Relazione Short-term mobility (2009)

Proponente: Dott.ssa Agata Gambacorta

Fruitore: Dott.ssa Laura Dipasquale

Titolo programma:

Clonaggio ed espressione di un'invertasi dal batterio produttore di idrogeno *Thermotoga neapolitana*

Periodo soggiorno: 15 Marzo – 5 Aprile 2009

Sede soggiorno: Station Biologique, Vegetaux Marins et Biomolecules, Roscoff (France)

Durante il periodo di studio svoltosi presso la Stazione Biologica di Roscoff la Dott.ssa Laura Dipasquale ha frequentato il laboratorio della Dott.ssa Mirjam Czjzek per svolgere il programma di ricerca dal titolo: "Clonaggio ed espressione di un'invertasi dal batterio produttore di idrogeno *Thermotoga neapolitana*".

A tale scopo è stata studiata la possibilità di clonare ed esprimere il gene che codifica per l'enzima invertasi da *Thermotoga neapolitana* (un batterio marino termofilo anaerobio produttore di idrogeno studiato dal gruppo proponente nell'ambito del progetto FIRS "Metodologie innovative per la produzione di idrogeno da processi biologici" finanziato dal MIUR 1756-2005) nell'ospite *Escherichia coli*.

Per lo svolgimento del suddetto progetto, è stato estratto il DNA genomico da *T. neapolitana* a partire da 0.7 g di cellule liofile (corrispondenti a circa 5 g di cellule umide) mediante il seguente protocollo:

- sospendere le cellule in 10 mL di Tris-HCl 50 mM, saccarosio 25%, pH 8.0;
- aggiungere 2 mL di Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0;
- aggiungere 20 mg di lisozima;

- aggiungere 5 mL di EDTA 500 mM pH 8.0 fino ad una concentrazione finale 100 mM;
- porre in ghiaccio, agitando a intervalli regolari, fino a quando la soluzione diventa limpida;
- aggiungere 2 mL di SDS 20% fino ad una concentrazione finale 2% ed agitare manualmente;
- aggiungere 10 mL di lysing solution (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0);
- aggiungere 500 μg/mL di proteinasi K e incubare per 1 h a 50°C;
- raffreddare in ghiaccio e aggiungere perclorato di sodio 5 M fino ad una concentrazione finale 1 M;
- aggiungere 1:1 una miscela di fenolo equilibrato (50%) (agitare il tutto) e cloroformio - alcol isoamilico (24:1) (50%);
- agitare per ottenere una miscela omogenea e poi centrifugare a 10000 g per 30 min a 20°C;
- recuperare la fase acquosa superiore e aggiungere 1 volume di cloroformio - alcol isoamilico (24:1);
- agitare per ottenere una miscela omogenea e poi centrifugare a 10000 g per 5 min a 20°C;
- recuperare la fase acquosa superiore e aggiungere lentamente 2 volumi di etanolo puro. Successivamente mescolare le due fasi utilizzando una bacchetta di vetro a cui rimangono adesi gli acidi nucleici;
- il pellet così ottenuto e ancora adeso alla bacchetta è lavato prima con etanolo 70% e poi con etanolo puro. Successivamente, sempre sulla bacchetta, si lascia seccare il pellet all'aria;
- quando il pellet si è seccato, lo si dissolve in Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.

Successivamente si quantificano gli acidi nucleici mediante lettura spettrofotometrica nell'intervallo 220 – 300 nm: in tal modo è ottenuta una concentrazione pari a 17 μg/mL. Mediante elettroforesi su gel di agarosio 0.8% viene controllata l'effettiva purezza del DNA e il suo grado di integrità (Fig. 1).

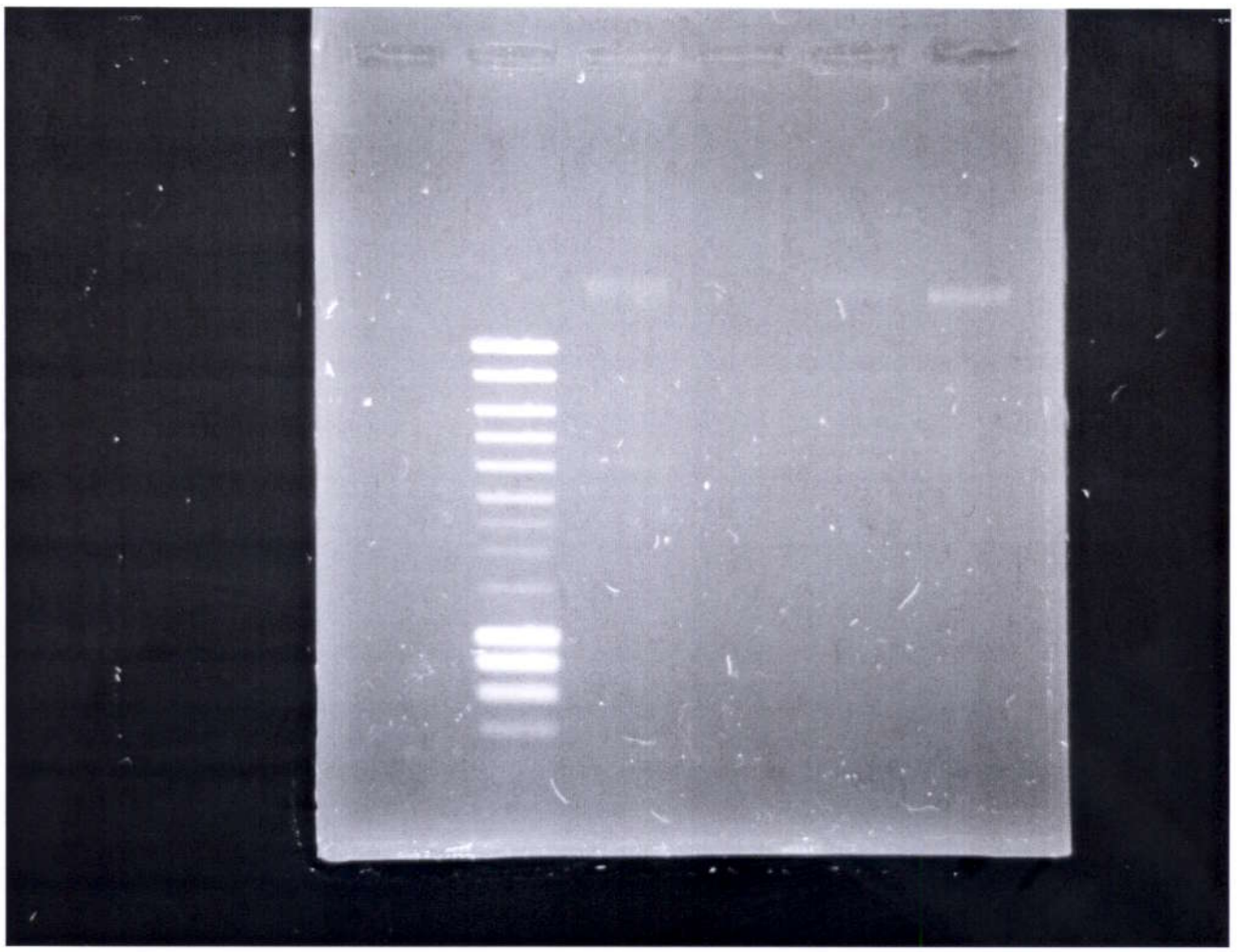

Fig. 1 – Gel di agarosio (0.8%) osservato al transilluminatore UV che mostra nella linea 1 lo SmartLadder (marker che comprende frammenti di DNA che vanno da 10000 a 200 bp) e nelle altre linee il DNA genomico estratto da *T. neapolitana*

A questo punto il genoma è usato come "stampo" per la Reazione di Polimerizzazione a Catena (Polymerase Chain Reaction, P.C.R.), tecnica che prevede l'amplificazione di una sequenza di DNA (nel nostro caso del gene che codifica per l'enzima invertasi) di cui si conoscono le sequenze nucleotidiche degli estremi. Per la realizzazione della P.C.R. è necessario avere:

- DNA contenente la sequenza da amplificare (200 o 400 ng);
- dNTP (0.2 mM), ovvero i desossiribonucleotidi trifosfati, quali ATP, CTP, GTP, TTP, usati come substrato per la reazione di polimerizzazione;

- due specifici primer (ciascuno 1 μM), che sono sequenze di oligonucleotidi complementari agli estremi della sequenza da amplificare;
- un enzima termostabile con attività DNA polimerasica, che nel nostro caso è la *Pfu* DNA polimerasi (1.5 U), che è estratta dall'archeabatterio ipertermofilo *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 e non denatura ad alte temperature. Tale enzima oltre ad avere un'attività polimerasica 5'-3' possiede anche un'attività esonucleasica 3'-5' nota anche come "proofreading activity" ovvero di "correzione delle bozze";
- $MgCl_2$ 2.5 mM;
- una soluzione tampone (1 x) contenente Tris-HCl 200 mM, KCl 100 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 100 mM, $MgSO_4$ 20 mM, BSA priva di nucleasi 1 mg/ml, Triton X-100 1%, pH 8.8. Tale soluzione è necessaria per riprodurre le condizioni fisiologiche ottimali per il funzionamento della DNA polimerasi. La miscela di reazione ha un volume di 50 μL e tutte le concentrazioni indicate sono quelle finali.

La P.C.R. si realizza attraverso una serie di cicli ognuno dei quali è composto dalle tre fasi:

- denaturazione: la soluzione di DNA da replicare, insieme ai desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primers e DNA polimerasi, viene portata a una temperatura di 95°C per 30 sec. Ciò causa l'apertura della doppia elica del DNA, che quindi si presenta come singolo filamento;
- annealing: successivamente la temperatura viene abbassata fino a 55 C per 30 sec al fine di permettere l'appaiamento dei primers alle regioni complementari presenti sui filamenti di DNA precedentemente denaturati;
- estensione: la temperatura viene innalzata fino a 72 C per 4 min al fine di massimizzare l'azione della DNA polimerasi che determina un allungamento dei primers utilizzando i desossiribonucleotidi trifosfati come substrati e il singolo filamento di DNA come stampo (Fig. 2).

Il ciclo descritto viene ripetuto per 35 volte.

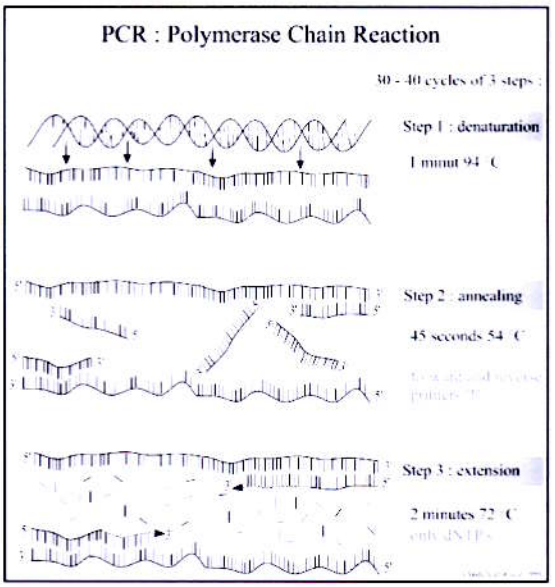

Fig. 2 - Schema della Polymerase Chain Reaction (P.C.R.)

Al fine di disegnare i primers necessari per l'amplificazione genica, sono state studiate e confrontate la sequenza N-terminale dell'invertasi isolata, purificata e caratterizzata da *T. neapolitana* con le altre proteine presenti nelle principali banche dati (EMBL, Swiss Prot, NCBI, ecc) e, in particolare, si è ottenuta un'omologia pari al 100% con una solute-binding protein, famiglia 1, da *Thermotoga petrofila* RKU-1 (accession number ABQ46972). In Fig. 3 è riportato l'allineamento, ottenuto mediante il programma BLAST, delle due sequenze in questione e l'intera sequenza amminoacidica della proteina da *T. petrophila*:

```
>   ref|YP_001244548.1| G extracellular solute-binding protein [Thermotoga petrophila
RKU-1]
 gb|ABQ46972.1| G extracellular solute-binding protein, family 1 [Thermotoga petrophila
RKU-1]
Length=411

 GENE ID: 5171032 Tpet_0954 | extracellular solute-binding protein
[Thermotoga petrophila RKU-1]

 Score = 64.3 bits (144),  Expect = 1e-09
 Identities = 20/20 (100%), Positives = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)

Query  1   VKITMTSGGVGKELEVLKKQ  20
           VKITMTSGGVGKELEVLKKQ
Sbjct  20  VKITMTSGGVGKELEVLKKQ  39

        1 mkkyfvllla vllvgglfav kitmtsggvg kelevlkkql emfhqqypdi eveiipmpds
       61 sterhdlyvt yfaagetdpd vlmldviwpa efapfledlt adkdyfelge flpgtvmsvt
      121 vngrivavpw ftdagllyyr kdllekygyd haprtwdelv emakkisqae gihgfvwqga
      181 ryeglvcdfl eylwsfggdv ldesgkvvid speavaalqf mvdliykhkv tpegvttyme
      241 edarrifqng eavfmrnwpy awslvnsdes pikgkvgvap lpmgpggrra atlggwvlgi
      301 nkfsspeeke aakklikflt sydqqlykai nagqnptrka vykdpklkea apfmvellgv
      361 finalprprv anytevsdvi qryvhaaltr qttpedaikn iakelkfllg q
//
```

Conoscendo la sequenza nucleotidica del gene codificante per tale proteina in *T. petrofila* RKU-1 è stato quindi possibile disegnare i seguenti primers, sia forward che reverse, le cui sequenze nucleotidiche sono, rispettivamente:

5′ CCC-CCC-ATG-CAT-TTA-CTG-TCC-AAG-CAG-GAA-TTT-GAG-CTC 3′

5′ GGG-GGG-CTC-GAC-GTG-AAA-ATC-ACT-ATG-ACA-TCT-GGA-GGA 3′

Con l'ausilio dei primers sintetizzati è stata allestita una prima P.C.R. e i campioni da essa ottenuti sono stati poi esaminati su un gel di agarosio 0.8%, ma non si è osservata la presenza di alcuna banda di interesse. Allo scopo di trovare le migliori condizioni per l'amplificazione del gene d'interesse, sono state modificate le concentrazioni di alcuni reattivi impiegati per la P.C.R., ma ciò non ha comunque portato ad alcun risultato positivo.

A questo punto si è effettuata una purificazione del DNA mediante gradiente di CsCl. Tale procedura prevede:

- l'aggiunta in tubi opportuni di CsCl 816.5 mg/mL;
- successivamente si aggiungono circa 6 mL di Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 per far sciogliere il sale, 1 mL di campione (pari a 1.7 mg di acidi nucleici) e 900 µL di bromuro di etidio. Si arriva al volume finale di 12 mL aggiungendo il tampone precedentemente utilizzato e stando attenti ad eliminare le eventuali bolle presenti;
- si centrifuga a 45000 g per 48 h a 20 °C;
- successivamente si osserva con una lampada UV la presenza della banda di DNA (l'eventuale RNA precipita sul fondo, mentre le proteine formano un velo in superficie);
- mediante una siringa si procede alla rimozione della banda di DNA;
- il bromuro di etidio è successivamente allontanato dal DNA grazie all'utilizzo di una soluzione di butanolo saturato con acqua, che è aggiunto 1:1 al campione di acido nucleico. Dopo aver agitato per rendere il tutto omogeneo, si osserva la presenza di una fase superiore fucsia – rosa (contenente il bromuro di etidio) e una fase inferiore acquosa (contenente il DNA);

- quest'operazione è ripetuta varie volte, fino a quando le due fasi non sono perfettamente incolori;
- successivamente il DNA è precipitato mediante l'aggiunta di due volumi di H_2O (per diluire il CsCl), acetato di sodio con una concentrazione finale di 300 mM e due volumi di etanolo puro freddo. I campioni così ottenuti si pongono a -80°C per 1 h;
- poi si centrifuga a 10000 rpm per 30 min a 4°C e il pellet così ottenuto è lavato con etanolo 70%, nuovamente centrifugato a 10000 rpm per 5 min a 4°C, poi seccato all'aria e ripreso in Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0;
- si lascia dissolvere a temperatura ambiente, dopo di che si procede alla determinazione quantitativa del DNA mediante l'utilizzo del NanoDrop Instrument (che permette di determinare la concentrazione di acidi nucleici usando piccolissimi volumi): la concentrazione ottenuta è di 200 ng/μL. Tale campione è stato anche analizzato su gel di agarosio 0.8% per verificarne l'integrità.

Con il campione così ottenuto si ripete la P.C.R., utilizzando queste miscele di reazione (tab. 1):

	1	**2**	**3**	**4**
DNA	200 ng	200 ng	400 ng	400 ng
Primer forward 100 μM	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
Primer reverse 100 μM	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
dNTP 10 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Buffer 10 x	1 x	1 x	1 x	1 x
$MgCl_2$ 25 mM	2.5 mM	-	2.5 mM	-
Enzyme 3 U/μl	1.5 U	1.5 U	1.5 U	1.5 U
H_2O	a 50 μl	a 50 μl	a 50 μl	a 50 μl

Il programma utilizzato per la PCR è (tab. 2):

Step	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	35
Annealing	50°C	30 sec	
Estensione	72 °C	4 min	
Estensione finale	72 °C	10 min	1
	4 °C	indefinito	1

I vari campioni provenienti da P.C.R. sono stati poi esaminati su gel di agarosio 0.8%: come è possibile notare dalla fig. 4, tutte le miscele di reazione hanno prodotto dei frammenti di amplificazione. In particolare, si osserva la presenza di più prodotti di reazione in presenza di $MgCl_2$ e invece di un solo prodotto di reazione in assenza di tale sale. Infatti molto interessanti sono apparse le miscele 1 e 3 contenenti un frammento di circa 1500 bp (base pair, coppie di basi) e un frammento di circa 200 bp.

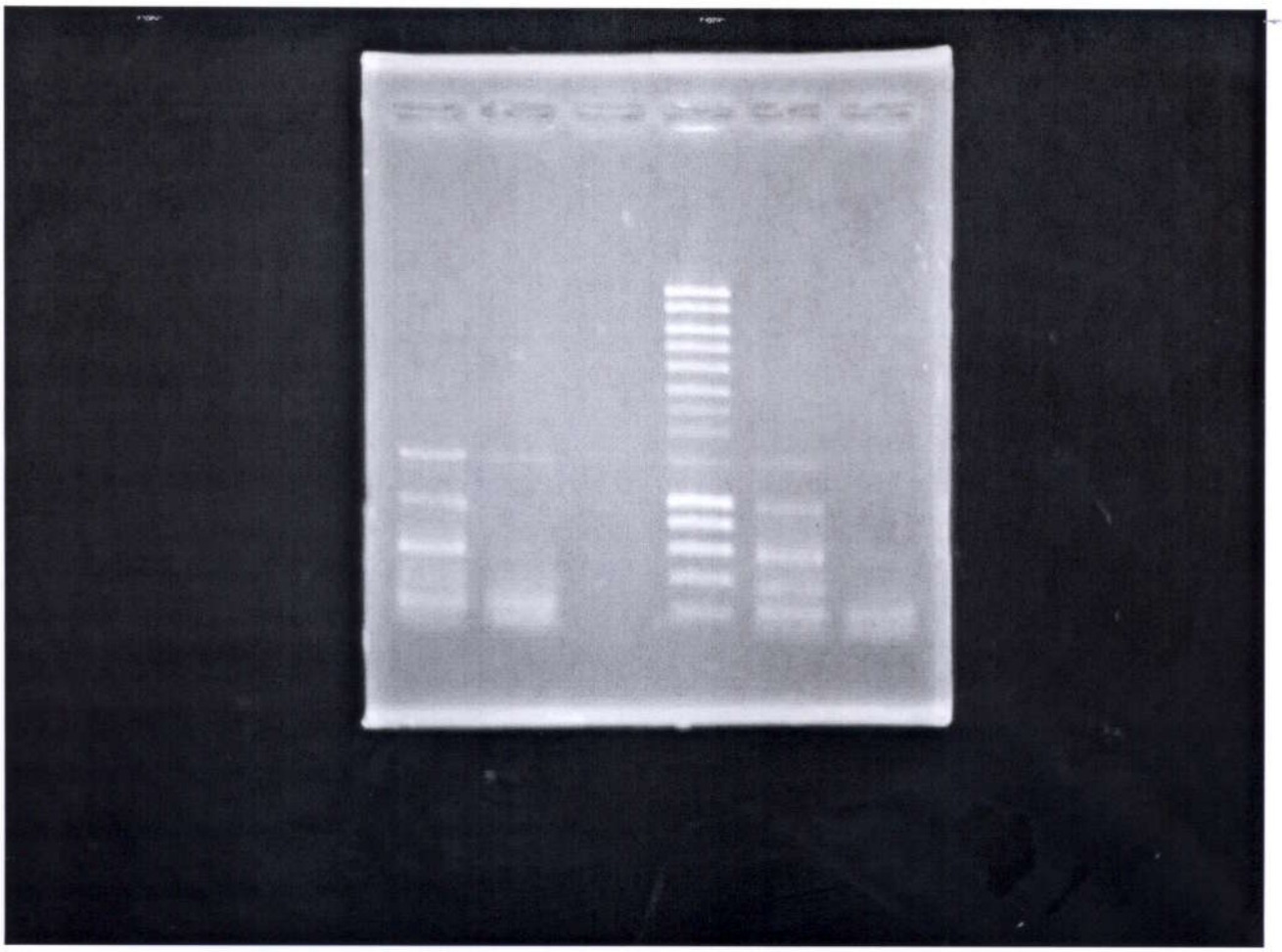

Fig. 4 - Gel di agarosio (0.8%) con cui sono stati analizzati i prodotti amplificati mediante P.C.R. e rivelati dopo opportuna colorazione con bromuro di etidio. Linee 1, 2, 4 e 5: miscele di reazione ottenute come riportato in tabella 1; linea 3: SmartLadder, marker di peso molecolare noto

Quindi le miscele di reazione 1 e 3 sono state unite ed è stato purificato il prodotto della P.C.R. mediante l'utilizzo di un kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) che ha permesso di allontanare sali, oligonucleotidi trifosfati, primers e polimerasi ottenendo così frammenti di DNA purificati. Successivamente il DNA così ottenuto è stato quantificato mediante l'utilizzo del NanoDrop Instrument ed è risultato avere una concentrazione di 77.1 ng/μL.

Gli enzimi di restrizione individuati come i più appropriati per tagliare in maniera specifica la sequenza di interesse codificante per l'attività invertasica in *T. neapolitana* sono:

- NsiI, codificato in *Neisseria sicca* (ATCC 29256) e clonato e isolato da *Escherichia coli*, che riconosce la sequenza 5′ ATGCA'T 3′
  3′ T,ACGTA 5′;
- XhoI, codificato in *Xhantomonas holcicola* (ATCC 13461) e clonato e isolato da *Escherichia coli*, che riconosce la sequenza 5′ C'TCGAG 3′
  3′ GAGCT,C 5′;

Il plasmide utilizzato per il clonaggio è pFO4 e, allo scopo di testare preventivamente se viene specificamente attaccato dagli enzimi di restrizione di nostro interesse, è stato incubato con tali enzimi a 37°C per 3 h e successivamente su gel di agarosio 0.8% si è controllato se tale digestione fosse realmente avvenuta (Fig. 5).
A tale scopo sono state preparate tre miscele di reazione:

- Plasmide pFO4 (500 ng/µl) 1 µl
- Buffer 3 (10 x)* 2 µl (concentrazione finale 1 x)
- H_2O 17 µl
- NsiI (10 U/ml) 1 µl

- Plasmide pFO4 (500 ng/µl) 1 µl
- Buffer 3 (10 x)* 2 µl (concentrazione finale 1 x)
- H_2O 17 µl
- XhoI (20 U/ml) 1 µl

- Plasmide pFO4 (500 ng/µl) 1 µl
- Buffer 3 (10 x)* 2 µl (concentrazione finale 1 x)
- H_2O 16 µl
- NsiI (10 U/ml) 1 µl
- XhoI (20 U/ml) 1 µl

- *Il tampone da usare dipende dall'enzima di restrizione e viene scelto sulla base delle indicazioni presenti sul manuale che accompagna i vari enzimi. Nello

specifico, questo tampone contiene Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitolo 1 mM, pH 7.9.

Fig. 5 – Gel di agarosio (0.8%) in cui si osservano, nell'ordine, il marker molecolare, il DNA genomico da *T. neapolitana* (caricato in due linee successive), il plasmide pFO4 (incubato a 37°C per 3 h senza enzimi di restrizione), pFO4 + NsiI, pFO4 + NsiI + XhoI e pFO4 + XhoI

Utilizzando un'analoga miscela di reazione, si è incubato anche il DNA proveniente da P.C.R. con gli specifici enzimi di restrizione; successivamente sia il DNA che il plasmide digeriti con gli enzimi di restrizione sono stati purificati mediante l'utilizzo del NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) e quantificati mediante il NanoDrop Instrument: le concentrazioni sono risultate essere, rispettivamente, di 49 e 20.7 ng/μL.

A questo punto si è preparata una miscela per la ligazione, contenente:

- plasmide precedente digerito (10 ng/μL);
- DNA precedente digerito;
- T4 DNA ligasi (400 U/mL) (2 μl);
- T4 DNA ligasi buffer (10 x: Tris-HCl 400 mM, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM, pH 7.8) (1 μl);
- H_2O per un volume finale di 20 μL.

Tale miscela è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente si procede con la trasformazione, ovvero ai 20 μL della miscela di ligazione sono aggiunti 50 μL di cellule DH5α (*Escherichia coli*) già precedentemente rese competenti: si incuba tale miscela per 30 min in ghiaccio. Successivamente la si pone per 45 secondi a 42 °C, poi per 5 min di nuovo in ghiaccio e infine si aggiungono 100 μL di un terreno di coltura (denominato SOC) e si incuba il tutto in agitazione per 45 min a 37°C. Dopo di che si piastrano 100 μL di tale miscela su una piastra di terreno LB + ampicillina, che è poi incubata a 37 °C per 48 h.
Trascorse le 48 ore, si è osservata la presenza di colonie di cellule trasformate (Fig. 6), che devono però essere esaminate per saggiare la presenza o meno al loro interno del plasmide contenente la sequenza genica di nostro interesse.

Fig. 6 – Foto della piastra su cui sono cresciute alcune colonie del ceppo DH5α trasformate

Obiettivi futuri saranno l'espressione del gene clonato e la purificazione della proteina di interesse da esso codificata, la cui struttura e meccanismo di funzionamento

potranno così essere ulteriormente e approfonditamente studiate. Ciò anche al fine di poter meglio conoscere il metabolismo degli zuccheri nel batterio termofilo anaerobio produttore di idrogeno *Thermotoga neapolitana* e poterne così ulteriormente ottimizzare la produzione di idrogeno.

Pertanto la permanenza presso la Stazione Biologica di Roscoff si è conclusa con un risultato più che positivo, sia in termini di conoscenze acquisite su tecniche di biologia molecolare, di cui la beneficiaria del programma si è impadronita durante il suo soggiorno e che saranno utili alla sua formazione professionale, che per i risultati scientifici ottenuti, che saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali.

Pozzuoli, 16 Aprile 2009

Firma del Proponente

Dott.ssa Agata Gambacorta

CNR - Istituto di Chimica Biomolecolare
Via Campi Flegrei, 34 - Compressorio Olivetti
80078 Pozzuoli (Na) ITALY

Firma del Fruitore

Dott.ssa Laura Dipasquale