

A cura di
Maria Carmela Bonaccorsi di Patti
Roberto Contestabile
Martino Luigi Di Salvo

Metodologie biochimiche

**Espressione, purificazione
e caratterizzazione delle proteine**

Seconda edizione



BIOCHIMICA **ZANICHELLI**

A cura di
Maria Carmela Bonaccorsi di Patti
Roberto Contestabile
Martino Luigi Di Salvo

Metodologie biochimiche

Espressione, purificazione
e caratterizzazione delle proteine

Seconda edizione

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca la tua chiave di attivazione stampata in verticale sul bollino argentato in questa pagina.
7. Inseriscila nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati di altri volumi ti serve solo la relativa chiave di attivazione.

INDICE GENERALE

Prefazione	XI
-------------------	----

Capitolo 1

Introduzione alle metodologie biochimiche	1
--	---

Martino Luigi Di Salvo, Roberto Contestabile

1.1 La biochimica, una scienza sperimentale	1
1.2 Come si progetta, si esegue e si interpreta un esperimento	2
1.3 Internet e la bioinformatica nella ricerca biochimica	8
1.3.1 Come effettuare una ricerca nelle banche dati	8

Capitolo 2

Lavorare in laboratorio	10
--------------------------------	----

Maria Teresa Carri

2.1 Strumentazione di base	10
2.1.1 Vetreria di laboratorio e materiale monouso	10
2.1.2 Bilance	13
2.1.3 Sistemi agitatori	14
2.1.4 Sistemi termostatati	15
2.1.5 pH-metri	17
2.1.6 Cappe	18
2.1.7 Centrifughe	20
2.2 Le sane pratiche di laboratorio	27
2.2.1 La normativa vigente	28
2.2.2 La formazione	29
2.2.3 La prevenzione	30
2.2.4 Uso di cancerogeni e mutageni	32
2.2.5 Uso di radioisotopi o di sorgenti di radiazioni ionizzanti	33
2.3 Come si prepara una soluzione	34
2.3.1 Soluzioni	34
APPROFONDIMENTO 2.1 <i>De morbis artificum diatriba</i>	35
2.3.2 Soluzioni stock e diluizioni	36
2.3.3 Controllo del pH delle soluzioni	36
APPROFONDIMENTO 2.2 I tamponi del signor Good	40
APPROFONDIMENTO 2.3 Ancora soluzioni!	41

Capitolo 3

Produzione di proteine ricombinanti: clonaggio e mutagenesi

Francesco Giansanti, Giuseppina Pitari, Maria Carmela Bonaccorsi di Patti, Rodolfo Ippoliti

51

3.1	Gli strumenti molecolari	52
3.1.1	Gli enzimi di restrizione	52
3.1.2	Le DNA ligasi	54
3.1.3	La fosfatasi alcalina	55
3.1.4	Le chinasi	55
3.1.5	Le trasferasi terminali	55
3.2	I vettori di clonaggio	56
3.3	La PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	59
3.4	Gli organismi ospiti per il clonaggio	60
3.5	Strategie di clonaggio di sequenze codificanti	62
3.5.1	Clonaggio di sequenza nota	62
3.5.2	Clonaggio di sequenza ignota	66
3.6	Mutagenesi di sequenze codificanti	68
3.6.1	Mutagenesi sito-specifica	68
3.6.2	Mutagenesi casuale	73
	APPROFONDIMENTO 3.1 Un esempio di esperimento di mutagenesi sito-specifica: la storia della famiglia delle GFP	75

Capitolo 4

Produzione di proteine ricombinanti: sistemi di espressione

Francesco Giansanti, Giuseppina Pitari, Maria Carmela Bonaccorsi di Patti, Rodolfo Ippoliti

78

4.1	Batteri	80
4.1.1	Vantaggi e svantaggi dell'uso di batteri come sistema di espressione	80
4.1.2	I vettori di espressione utilizzabili con ospiti batterici	81
4.1.3	I promotori	82
4.2	Lieviti	83
4.2.1	Vantaggi e svantaggi dell'uso di lieviti come sistema di espressione	83
4.2.2	I vettori di espressione utilizzabili nei lieviti	84
4.3	Cellule di mammifero	86
4.3.1	Espressione inducibile in cellule di mammifero: il sistema regolato dalla tetraciclina (TetOn)	87
4.4	Cellule d'insetto	88
4.5	Proteine di fusione	90
4.5.1	Proprietà dei <i>tag</i>	91
	APPROFONDIMENTO 4.1 Indirizzi molecolari: <i>quo vadis</i> proteina?	94

Capitolo 5**Metodologie per la purificazione delle proteine:
tecniche di separazione** 96*Roberto Contestabile, Martino Luigi Di Salvo, Margherita Eufemi*

5.1 Estrazione delle proteine dalla fonte biologica	97
5.1.1 Rottura delle cellule e omogeneizzazione dei tessuti	98
5.1.2 Separazione di organelli o componenti subcellulari	101
5.2 Metodi di frazionamento di miscele proteiche	102
5.2.1 Tecniche di centrifugazione	102
5.2.2 Metodi di precipitazione delle proteine	106
5.3 Cromatografia	109
5.3.1 Cromatografia a esclusione molecolare o gel-filtrazione	113
5.3.2 Cromatografia a scambio ionico	118
5.3.3 Cromatografia di affinità	122
5.3.4 Cromatografia di ripartizione	126
5.3.5 Cromatografia di adsorbimento	127
5.3.6 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)	129
APPROFONDIMENTO 5.1 La separazione magnetica (Dynabeads®)	132

Capitolo 6**Metodologie per la purificazione delle proteine:
tecniche di analisi** 134*Maria Teresa Carri*

6.1 Elettroforesi	134
6.1.1 Elettroforesi di proteine	138
6.1.2 Elettroforesi di acidi nucleici	148
6.2 Dosaggi quantitativi	151
6.2.1 Metodi spettrofotometrici	151
6.2.2 Metodi radioisotopici	155
6.3 Tecniche immunochimiche	158
6.3.1 Anticorpi	158
6.3.2 Western blot	160
6.3.3 ELISA e RIA	163
6.3.4 Immunoprecipitazione	165
APPROFONDIMENTO 6.1 Orientarsi nel mondo delle macromolecole: le metodologie dei punti cardinali	166
APPROFONDIMENTO 6.2 La citofluorimetria a flusso	167

Capitolo 7

Esempi di purificazione di proteine

169

Maria Carmela Bonaccorsi di Patti

- | | | |
|------------|--|-----|
| 7.1 | Purificazione della DNA polimerasi di <i>Thermus aquaticus</i> | 172 |
| 7.1.1 | Purificazione da <i>Thermus aquaticus</i> | 173 |
| 7.1.2 | Purificazione da <i>E. coli</i> | 175 |
| 7.1.3 | Purificazione con His-tag da <i>E. coli</i> | 176 |
| 7.2 | Purificazione di una proteina di membrana, il trasportatore della serotonina (SERT) | 177 |
| 7.2.1 | Detergenti: proprietà e utilizzo | 178 |
| 7.2.2 | Purificazione da cervello umano | 180 |
| 7.2.3 | Purificazione da cellule di mammifero HEK293-TetOn | 182 |

Capitolo 8

Metodi spettroscopici per lo studio delle proteine

184

Fabio Altieri, Maria Carmela Bonaccorsi di Patti

- | | | |
|------------|--|-----|
| 8.1 | Spettroscopia di assorbimento UV-VIS | 188 |
| 8.1.1 | La legge di Lambert e Beer | 188 |
| 8.1.2 | Strumentazione | 189 |
| 8.1.3 | Cromofori delle proteine | 194 |
| 8.1.4 | Applicazioni | 197 |
| 8.2 | Spettroscopia di fluorescenza | 199 |
| 8.2.1 | Principi teorici | 199 |
| 8.2.2 | Aspetti quantitativi | 201 |
| 8.2.3 | Strumentazione | 202 |
| 8.2.4 | Fluorofori | 204 |
| 8.2.5 | Applicazioni | 208 |
| 8.3 | Spettroscopia a luce polarizzata | 213 |
| 8.3.1 | Principi teorici | 214 |
| 8.3.2 | Dicroismo circolare | 215 |
| 8.3.3 | Applicazioni del dicroismo circolare | 217 |
| | APPROFONDIMENTO 8.1 Proteine fluorescenti: una tavolozza di colori a disposizione dei ricercatori | 222 |
| | APPROFONDIMENTO 8.2 La Real-Time PCR | 224 |

Capitolo 9**La spettrometria di massa per lo studio delle proteine** 226*Alessandra Giorgi*

- 9.1 I principi della spettrometria di massa (MS)** 226
 - 9.1.1 Tecniche di ionizzazione 228
 - 9.1.2 Gli analizzatori 232
- 9.2 La spettrometria di massa nello studio delle proteine** 237
 - 9.2.1 La spettrometria di massa tandem e la determinazione delle sequenze polipeptidiche 237
 - 9.2.2 La spettrometria di massa e la proteomica 240
 - APPROFONDIMENTO 9.1** Il sequenziamento delle catene polipeptidiche: la degradazione di Edman 241
 - APPROFONDIMENTO 9.2** Le proteasi nella proteomica 245

Capitolo 10**La cinetica enzimatica nello studio dei meccanismi di reazione** 248*Giovanni Antonini*

- 10.1 Come funziona un enzima** 248
 - 10.1.1 L'enzima, i cofattori e la catalisi enzimatica 248
 - 10.1.2 L'energia di attivazione e la teoria dello stato di transizione 249
 - 10.1.3 Classificazione degli enzimi 250
- 10.2 Cinetica enzimatica in stato stazionario** 250
 - 10.2.1 La cinetica in stato stazionario e l'equazione di Michaelis-Menten 250
 - 10.2.2 Il significato della K_m , di V_{max} , di k_{cat} e del rapporto k_{cat}/K_m 252
- 10.3 Come fare un esperimento di cinetica in stato stazionario, come calcolare e come presentare il risultato** 253
 - 10.3.1 La velocità iniziale e i limiti strumentali 253
 - 10.3.2 Il grafico di Lineweaver-Burk 258
 - 10.3.3 I metodi lineari e la minimizzazione non lineare a confronto 259
 - 10.3.4 Cinetiche enzimatiche con più di un substrato 260
- 10.4 L'inibizione enzimatica** 262
 - 10.4.1 L'inibizione enzimatica: competitiva, non competitiva, incompetitiva e mista 263
 - 10.4.2 La regolazione allosterica e l'attivazione enzimatica 272
 - APPROFONDIMENTO 10.1** L'utilizzo industriale degli enzimi 274
 - APPROFONDIMENTO 10.2** Un esempio dell'uso della cinetica enzimatica per dosare enzimi o substrati: i biosensori 275
 - APPROFONDIMENTO 10.3** L'importanza farmacologica degli inibitori enzimatici 276

Capitolo 11

Metodi biochimici nell'analisi delle interazioni molecolari	278
<i>Roberto Contestabile, Martino Luigi Di Salvo</i>	
11.1 Gli equilibri di legame: la chiave d'interpretazione dei processi vitali	278
11.2 Analisi teorica degli equilibri di legame: equazioni e grafici	279
11.2.1 Il legame a un unico sito	279
11.2.2 Il legame a siti multipli	285
11.2.3 La competizione di legame	292
11.2.4 Il legame non specifico	294
11.2.5 La cinetica di legame	295
11.3 Analisi sperimentale degli equilibri di legame	296
11.3.1 Metodi spettroscopici	296
11.3.2 Metodi basati sulla separazione molecolare	298
11.3.3 Risonanza plasmonica di superficie	301
11.4 Metodi per l'analisi delle interazioni proteina-proteina	302
APPROFONDIMENTO 11.1 Un equilibrio di legame vitale come l'aria che respiriamo	309
 Referenze iconografiche	 312
Indice analitico	313

PREFAZIONE

Le metodologie biochimiche, cioè le tecniche di isolamento e analisi delle molecole biologiche, sono molto numerose e spesso complesse. Una loro trattazione completa richiederebbe la realizzazione di un testo molto vasto, difficile da scrivere e anche da studiare. Esistono diverse opere complete e valide sulle metodologie biochimiche. Queste sono principalmente rivolte ai ricercatori o agli studenti di lauree magistrali o di dottorato, che sono già inseriti in un laboratorio di ricerca e che quindi hanno già una certa esperienza.

L'idea di scrivere un nuovo testo di metodologie biochimiche è nata qualche anno fa dalla necessità di fornire agli studenti delle lauree triennali, particolarmente di Scienze biologiche e di Biotecnologie, un testo adatto alle loro esigenze, confezionato "su misura", che secondo noi mancava nel panorama editoriale. Questo libro tratta le principali metodologie biochimiche di base, in modo semplice ma rigoroso, per consentire allo studente di comprendere quali siano gli strumenti a nostra disposizione per affrontare i primi passi nello studio delle macromolecole biologiche e delle proteine in particolare.

Negli ultimi anni l'approccio allo studio della struttura e della funzione delle proteine è molto cambiato. Mentre i principi fondamentali delle metodologie biochimiche non sono molto diversi rispetto a venti o trent'anni fa, la tecnologia del DNA ricombinante ha rivoluzionato lo studio delle proteine ed è diventata uno strumento indispensabile per i moderni biochimici. Per questo motivo, abbiamo voluto dare al libro un'impostazione diversa rispetto a quella classica che prende in esame le metodologie biochimiche in base alla loro categoria (tecniche cromatografiche, elettroforetiche, spettroscopiche ecc.); tale impostazione può risultare noiosa per gli studenti delle lauree triennali, che hanno difficoltà a integrare le nozioni imparare in questo schema teorico con la logica degli esperimenti realmente condotti in laboratorio. Abbiamo quindi cercato di organizzare la trattazione presentando le metodologie biochimiche secondo il filo logico che si segue in un laboratorio di ricerca, focalizzandoci principalmente sulle strategie e sulle tecniche di espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine. I primi due capitoli introducono alla filosofia dell'esperimento scientifico e presentano il laboratorio, il luogo in cui i futuri ricercatori passeranno molte ore delle loro giornate. Si passa poi al lavoro vero e proprio, iniziando dai metodi di espressione delle proteine ricombinanti, proseguendo con le tecniche di purificazione e terminando con alcune metodologie di base per la caratterizzazione delle proteine (che comprendono le tecniche spettroscopiche e le tecniche di analisi dell'attività enzimatica e delle interazioni molecolari). Ci è sembrato inoltre utile inserire un breve capitolo con esempi reali di purificazione di proteine diverse, per mostrare come siano cambiati nel tempo i protocolli di purificazione. Rispetto alla precedente edizione, il capitolo che riguarda le "Metodologie per la produzione delle proteine ricombinanti" è stato ampliato e suddiviso in due capitoli: "Clonaggio e mutagenesi" (Cap. 3) e "Sistemi di espressione" (Cap. 4). Inoltre, seguendo i consigli dei docenti che hanno letto e adottato il libro, è stato aggiunto un capitolo dedicato alla "Spettrometria di massa per lo studio delle proteine" (Cap. 9).

Speriamo che anche questa nuova edizione possa essere utile sia agli studenti, stimolando la loro curiosità per una materia così affascinante come la biochimica moderna, sia ai docenti che la biochimica la devono insegnare.

Desideriamo infine ringraziare nuovamente tutti gli autori, vecchi e nuovi, che hanno collaborato alla stesura dei vari capitoli, e la casa editrice Zanichelli, che ci ha dato la possibilità di portare avanti questo nuovo progetto. Come già per la prima edizione, i curatori ringraziano tutti gli studenti sui quali in questi anni si sono “fatti le ossa” per imparare a diventare, si spera, dei buoni insegnanti.

I curatori

Questa seconda edizione è dedicata alla professoressa Maria Teresa Carri, già Ordinario di Biochimica presso l'Università di Roma «Tor Vergata», che è stata tra i promotori iniziali di questo progetto editoriale e autrice di due capitoli della prima edizione, prematuramente scomparsa durante la stesura di questo libro. Il suo rigore scientifico e la sua ironia ci mancheranno.

Produzione di proteine ricombinanti: clonaggio e mutagenesi

Sommario

- 3.1 Gli strumenti molecolari
- 3.2 I vettori di clonaggio
- 3.3 La PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
- 3.4 Gli organismi ospiti per il clonaggio
- 3.5 Strategie di clonaggio di sequenze codificanti
- 3.6 Mutagenesi di sequenze codificanti

Una **proteina ricombinante** è una proteina che si ottiene attraverso un organismo ospite (generalmente un batterio, un lievito o una cellula di insetto/mammifero), in grado di trascrivere e poi tradurre in polipeptide una sequenza di DNA ricombinante. Nella maggior parte dei casi, il DNA ricombinante è un DNA eterologo, cioè che deriva da un altro organismo, ma è possibile anche che il DNA derivi dallo stesso organismo ospite.

Il primo requisito per ottenere una proteina ricombinante consiste nell'aver a disposizione il DNA che codifica per la proteina. Questo DNA viene quindi inserito in un vettore di espressione che contiene tutti gli elementi necessari per la trascrizione e la traduzione del DNA di interesse e per il suo mantenimento nell'ospite. Infine, il vettore contenente il DNA ricombinante viene inserito nell'organismo ospite che produrrà la proteina. Tutto questo è possibile perché il codice genetico è universale e i meccanismi della sintesi proteica sono conservati (una sequenza codificante di DNA umano può essere correttamente trascritta e tradotta in proteina in un batterio o in un lievito).

Le proteine ricombinanti sono utilizzate in campi che vanno dalla ricerca di base ad applicazioni industriali e mediche. Ognuna di queste applicazioni ha dei requisiti per la produzione di proteine ricombinanti che diventano sempre più complessi e costosi, fino ad arrivare alle proteine per uso terapeutico, la cui produzione segue delle legislazioni a tutela del paziente molto restrittive (riguardanti, per esempio, l'assenza di contaminanti tossici, la sterilità, l'omogeneità).

Le proteine possono andare incontro a diverse modificazioni post-traduzionali necessarie per la biosintesi, la struttura e il funzionamento della proteina stessa. Queste modificazioni possono essere o meno riprodotte durante la maturazione della proteina ricombinante, se l'organismo ospite possiede il macchinario biochimico in grado di effettuarle in modo corretto. Per esempio, le reazioni di *N*-glicosilazione e *O*-glicosilazione tipiche di molte proteine eucariotiche destinate alla secrezione possono essere riprodotte in maniera fedele all'originale da cellule di insetto o di mammifero, mentre i lieviti possiedono un corredo enzimatico che introduce catene oligosaccaridiche di diversa composizione e i batteri non sono in grado di effettuare questa modificazione.

A seconda del tipo di modificazione post-traduzionale e dello scopo per cui la proteina ricombinante viene prodotta è necessario fare delle scelte sui sistemi e sulle modalità di espressione più adatti, come descritto in questo capitolo e nel successivo.

Le proteine ricombinanti possono essere del tutto equivalenti alle corrispondenti proteine naturali (*wild type*) oppure essere delle varianti (**mutanti**) nelle quali vengono inseriti cambiamenti nella sequenza amminoacidica. La sequenza nucleotidica, infatti, può essere modificata in modo più o meno mirato attraverso le **tecniche di mutagenesi** generando cambiamenti nella corrispondente sequenza amminoacidica: ciò consente sia di studiare la funzione e la struttura della proteina sia di alterarne le proprietà.

Spesso per facilitare l'espressione e la purificazione delle proteine ricombinanti si costruiscono **proteine di fusione**, unendo le sequenze geniche d'interesse con sequenze che aggiungono alle estremità della proteina ricombinante i cosiddetti *tag* (etichette), ossia piccoli tratti di catena polipeptidica o intere proteine. Queste "etichette" possono rendere molto più agevole la purificazione della proteina ricombinante. In alcuni casi una proteina di fusione si ottiene unendo le sequenze codificanti di due o più segmenti genici, con lo scopo di ottenere un ibrido che sfrutti una o più caratteristiche delle proteine originali.

In questo capitolo e nel successivo verranno descritti gli aspetti salienti delle varie fasi sperimentali necessarie a ottenere una proteina ricombinante e a modificarne la sequenza codificante.

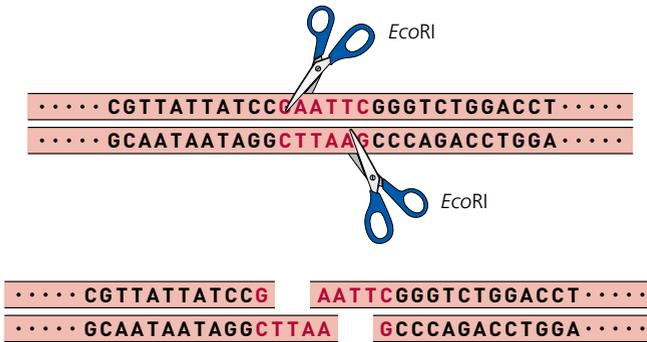
3.1 Gli strumenti molecolari

Al fine di eseguire un clonaggio genico per ottenere la sequenza codificante della proteina di nostro interesse, nei laboratori di biologia molecolare e biochimica si utilizzano degli strumenti molecolari che comprendono gli enzimi di restrizione, le ligasi, le fosfatasi, le chinasi, le trasferasi terminali e i vettori di clonaggio. Di seguito alcuni cenni sulle funzioni di questi strumenti e sulla tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*), che è largamente la tecnica più utilizzata per il clonaggio genico.

3.1.1 Gli enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi specifiche che tagliano la molecola del DNA in frammenti. Sono idrolasi che scindono il legame fosfodiesterico tra due nucleotidi del DNA a doppio filamento. Gli enzimi di restrizione sono naturalmente prodotti dalle cellule batteriche e il ruolo biologico di questi enzimi è di protezione della cellula procariotica, in quanto sono essenziali per il taglio e la degradazione di filamenti estranei al genoma; quest'ultimo viene protetto dall'auto-idrolisi con la metilazione di alcune basi azotate catalizzata da una specifica DNA metilasi.

Gli enzimi di restrizione sono altamente specifici e riconoscono sequenze nucleotidiche più o meno lunghe sulla molecola di DNA che tagliano specificamente in siti detti "di restrizione".

**Figura 3.1**

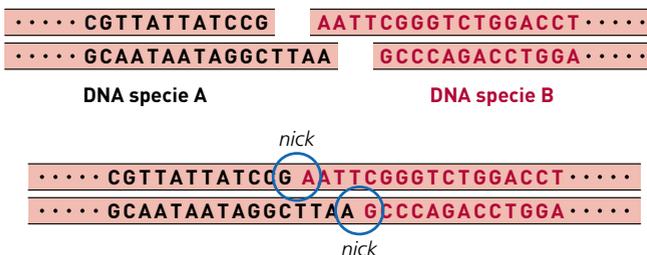
Frammenti di DNA prodotti dal taglio dell'enzima di restrizione *EcoRI*.

Queste sequenze di riconoscimento sono composte, nella maggior parte dei casi, da 4-6 coppie di basi e sono palindrome. Le endonucleasi di restrizione si dividono in tre classi:

- **endonucleasi di tipo I:** digeriscono il DNA in punti casuali lontani spesso anche migliaia di coppie di basi (bp) dal sito di restrizione. Sono composte di tre subunità (HsdR, HsdM e HsdS), ciascuna con differente funzione: endonucleasica, metilasica e metiltrasferasica. Richiedono per l'attività *S*-adenosil metionina, ATP e Mg^{2+} ;
- **endonucleasi di tipo II:** non richiedono ATP per la catalisi e tagliano all'interno del sito di restrizione. Sono omodimeri e richiedono Mg^{2+} per l'attività catalitica;
- **endonucleasi di tipo III:** tagliano il DNA a circa 25 bp dal sito di restrizione e utilizzano ATP nella catalisi. Contengono più di una subunità e hanno la doppia funzione di taglio e metilasica. Richiedono per l'attività *S*-adenosil metionina, ATP e Mg^{2+} .

Gli enzimi di restrizione più comunemente utilizzati appartengono al tipo II. Un'importante caratteristica delle endonucleasi di tipo II è che alcune possono tagliare il doppio filamento di DNA in modo sfalsato, producendo "estremità coesive", altre tagliano il DNA lasciando basi appaiate alle due estremità e producendo "estremità non coesive". Un esempio di taglio sfalsato è quello prodotto dall'enzima di restrizione *EcoRI* isolato da *Escherichia coli*. La sequenza GAATTC viene riconosciuta e tagliata dall'enzima in forma dimerica secondo lo schema riportato in **Figura 3.1**.

Il taglio sfalsato produce due estremità definite "appiccicose" o "coesive", che hanno la possibilità di riappaiarsi ricostituendo il sito originale, sia saldando i due frammenti originali sia, eventualmente, saldando due frammenti provenienti dalla digestione di DNA differenti (**Fig. 3.2**).

**Figura 3.2**

Appaiamento di frammenti di DNA prodotti da *EcoRI*.

Durante il clonaggio di un gene o di un frammento si può quindi tagliare il DNA con un dato enzima di restrizione e poi inserirlo, per esempio, in un plasmide (una forma di DNA circolare descritta più avanti) che sia stato tagliato con lo stesso enzima di restrizione. I siti sfalsati si appaieranno e i tagli ancora presenti (*nick*) potranno essere saldati con un enzima chiamato DNA ligasi.

Le estremità non coesive possono comunque essere riunite, anche se il processo risulta più difficoltoso che nel caso di estremità coesive.

La **Tabella 3.1** riporta le specificità di riconoscimento e di taglio di alcuni tra i più comuni enzimi di restrizione e la loro capacità di produrre estremità coesive o piatte.

3.1.2 Le DNA ligasi

Le DNA ligasi sono enzimi fondamentali per il clonaggio del DNA, in quanto consentono di saldare le estremità 5'-P e 3'-OH di frammenti di DNA digeriti con enzimi di restrizione che producono estremità coesive compatibili oppure estremità non coesive. Le DNA ligasi sono enzimi che spesso richiedono l'utilizzo di ATP e hanno un ruolo fondamentale nella replicazione del DNA (saldano i frammenti di Okazaki), nella riparazione dei danni subiti dal DNA e nella ricombinazione.

La reazione di ligazione durante un clonaggio spesso prevede l'uso di una ligasi di origine fagica, prodotta dal fago T4. La reazione di ligazione prevede il mescolamento (in un volume di 10-20 µL) dei frammenti di DNA (inserto e vettore digeriti con enzimi di restrizione) in opportuni rapporto (generalmente l'inserto è in eccesso rispetto al vettore) e concentrazione (general-

Tabella 3.1
Caratteristiche di alcuni enzimi di restrizione.

Enzima di restrizione	Fonte	Sequenza di riconoscimento e sito di restrizione	Prodotto					
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	$\begin{array}{c} 5'-A-G-C-T-3' \\ \downarrow \\ 3'-T-C-G-A-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>A-G</td> <td>C-T</td> <td rowspan="2">estremità piatte</td> </tr> <tr> <td>T-C</td> <td>G-A</td> </tr> </table>	A-G	C-T	estremità piatte	T-C	G-A
A-G	C-T	estremità piatte						
T-C	G-A							
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	$\begin{array}{c} 5'-G-G-A-T-C-C-3' \\ \downarrow \\ 3'-C-C-T-A-G-G-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>G</td> <td>G-A-T-C-C</td> <td rowspan="2">estremità coesive</td> </tr> <tr> <td>C-C-T-A-G</td> <td>G</td> </tr> </table>	G	G-A-T-C-C	estremità coesive	C-C-T-A-G	G
G	G-A-T-C-C	estremità coesive						
C-C-T-A-G	G							
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	$\begin{array}{c} 5'-G-A-A-T-T-C-3' \\ \downarrow \\ 3'-C-T-T-A-A-G-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>G</td> <td>A-A-T-T-C</td> <td rowspan="2">estremità coesive</td> </tr> <tr> <td>C-T-T-A-A</td> <td>G</td> </tr> </table>	G	A-A-T-T-C	estremità coesive	C-T-T-A-A	G
G	A-A-T-T-C	estremità coesive						
C-T-T-A-A	G							
<i>HaellI</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} 5'-G-G-C-C-3' \\ \downarrow \\ 3'-C-C-G-G-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>G-G</td> <td>C-C</td> <td rowspan="2">estremità piatte</td> </tr> <tr> <td>C-C</td> <td>G-G</td> </tr> </table>	G-G	C-C	estremità piatte	C-C	G-G
G-G	C-C	estremità piatte						
C-C	G-G							
<i>HindIII</i> (primo enzima scoperto)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	$\begin{array}{c} 5'-A-A-G-C-T-T-3' \\ \downarrow \\ 3'-T-T-C-G-A-A-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>A</td> <td>A-G-C-T-T</td> <td rowspan="2">estremità coesive</td> </tr> <tr> <td>T-T-C-G-A</td> <td>A</td> </tr> </table>	A	A-G-C-T-T	estremità coesive	T-T-C-G-A	A
A	A-G-C-T-T	estremità coesive						
T-T-C-G-A	A							
<i>HindII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	$\begin{array}{c} 5'-G-T-C-G-A-C-3' \\ \downarrow \\ 3'-C-A-G-C-T-G-5' \end{array}$	<table border="1"> <tr> <td>G-T-C</td> <td>G-A-C</td> <td rowspan="2">estremità piatte</td> </tr> <tr> <td>C-A-G</td> <td>C-T-G</td> </tr> </table>	G-T-C	G-A-C	estremità piatte	C-A-G	C-T-G
G-T-C	G-A-C	estremità piatte						
C-A-G	C-T-G							

mente 10-20 ng/ μ L di DNA totale) e l'aggiunta della ligasi T₄ a temperature inferiori ai 25 °C (di solito 16 °C per tutta la notte) per permettere l'appaiamento delle corte sequenze a filamento singolo dei frammenti digeriti.

3.1.3 La fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina è un enzima in grado di rimuovere i gruppi fosfato al 5' di DNA digerito con un enzima di restrizione. Se si digerisce un plasmide con un solo enzima (soprattutto se si producono estremità coesive) i due estremi potrebbero riappaiarsi e favorire la ricircularizzazione del plasmide stesso. In questi casi è possibile defosforilare il plasmide usando la fosfatasi alcalina, in modo tale da favorire l'appaiamento di un inserto (che avrà il 5' fosforilato) e che, in seguito a ligazione, produrrà un plasmide con un *nick* su entrambi i lati. Dopo la trasformazione di un opportuno ceppo batterico, il sistema di riparazione dei danni al DNA ricostituirà un plasmide integro (Fig. 3.3).

3.1.4 Le chinasi

Le chinasi svolgono una funzione opposta a quella delle fosfatasi, cioè sono in grado di aggiungere gruppi fosfato a catene polinucleotidiche che abbiano un'estremità 5'-OH libera. La polinucleotide chinasi del fago T₄ è tra quelle più utilizzate, ed è in grado di aggiungere un gruppo fosfato prelevato dall'ATP all'estremità 5'-OH di un oligonucleotide. Può essere utilizzata per marcare gli acidi nucleici oppure per fosforilare prodotti di PCR da utilizzare per il clonaggio.

3.1.5 Le trasferasi terminali

Sono enzimi in grado di aggiungere nucleotidi all'estremità 3' di un oligo pre-esistente utilizzando nucleotidi trifosfati come substrato e aggiungendoli in maniera casuale senza utilizzare

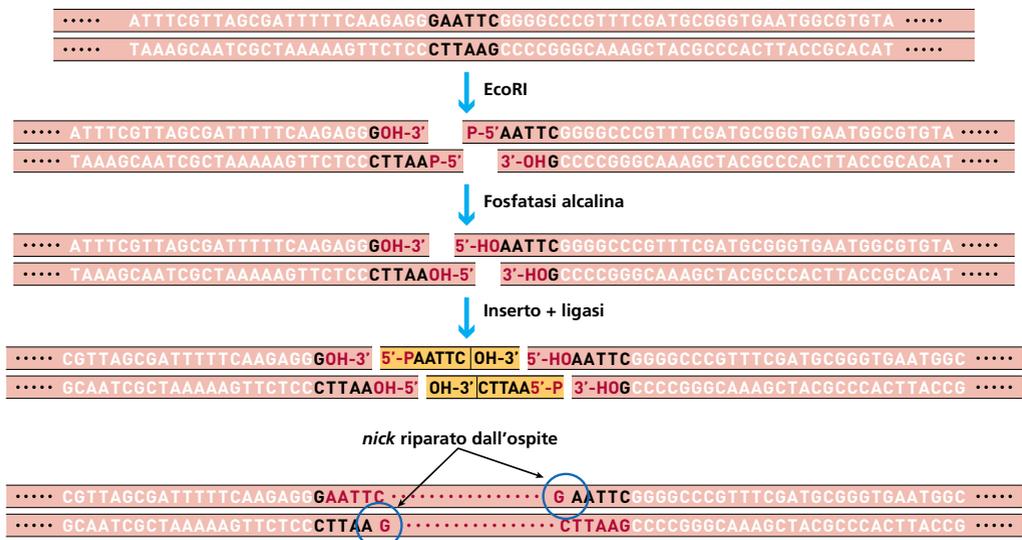


Figura 3.3

Schema della restrizione con *EcoRI* e defosforilazione con fosfatasi alcalina di un plasmide con successiva ligazione di un inserto.

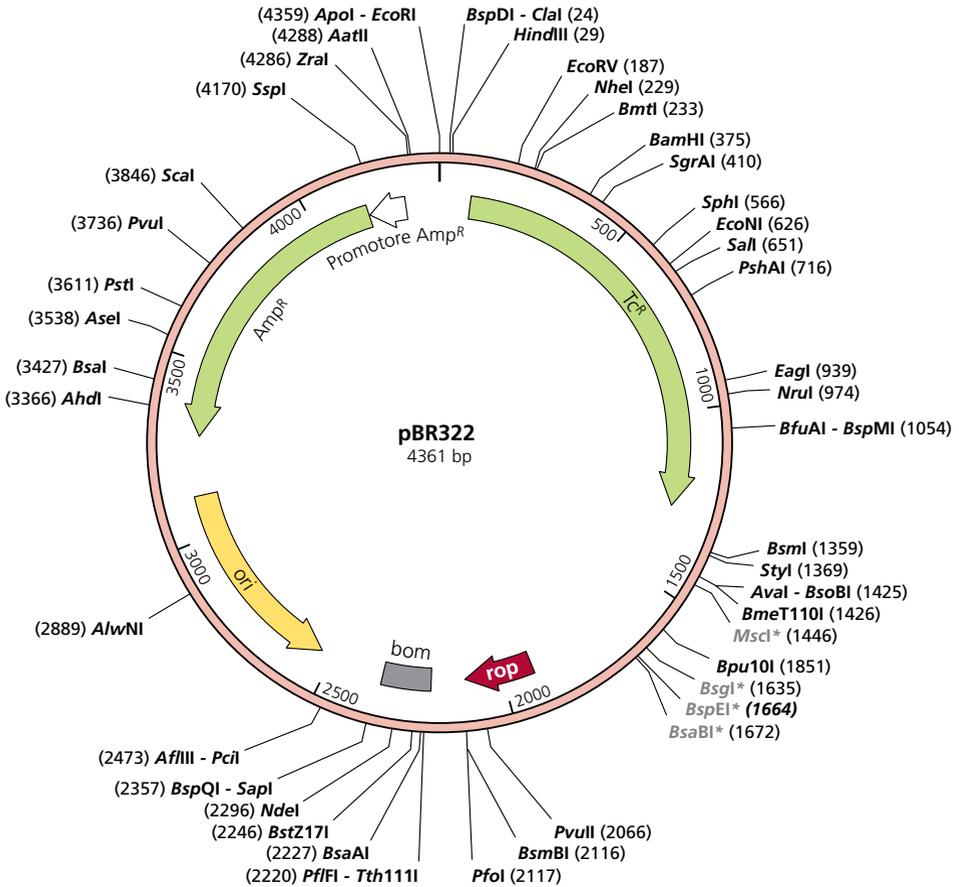


Figura 3.5

Mapa del plasmide pBR322. La figura è stata prodotta con il programma SnapGene Viewer.

il controllo del promotore *lac*. Per lo screening blu/bianco si utilizza un ceppo ospite di *E. coli* nel quale il gene *lacZ* manca del frammento α e produce una β -galattosidasi inattiva. Se la cellula batterica viene trasformata con il plasmide pUC in presenza di un induttore artificiale come l'IPTG (isopropil-tio-galattopiranoside, un analogo del galattosio), e di un substrato cromogeno della β -galattosidasi, come l'X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galattoside), il frammento α della β -galattosidasi codificato sul vettore viene espresso e complementa il ceppo ospite, formando una β -galattosidasi attiva che scinde l'X-gal dando origine a un prodotto di colore blu. Se, invece, nel plasmide è stato inserito del DNA estraneo, non verrà più prodotto il frammento α e le cellule non conterranno una β -galattosidasi attiva e, dunque, non si coloreranno (Fig. 3.7).

I plasmidi possono essere lineari o integrati nel cromosoma batterico ma, nella maggior parte dei casi, sono molecole di DNA circolari (episomi). Tra i plasmidi utilizzati per il clonaggio genico vanno scelti preferenzialmente quelli che si replicano in modo rilassato piuttosto che rigido, ovvero la cui replicazione avviene anche in assenza del trascritto.

I plasmidi si presentano come molecole circolari superavvolte, che durante le manipolazioni sperimentali possono rilassarsi o linearizzarsi in seguito a rotture a singolo o a doppio filamento

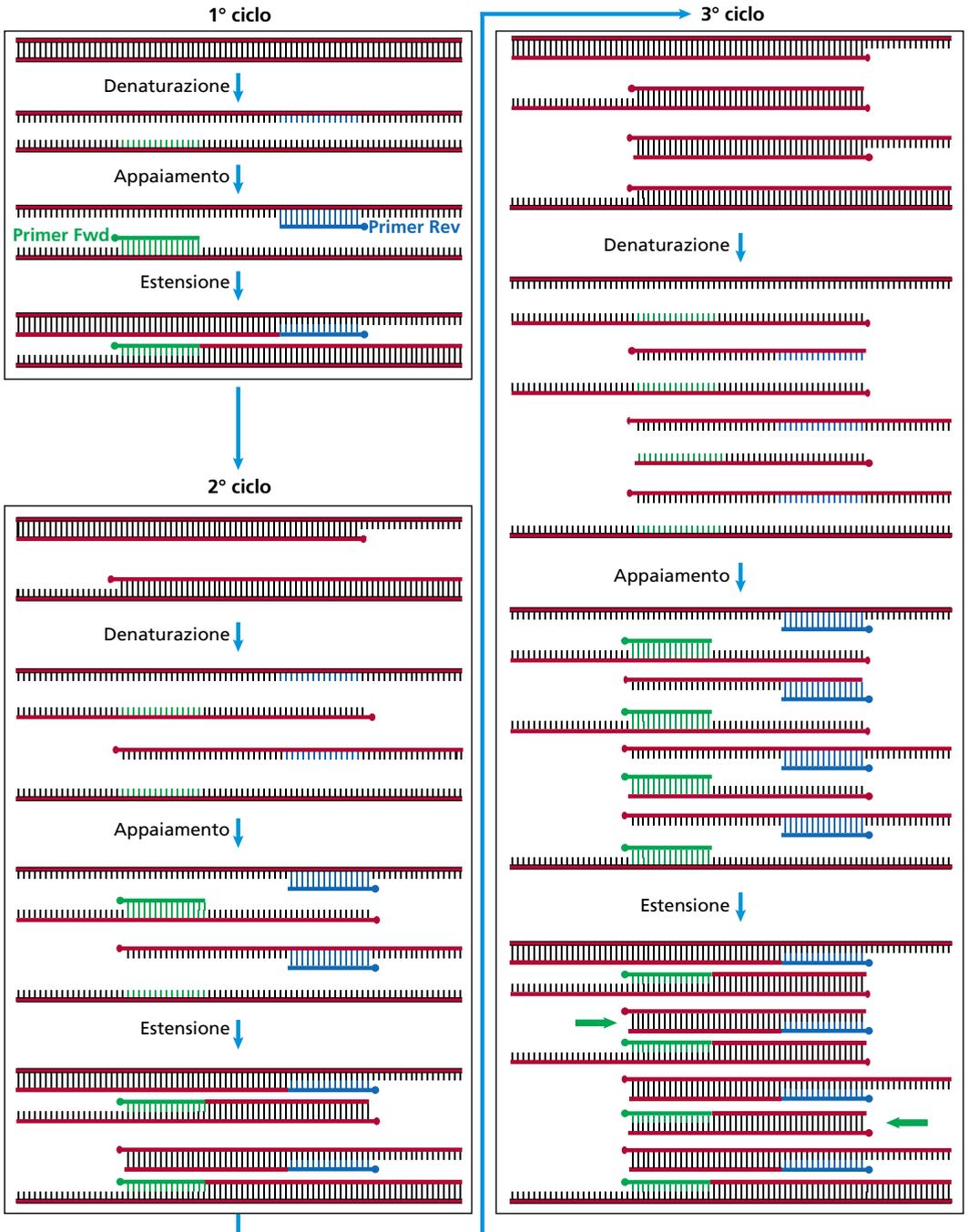


Figura 3.8
Schema della PCR. Le sequenze target sono indicate dalle frecce verdi.

Approfondimento 3.1

Un esempio di esperimento di mutagenesi sito-specifica: la storia della famiglia delle GFP

Vediamo adesso un esempio pratico di progettazione di oligonucleotidi per effettuare una mutagenesi sito-specifica con la procedura QuikChange®. La **mutagenesi sito-specifica** viene utilizzata spesso per introdurre mutazioni della sequenza amminoacidica che mirano a migliorare o modificare la struttura e la funzione di una determinata proteina. Tra la miriade di proteine che sono state oggetto di mutagenesi, la **Green Fluorescent Protein (GFP)** della medusa *Aequorea victoria* costituisce un ottimo esempio di come sia possibile modificare le proprietà di una proteina. La GFP viene frequentemente utilizzata come *reporter* fluorescente (vedi Par. 4.5.1) per rilevare l'espressione di geni di interesse in organismi sia procariotici sia eucariotici (unicellulari e organismi pluricellulari *in toto*). Questa proteina ha una struttura tridimensionale pressoché cilindrica che racchiude al centro un cromoforo formato da tre amminoacidi consecutivi (serina 65, tirosina 66 e glicina 67), i quali reagiscono chimicamente tra loro in presenza di ossigeno per formare il cromoforo (Fig. 3.16). Questi tre amminoacidi sono essenziali per l'emissione e la qualità della fluorescenza della proteina. Gli studi sulla GFP hanno permesso a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien di ottenere il premio Nobel per la Chimica nel 2008.

Sostituzioni dei tre residui amminoacidici, o di residui vicini a essi, modificano le proprietà di fluorescenza della GFP. I primi esperimenti furono condotti nel 1994 con tecniche di mutagenesi casuale (*error-prone* PCR effettuata in presenza di Mn^{2+} 0,1 mM e concentrazioni sbilanciate di dNTP). Lo screening era condotto illuminando con luce di opportuna lunghezza d'onda le colonie batteriche sulla piastra e osservando direttamente la fluorescenza emessa. Vennero identificate diverse varianti tra le quali una in cui la mutazione della serina in posizione 65 in treonina (S65T) generava una GFP più brillante (**EGFP**), e un'altra in cui la mutazione della tirosina in posizione 66 in istidina (Y66H) generava la **Blue Fluorescent Protein (BFP)**. Il fatto che la mutazione della tirosina modificasse la lunghezza d'onda di emissione della fluorescenza spinse i ricercatori a provare a sostituire la tirosina con altri amminoacidi per vedere se si ottenevano altre varianti utili.

Vediamo come si può progettare un esperimento di questo tipo: volendo cambiare la tirosina 66 della EGFP in triptofano (Y66W), si dovrà cambiare il codone codificante per la tirosina (TAC) in quello codificante per il triptofano (TGG) e per farlo è necessario cambiare due basi. Dapprima si analizza la sequenza a monte e a valle di quella codificante per l'amminoacido da mutare. Poi, sulla base di questa sequenza, si progettano due oligonucleotidi complementari contenenti la mutazione TAC → TGG, ma nel contempo sufficientemente lunghi da permettere comunque l'appaiamento (seppur imperfetto) con il DNA bersaglio *wild type* durante la PCR.

Progettazione degli oligonucleotidi

Nelle tabelle che seguono è mostrata una breve regione della sequenza della EGFP a monte e a valle della tirosina 66 e in grigio è evidenziata la zona scelta per disegnare gli oligonucleotidi *forward* e *reverse* recanti la mutazione. Gli oligonucleotidi sono lunghi 27 basi con almeno 12 basi di appaiamento a monte e a valle della mutazione, il contenuto in GC è il 66% (18/27) e terminano con un G o una C che garantiscono un buon appaiamento con il DNA stampo.

La temperatura di fusione dovrebbe essere più alta possibile per ottenere il massimo della specificità di legame. Per esempio, per questa coppia di oligonucleotidi la T_m calcolata con l'Equazione 3.1 è di circa 83 °C. Nella PCR la temperatura di appaiamento viene impostata al di sotto della T_m teorica, per tener conto dei *mismatch* derivanti dalla mutazione inserita.

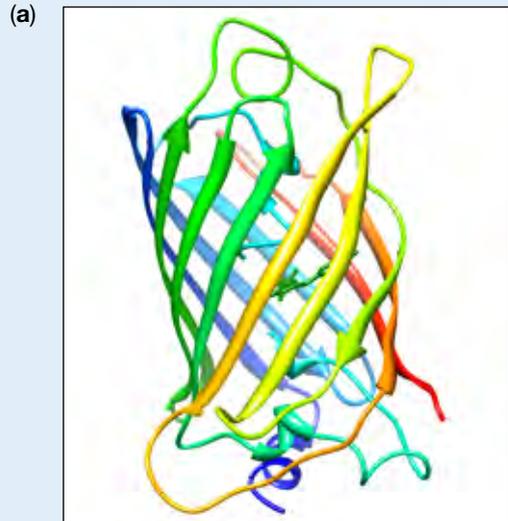
La proteina con la mutazione Y66W è stata realmente ottenuta e ha effettivamente proprietà diverse, con un'emissione spostata a lunghezza d'onda inferiore rispetto alla GFP per cui è stata chiamata **Cyan Fluorescent Protein (CFP)**. Nel tempo l'applicazione di queste tecniche ha prodotto numerose varianti della GFP che prendono il nome dal colore della luce fluorescente emessa (vedi Cap. 8) e che espandono le potenzialità di questo *reporter* (ormai presente in un'innumerabile serie di vettori) nello studio delle proteine.

(continua)

Approfondimento 3.1 (continua)

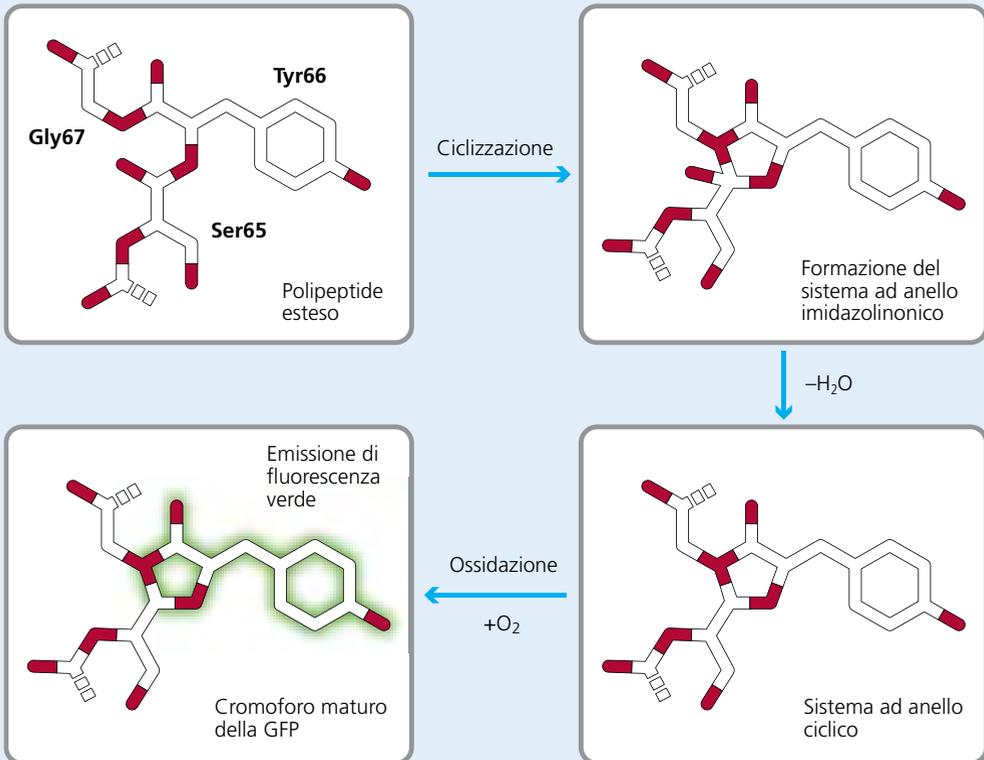
Figura 3.16

(a) Struttura della GFP di *A. victoria* (codice PDB: 1EMA): è evidenziato il cromoforo al centro del barile β . La figura è stata prodotta con il programma Chimera. (b) Maturazione e struttura del cromoforo formato dagli amminoacidi Ser65-Tyr66-Gly67.



(b)

Formazione del cromoforo della GFP in *Aequorea victoria*



(continua)

A cura di Maria Carmela Bonaccorsi di Patti,
Roberto Contestabile, Martino Luigi Di Salvo

Metodologie biochimiche

Espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine

Seconda edizione

Metodologie biochimiche è destinato agli studenti che si avvicinano per la prima volta alle tecniche – molto numerose e spesso complesse – per l'isolamento, l'analisi e la produzione delle macromolecole biologiche. Invece di fornire una serie di schede tecniche sulle singole metodologie, gli autori propongono un percorso di apprendimento progressivo e originale, che ricalca la sequenza di studi che realmente viene fatta in un laboratorio di ricerca. In questo modo, gli studenti acquisiscono una visione d'insieme delle procedure per lo studio delle biomolecole, oltre a imparare le singole nozioni teoriche e pratiche per comprendere e applicare la disciplina.

Il libro si focalizza principalmente sulle strategie e sulle tecniche di espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine. I primi due capitoli introducono lo studente alle basi del metodo scientifico, alla strumentazione e alla sicurezza in laboratorio, per poi passare ai me-

todi di espressione delle proteine ricombinanti, proseguire con le tecniche di purificazione (alle quali sono dedicati tre capitoli, due sulle basi teoriche e uno con numerosi esempi pratici), e terminare con le principali metodologie per la caratterizzazione delle proteine (comprese le tecniche spettroscopiche, di analisi dell'attività enzimatica e delle interazioni molecolari).

Questa seconda edizione si arricchisce con le integrazioni suggerite dai docenti che hanno apprezzato e utilizzato l'edizione precedente. In particolare, la parte relativa alle biotecnologie per la produzione *in vitro* di proteine è stata ampliata e approfondita e ora si estende su due capitoli, uno dedicato al clonaggio e alla mutagenesi, l'altro ai diversi sistemi di espressione. Inoltre, un capitolo interamente nuovo è dedicato alla spettrometria di massa per lo studio delle proteine, tecnica che sta acquisendo sempre maggiore importanza e diffusione.

Gli autori di *Metodologie biochimiche* seconda edizione, curato da Maria Carmela Bonaccorsi di Patti, Roberto Contestabile e Martino Luigi Di Salvo, anche coautori di diversi capitoli, sono: Fabio Altieri, Giovanni Antonini, Maria Teresa Carrì, Margherita Eufemi, Alessandra Giorgi, Francesco Giansanti, Rodolfo Ippoliti, Giuseppina Pitari.

Le risorse multimediali



online.universita.zanichelli.it/bonaccorsize

A questo indirizzo sono disponibili le risorse multimediali di complemento al libro. Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su my.zanichelli.it inserendo la chiave di attivazione personale contenuta nel libro.

BONACCORSI*METOD BIOCHIMICHE 2E LUM

ISBN 978-88-08-52058-6



9 788808 520586

0 1 2 3 4 5 6 7 8 (60F)

Al pubblico € 39,00 •••

In caso di variazione Iva o cambiamento prezzo consultare il sito o il catalogo dell'editore

www.zanichelli.it