisi di legami *O*- e/o *N*-glicosidici presenti nei carboidrati. La β -galattosidasi (EC 3.2.1.23) dell'archaeon ipertermofilo *Saccharolobus solfataricus* (Ss β Gly) idrolizza substrati naturali e sintetici contenenti galattosio o glucosio legato in beta. Il para-nitrofenil- β -D-Galattopiranoside¹⁴ (pNpGal), un analogo sintetico del disaccaride lattosio (Glucosio-beta-1,4-Galattosio), è idrolizzato dalla Ss β Gly a 65 °C e pH 6.5; l'enzima idrolizza il legame *O*-glicosidico del Substrato sintetico producendo galattosio e para-nitro-fenolo¹⁵ il quale, in forma libera, assume una colorazione gialla a pH neutri/alcalini che ne permette la rilevazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 420 nm ($\epsilon_{mM} = 17.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 10.0 e a temperatura ambiente).

La reazione enzimatica catalizzata è la seguente:



- A) Preparare le seguenti mix (200 μL finali) in Eppendorf (la concentrazione saturante del Substrato è 5 mM). La mix "Bianco" (NON contiene il campione contenente l'enzima, ma contiene lo stesso volume di PBS 1X rispetto a quello della mix "Reazione") consente di valutare la degradazione non enzimatica, spontanea del Substrato.

	Tampone Fosfato 200 mM, pH 6.5	Substrato pNPGal 20 mM	Campione	H ₂ O	A (O.D.) a 420 nm
Mix "Bianco"	50 µL	50 µL	10 µl di PBS 1X	90 µl	
Mix "Reazione"	50 µL	50 µL	10 µl di enzima	90 µl	

- B) Preincubare le due mix a 65 °C per 2 min
- C) Aggiungere il campione nella mix "Reazione" e incubazione a 65°C per 2 minuti.
- D) Mettere le due mix in ghiaccio e aggiungere in ciascuna 800 µL di sodio carbonato 1M pH 10.0
- E) Trasferire le due mix in cuvette di plastica e di ciascuna leggere l'assorbimento a 420 nm; sottrarre l'A della mix "Bianco" da quello della mix "Reazione".

Utilizzando la Legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon l C$) e tenendo conto del tempo della reazione si possono calcolare le Unità enzimatiche (U), cioè la quantità di enzima richiesta per convertire 1 µmol di Substrato in Prodotto in 1 min, in condizioni di temperatura definite e a un valore di forza ionica e pH ottimale.

$$\text{Attività specifica} \quad \frac{U}{mg} = \frac{OD \text{ al min}}{\epsilon mM / \mu g E} \times 1000$$

L'attività specifica di un enzima (U/mg) rappresenta un parametro che può essere utilizzato per valutare il suo grado di purezza. Nel corso dell'esperienza sarà possibile paragonare le diverse preparazioni enzimatiche comparando i valori di attività specifica misurato nei diversi gruppi di lavoro o alternativamente delle diverse eluizioni raccolte E1, E2, E3 ed E4.

Campione	Unità Enzimatiche (U)	mg di Enzima	Attività specifica (U/mg)
Eluizione 1			

NUMERI IDENTIFICATIVI DELLE SOSTANZE CHIMICHE UTILIZZATE (CAS) E RELATIVE FRASI DI
RISCHIO E DI SICUREZZA

¹ NaCl CAS Number 7647-14-5

² Fosfato di Sodio CAS Number 10101-89-0

³ Triton X-100 Detergente non ionico. CAS Number: 9002-93-1. Irritante e corrosivo a contatto con gli occhi e le mani a concentrazioni elevate. Non critico alle concentrazioni utilizzate nelle esercitazioni e muniti di guanti.

⁴ trombina CAS Number: 9002-04-4

⁵ BSA: CAS Number 9048-46-8

⁶ reattivo di Bradford: CAS Number: 6104-58-1 (Coomassie); CAS Number: 7664-38-2 (Acido fosforico); CAS Number 67-56-1 (metanolo)

⁷ SDS: CAS Number: 151-21-3

⁸ Tampone di caricamento, preparato preventivamente dal docente RADRL, è così costituito: 62.5 mM Tris-HCl⁹ pH 6.8. 2% SDS¹⁰, 25% glicerolo¹¹, 0.01% Blu di bromofenolo¹².

⁹ Tris-HCl: Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato. Utilizzato per la preparazione di tamponi. CAS number 1185-53-1. Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

¹⁰ SDS (sodio dodecilsolfato): CAS number 151-21-3. Tossico se inalato o ingerito. Non comporta criticità alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

¹¹ Glicerolo; CAS number 56-81-5 Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e muniti di guanti.

¹² Blu di bromofenolo: indicatore della corsa elettroforetica. Non tossico. Innocuo alle concentrazioni utilizzate durante le esercitazioni e se muniti di guanti.

¹³ Instant Blue CAS Number 7664-38-2

¹⁴ para-nitrofenil-β-D-Galattopiranoside (pNpGal) (CAS-Number: 3150-24-1, scheda di sicurezza allegata al presente documento)

¹⁵ para-nitrofenolo (CAS-Number: 100-02-7; scheda di sicurezza allegata al presente documento)