

## **ESPRESSIONE DI UNA PROTEINA RICOMBINANTE IN CELLULE BATTERICHE**

*Laboratorio di Bioinorganica (Responsabile attività: Prof. Angelo Bracalello, Tutor: Dr.ssa M. Antonietta Vaccaro)*

Grandi quantità di polipeptidi e proteine, sia a scopo di ricerca di base (per studi strutturali o biotecnologici), sia per la produzione di composti di interesse terapeutico, possono essere ottenute mediante purificazione da sorgenti naturali, per sintesi chimica o attraverso le tecnologie del DNA ricombinante. La limitata disponibilità delle fonti naturali, la complessità delle procedure di purificazione, la possibilità di contaminazioni e le variazioni da lotto a lotto costituiscono le principali criticità del primo approccio, mentre la lunghezza della catena polipeptidica e la necessità di conoscerne l'intera sequenza amminoacidica rappresentano i limiti più importanti della sintesi chimica.

A partire dagli anni Settanta un notevole interesse ha destato lo sviluppo di tecniche di laboratorio che consentono di copiare sequenze di DNA e di inserirle nel genoma di altre cellule; tali tecniche sono definite, nel loro insieme, con il termine "tecnologie del DNA ricombinante" e le proteine ottenute in questo modo vengono dette proteine ricombinanti. Tale approccio, oltre a permettere l'acquisizione delle proprietà funzionali della proteina naturale considerata nella sua intera lunghezza, consente di modificarne anche la sequenza originale. I metodi ricombinanti hanno, quindi, offerto un potente mezzo per rendere possibile la sintesi di polipeptidi con sequenze desiderate in organismi semplici, come le cellule batteriche, e/o complessi, come gli eucarioti, con bassi costi di produzione.

La produzione di proteine ricombinanti richiede l'inserimento del frammento di DNA codificante per la sequenza amminoacidica d'interesse (inserto), all'interno di una molecola di DNA denominata vettore. In seguito il vettore ricombinante (inserto+vettore) è clonato in opportune cellule ospiti (procarioti o eucarioti) che, in presenza di particolari induttori, produrranno grandi quantità di prodotto del gene di interesse.

Tale approccio ha portato, fin da subito, importanti risultati anche in ambito terapeutico: consentì la produzione dell'insulina nel 1978 e dell'ormone della crescita nel 1979, utilizzati per curare rispettivamente il diabete ed il nanismo. Prima dell'avvento di tali tecniche, l'insulina veniva estratta dal pancreas bovino o suino ed erano necessari circa 3500 kg di pancreas animali per produrre circa 0.5 kg di insulina, comportando quindi uno sforzo enorme. L'ottenimento di una molecola perfettamente identica a quella umana tramite ingegneria genetica, ha permesso di evitare i problemi legati alle reazioni allergiche all'insulina animale da parte di alcuni pazienti affetti da diabete. L'ormone della crescita umano, invece, veniva inizialmente estratto dalle ghiandole pituitarie di cadaveri di uomini o scimmie, a costi elevatissimi e con considerevoli problemi pratici e sanitari. Attualmente tutti questi problemi sono stati risolti dalla sua produzione per via ricombinate e l'ormone è anche oggetto di un fiorente commercio come farmaco anti-invecchiamento. Oggi è possibile produrre centinaia di catene polipeptidiche per studi strutturali e funzionali e per interesse terapeutico.

L'espressione di una proteina ricombinante in un sistema batterico costituirà proprio lo scopo di questa esperienza di laboratorio.

## PROTOCOLLO SPERIMENTALE

### Pre-inoculo

- \* Versare circa 7,5 ml di terreno di coltura LB (Luria-Bertani, NaCl 0.5%, estratto di lievito 0.5%, peptone 1%) in una falcon da 50 ml ed aggiungervi un'opportuna quantità di Amp (50 mg/ml), così da avere una concentrazione finale di ampicillina pari a 100 µg/ml:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$
$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

- \* Dopo aver chiuso e capovolto 2-3 volte la falcon per rendere omogenea la soluzione, versarne circa 2,5 ml in una falcon da 15 ml (controllo negativo).
- \* Pizzicare, con uno stuzzicadenti sterile, una colonia singola di cellule BL21(DE3) contenenti il vettore ricombinante pET-46 Ek/LIC+RE dalla piastra con LB+Agar (1,5%) ed agitare l'estremità dello stuzzicadenti utilizzata, nel terreno di coltura rimasto nella falcon da 50 ml.
- \* Gettare lo stuzzicadenti nello scarico contenente candeggina.
- \* Svitare leggermente i tappi delle falcon, fissarli con la carta gommatata, e riporre le falcon nell'incubatore.
- \* Incubare le falcon a 37°C, in agitazione (270 rpm), over night.

### Inoculo

- \* Verificare che nella falcon in cui è stata pre-inoculata la coltura cellulare, sia avvenuta la crescita (terreno torbido), e che il controllo sia negativo (terreno limpido).
- \* Sotto cappa, versare nella beuta sterile 20 ml di terreno LB, a cui occorre aggiungere Amp 50 mg/ml, per avere una C<sub>f</sub> di Amp 100 µg/ml.
- \* Aggiungere la pre-coltura in un rapporto 1:200.
- \* Chiudere la beuta con la carta d'alluminio, bucherellarne il coperchio e porla nell'incubatore a 37°C, in agitazione costante (270 rpm), fino al raggiungimento della fase di crescita esponenziale.

### Misurazioni della torbidità

- \* Accendere lo spettrofotometro, selezionare la lunghezza d'onda d'interesse (600 nm) ed attendere che la lampada si stabilizzi.
- \* Dopo circa 2h dall'inoculo, versare in una cuvetta 1 ml di LB (bianco o controllo negativo).
- \* Senza togliere la beuta dall'incubatore, prelevare 1 ml di coltura e versarlo in un'altra cuvetta.
- \* Premere il tasto SET REF dello spettrofotometro, porre la cuvetta del bianco nell'apposito scomparto e premere nuovamente SET REF, per azzerare la lettura del bianco.
- \* Sostituire la cuvetta del bianco con quella contenente la coltura batterica ed annotare il valore di densità ottica: se esso risultasse compreso tra 0.6 e 0.8, si potrebbe procedere all'induzione dell'espressione proteica, al contrario si dovrebbe attendere finché un'ulteriore lettura non riveli il valore atteso.

## Induzione dell'espressione proteica

- \* Prelevare 1 ml di coltura cellulare e suddividerlo in 4 provette, precedentemente etichettate "NON INDOTTO gg/mm/aa", in modo da avere 4 aliquote di 250 µl. Porre le provette in ghiaccio.
- \* Aggiungere nella sospensione batterica, una quantità di IPTG (1M) in modo da avere una  $C_f$  di IPTG pari a 0.5 mM, e continuare l'incubazione per un'ulteriore ora.
- \* Centrifugare le 4 aliquote di NON INDOTTO a 6000 rpm, 4°C, per 10 min. Rimuovere il surnatante e conservare il pellet cellulare a -20°C.
- \* Stappare la crescita batterica ponendo la beuta in ghiaccio, prelevarne 1 ml e suddividerlo in 4 provette, precedentemente etichettate "INDOTTO RE IPTG 0.5 mM 1h gg/mm/aa", in modo da avere 4 aliquote di 250 µl.
- \* Centrifugare a 6000 rpm, per 10 min alla temperatura di 4°C. Rimuovere il surnatante e conservare il pellet cellulare a -20°C.

## SDS-PAGE

### Preparazione di un gel di poliacrilammide 4%-15%

- \* Prendere un vetrino con lo spacer ed uno piccolo, metterli uno sull'altro in modo che lo spacer sia frammezzo e che i bordi laterali ed inferiore coincidano perfettamente, porli all'interno dell'accrocco verde e chiudere le linguette laterali per fissarli.
- \* Montare l'accrocco verde nell'apposita postazione dell'accrocco trasparente, ponendo la spugnetta grigia al di sotto dei vetri.
- \* Versare dH<sub>2</sub>O con una spruzzetta tra i 2 vetri per verificare che non perdano.
- \* Preparare il running gel, in una falcon da 15 ml, secondo la seguente ricetta:
  - A-BIS 30% 3 ml
  - dH<sub>2</sub>O 1.3 ml
  - Tris pH8.8 1.86M 1.5 ml
  - SDS 10% 65 µl
- \* Eliminare la dH<sub>2</sub>O dai vetri, capovolgendo l'intero accrocco trasparente e rimuovendo i residui con la carta assorbente.
- \* Continuare la preparazione del running gel aggiungendo nella falcon:
  - APS 10% 65 µl
  - TEMED 4 µl
- \* Chiudere la falcon e capovolgerla più volte.
- \* Usando la micropipetta p1000, versare tra i vetri il running gel fino agli angoli dell'accrocco verde, operando rapidamente prima che la soluzione gelifichi.
- \* Aggiungere dH<sub>2</sub>O fino al bordo superiore del vetrino piccolo e lasciar polimerizzare il gel, senza spostare mai l'accrocco.
- \* Preparare lo stacking gel, in una nuova falcon da 15 ml, secondo la seguente ricetta:
  - A-BIS 30% 350 µl
  - dH<sub>2</sub>O 1.7 ml
  - Tris pH6.8 0.6M 0.5 ml
  - SDS 10% 25 µl



### Colorazione del gel con Coomassie Brilliant Blue

- \* Una volta spento il generatore di corrente, togliere il coperchio della vaschetta elettroforetica, sollevare la cassetta contenente il gel, versare il running buffer nella stessa vaschetta ed aprire la cassetta per rimuovere il gel.
- \* Con la punta di una spatola, sollevare molto lentamente un'estremità del vetrino piccolo per far entrare aria e farlo staccare dal gel.
- \* Porre il gel in un contenitore, coprirlo completamente con il colorante (Coomassie Blue 0.1%, acido acetico 10%, metanolo 30%) e chiudere con della carta d'alluminio.
- \* Porre il contenitore con il gel su un oscillatore orbitale e lasciare il gel in agitazione per 45 min.

### Decolorazione del gel

- \* Tolto il contenitore con il gel dall'oscillatore, versare il colorante nell'apposita bottiglia e risciacquare il contenitore con dell'acqua distillata.
- \* Porre il gel in un becher di vetro da 1L, versarvi circa 500 ml di dH<sub>2</sub>O e posizionare nel becher, a pelo dell'acqua, un foglio di carta assorbente.
- \* Porre il becher nel forno microonde alla massima temperatura per 5 min.
- \* Prendere il becher dal forno con l'apposito guanto, rimuovere la carta assorbente ed eliminare l'acqua. Se il gel non è ancora sufficientemente decolorato, ripetere nuovamente la decolorazione.

### *Disposizioni minime di sicurezza per accedere al laboratorio:*

- *Indossare un abbigliamento adeguato (pantaloni lunghi, scarpe chiuse);*
- *Indossare il camice e i guanti.*