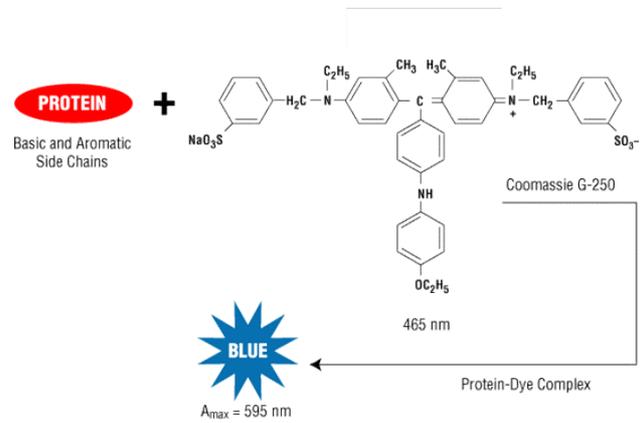
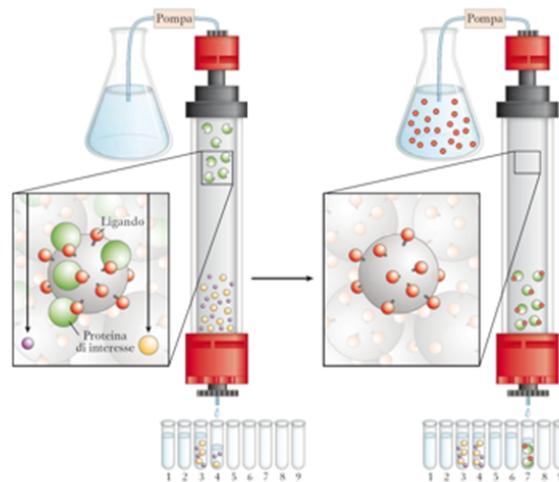


CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN BIOLOGIA

ESERCITAZIONE DI BIOCHIMICA

a.a. 2024/2025



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 β -Galattosidasi da *Saccharolobus solfataricus* (Ss β Gly) e sua caratterizzazione

L'esercitazione si divide in quattro esperienze, ciascuna delle quali caratterizzata da una metodica sperimentale specifica:

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

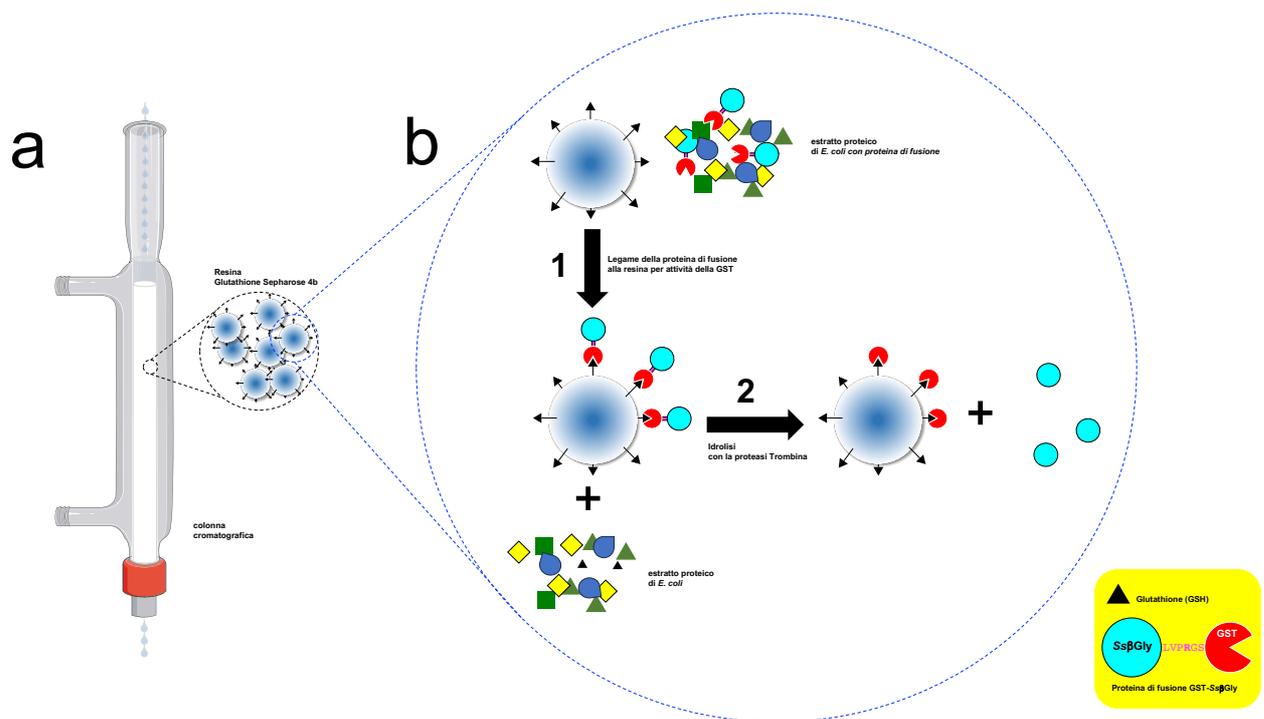
1° ESPERIENZA: Purificazione di Ss β Gly mediante cromatografia di affinità

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

L'estratto proteico di partenza, di cui vi è fornita una aliquota per le successive analisi, 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 Gly dell'archaeon termofilo *Saccharolobus solfataricus*. GST e Ss β Gly sono unite da un peptide di connessione contenente la sequenza amminoacidica LVPRGS, sito specifico di idrolisi della proteasi trombina. La proteina GST-Ss β Gly è stata preliminarmente legata alla fase stazionaria (1) della resina Sefarosio 4B derivatizzata con il Glutazione (GSH; Fig. 1); il legame della proteina chimerica GST-Ss β Gly alla resina, quindi, è mediato dall'enzima GST che presenta un'alta affinità per il proprio ligando GSH. La resina è stata **a)** lavata con 20 mL di tampone PBS (Phosphate Buffered Saline: 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 PBS fresco addizionato con 30 U di trombina⁴(1 U/mL in PBS) e **c)** incubata per 16 ore a 4°C (2).

B) Eluizione della proteina SsβGly (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 1mL di tampone PBS per 3 volte raccogliendo frazioni da 1mL (E2, E3 ed E4)



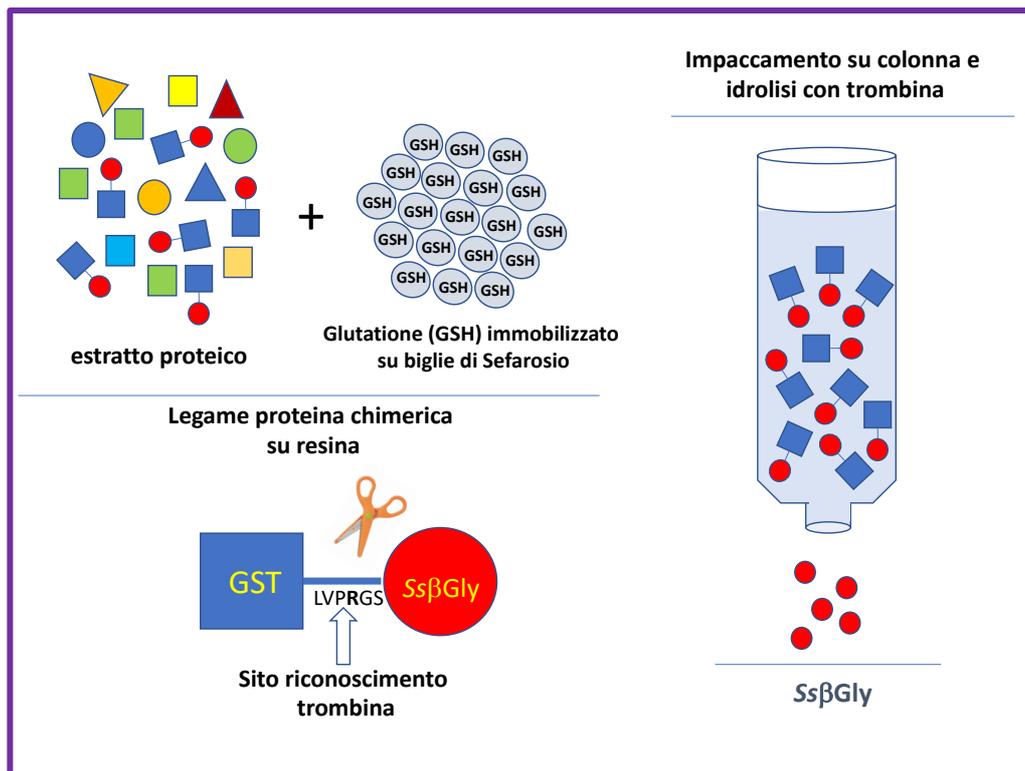


Fig. 1 Purificazione mediante cromatografia di affinità di SsβGly

c) 2° ESPERIENZA: Valutazione del peso molecolare e del 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.

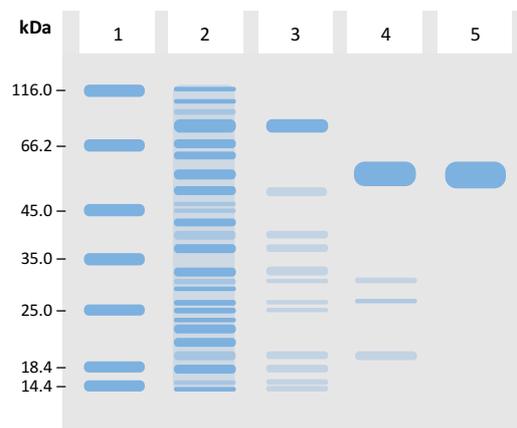
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS⁷ (Sodio Dodecil Solfato), nota come SDS-PAGE, è il tipo di elettroforesi più utilizzato in biochimica analitica, in quanto permette di stabilire con buona accuratezza sia il grado di purezza della proteina che si sta purificando, sia il suo 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) 5μL di Mix 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 eluito con GSH + 10 μL di tampone di caricamento
 - 4) 10 μL di eluato digerito con Trombina + 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 ca. 60 min;
- Seguire la corsa elettroforetica fino a che il tracciante, il Blu di Bromofenolo, non arriva alla fine del gel;
- Spegnerne 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 con un peso molecolare apparente di 56 kDa ciascuna, per una struttura quaternaria tetramerica 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° ESPERIENZA: Determinazione della concentrazione proteica con il 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, la quantità proteica è direttamente proporzionale all'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. Per la retta di taratura, utilizzeremo l'albumina di siero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) alla concentrazione di 0.15 µg/µL in acqua.

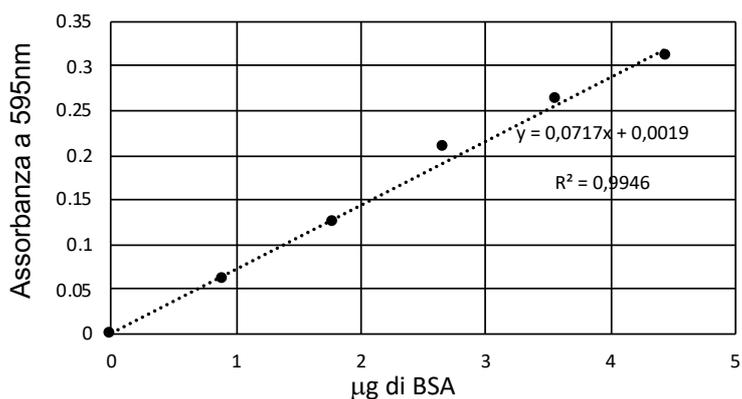
A) Allestire 10 cuvette di plastica, secondo lo schema seguente. Il volume totale deve essere 1 mL (1000 µL), cioè 500 µL di reattivo + 500 µL della somma BSA/campione e acqua.

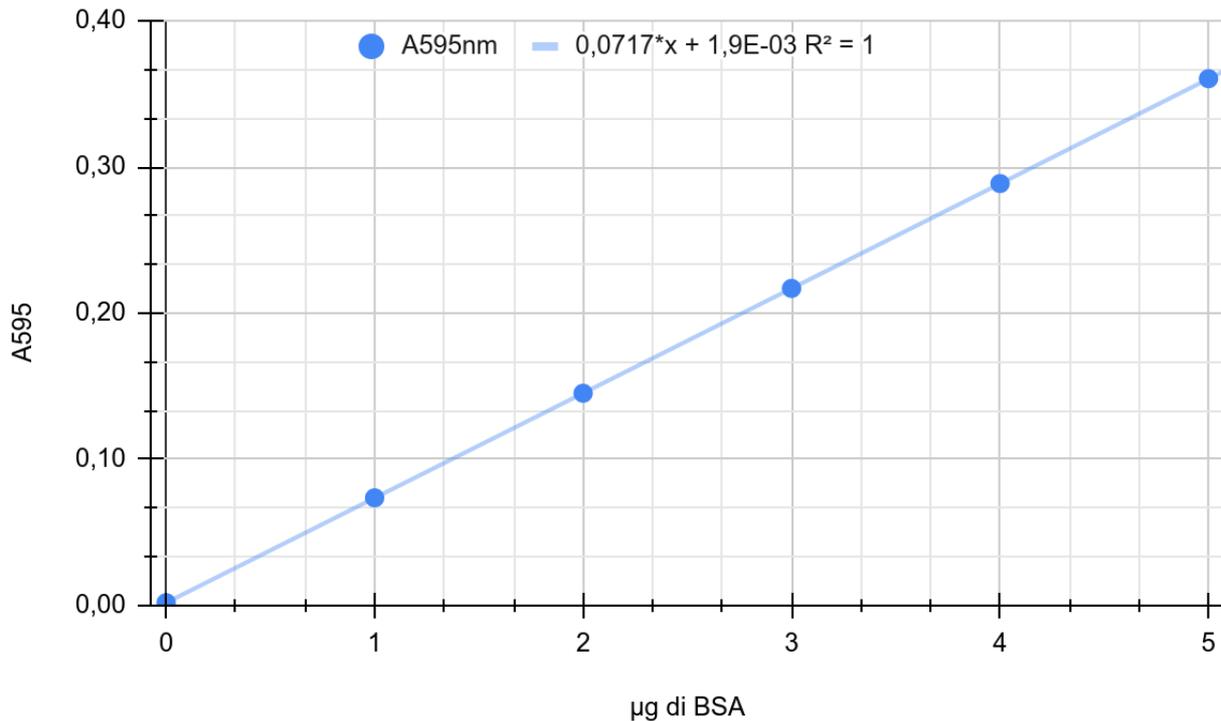
Le cuvette da #2 a #6 serviranno a costruire la "retta di taratura". Le cuvette da #7 a #10 contengono icampioni (estratto e la prima frazione di eluato (E1) dalla resina contenente l'enzima) in duplicato per ottenere una maggiore precisione della misurazione.

NB. I volumi da utilizzare per il dosaggio dell'estratto proteico potranno variare e in questo caso saranno comunicati dal docente in laboratorio.

#	BSA (0.15 mg/ml)	Campione (in μL)	H ₂ O (in μL)	Reattivo ⁶ (in μL)	Assorbanza (O.D. _{595 nm})
1	--	--	500	500	
2	20 μL (3 μg)	--	480	500	
3	30 μL (4,5 μg)	--	470	500	
4	40 μL (6 μg)	--	460	500	
5	60 μL (9 μg)	--	440	500	
6	80 μL (12 μg)	--	420	500	
7	Estratto proteico	--	--	500	
8	Estratto proteico	--	--	500	
9	Eluato 1	20	480	500	
10	Eluato 1	50	450	500	

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

Come determinare l'equazione della retta ($y = mx + c$) in [Google Fogli \(Google Sheets\)](#)

1. Inserisci i dati

- a. Inserisci i valori dei µg di BSA (x) in una colonna.
- b. Inserisci i corrispondenti valori di assorbanza a 595 nm (y) nella colonna accanto.

2. Crea il grafico

- a. Seleziona entrambe le colonne (x e y).
- b. Vai nel menu in alto e clicca su "Inserisci" > "Grafico".

3. Imposta il tipo di grafico

- a. Nella barra laterale a destra (Editor grafico), sotto la scheda "Configurazione", imposta il tipo di grafico su "Grafico a dispersione" (scatter plot).

4. Aggiungi la retta di tendenza

- a. Vai nella scheda "Personalizza" (sempre nell'Editor grafico).
- b. Espandi il menu "Serie".
- c. Scorri verso il basso e spunta la casella "Linea di tendenza".

5. Visualizza l'equazione della retta e R²

- a. Subito sotto, attiva le opzioni:
 - "Etichetta" -> Utilizza Equazione"
 - "Mostra R²"

y	Valore di assorbanza a 595nm (A _{595nm})
---	--

x	Valore dei μg di BSA utilizzati
m	Coefficiente angolare della retta, espresso come $A_{595\text{nm}} / \mu\text{g}$ di 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 $R^2 \geq 0.99$ (valori tra 0.97–0.99 possono essere comunque accettabili in contesti didattici).

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 q rappresentano, rispettivamente, la pendenza e l'intercetta della retta di taratura

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

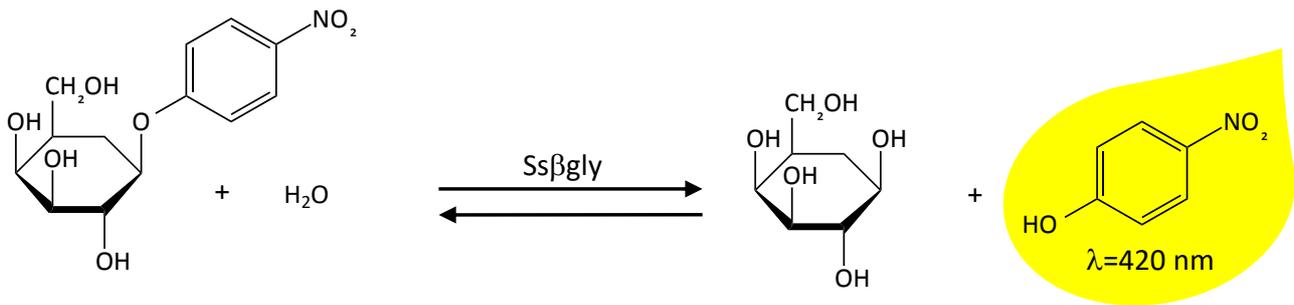
La concentrazione proteica [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] sarà determinata dividendo il valore dei μg ottenuti per il volume di campione utilizzato. La concentrazione proteica del campione sarà una media aritmetica dei valori ottenuti.

4° ESPERIENZA: Dosaggio di attività enzimatica con 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.

La reazione enzimatica catalizzata è la seguente:



Il para-nitro-fenolo, in forma libera, assume una colorazione gialla a pH neutri/alcalini che consente la rilevazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 420 nm. Il para-nitro-fenolo, possiede un coefficiente di estinzione molare noto dal cui valore è possibile ricavare la sua concentrazione in soluzione, nel nostro caso la concentrazione del composto generato in seguito all'attività enzimatica della SsβGly. Il valore è il seguente: $\epsilon_{mM} = 17.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 10.0 e a temperatura ambiente.

La relazione tra l'assorbanza misurata, il coefficiente di estinzione molare e la concentrazione del composto è data dalla **Legge di Lambert-Beer**:

$$(A = \epsilon \cdot l \cdot C)$$

Dove C è la concentrazione del composto che può essere calcolata dal valore noto della ϵ e dall'assorbanza (A) misurata. La l rappresenta la lunghezza del cammino ottico. Nel nostro caso è lo spessore delle cuvette che essendo uguale a 1 cm non incide sul calcolo da effettuare.

NOTA: per il para-nitro-fenolo il coefficiente di estinzione è dato in mM. Quindi la concentrazione calcolata sarà di mMol su ml.

- Preparare le mix come da tabella (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 spontanea, non enzimatica, del Substrato.

NB. I volumi indicati nella tabella seguente hanno carattere esemplificativo. I volumi da utilizzare per il dosaggio saranno comunicati dal docente in laboratorio.

	Tampone Fosfato 200 mM, pH 6.5	Substrato pNPGal 20 mM	Campione	H ₂ O	Assorbanza (O.D. _{420 nm})
“Bianco”	50 µL	50 µL	10 µL di PBS 1X	90µL	
“Estratto”	50 µL	50 µL	10 µL di estratto	90µL	
“Estratto”	50 µL	50 µL	10 µL di estratto	90µL	
Eluato 1	50 µL	50 µL	10 µL di enzima	90µL	
Eluato 1	50 µL	50 µL	10 µL di enzima	90µL	

- Preincubare le quattro mix a 65 °C per 2 min;
- Aggiungere il campione nelle mix Estratto ed E1 e incubare a 65°C per 2 minuti;
- Mettere le quattro mix in ghiaccio e aggiungere in ciascuna 800 µL di sodio carbonato 1M pH 10.0;
- Trasferire le mix in cuvette di plastica e di ciascuna leggere l'assorbimento a 420 nm; sottrarre l'A della mix Bianco da quello delle mix Estratto ed E1.
- Calcolare le Unità enzimatiche (U) secondo la definizione seguente:

L'Unità enzimatica (U) è 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.

5° PARTE: Calcolo dell'Attività Specifica (AS)

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 e nei campioni a diverso stato di purezza e concentrazione (Estratto ed E1)

- Inserire i valori di concentrazione proteica e Unità enzimatiche calcolati nella tabella in basso e calcolare l'Attività Specifica dei campioni.

Campione	Unità Enzimatiche (U)	mg di proteine	Attività specifica(U/mg)	Resa (%)
Estratto				
Eluizione 1				

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

¹NaCl CAS Number 7647-14-5

²Fosfato di Sodio CAS Number 10101-89-0

³Triton 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.

⁴trombina CAS Number: 9002-04-4

⁵BSA: CAS Number 9048-46-8

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

⁷SDS: CAS Number: 151-21-3

⁸Tampone di caricamento, preparato preventivamente dal docente RADRL, è così costituito:
62.5 mM Tris-HCl⁹pH 6.8. 2% SDS¹⁰, 25% glicerolo¹¹, 0.01% Blu di bromofenolo¹².

⁹Tris-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.

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

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

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

¹³ Instant Blue CASNumber 7664-38-2

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

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