

METODI BIOCHIMICI IN BIOTECNOLOGIE 22-10-2008

Test A

Nome _____

1A) Una proteina X ha un coefficiente di estinzione molare pari a $15,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm (pH 7.0).

- a) Quale sarà l'assorbimento a 280 nm di una soluzione 0.5 M?
- b) Considerando che gli spettrofotometri comunemente utilizzati nella ricerca biochimica danno risultati affidabili per assorbanze comprese tra 0 e 2, quanto diluireste la soluzione proteica per ottenere una misura affidabile?
- c) Sapendo che la proteina pesa 24600 Dalton, quanti mg di proteina sono presenti in 1 ml di soluzione che assorbe 0,74 a 280 nm?

2A) Un campione proteico viene analizzato attraverso SDS-PAGE e cromatografia per gel filtrazione. La gel filtrazione evidenzia la presenza di due picchi di eluizione ben distinti, corrispondenti a proteine di peso molecolare apparente pari rispettivamente a 64000 e 25000 Da. L'analisi elettroforetica, dopo denaturazione del campione in presenza di ditiotritolo, evidenzia la presenza di tre catene polipeptidiche di massa molecolare pari a circa 7000, 12500 e 25000 Da, rispettivamente. Lo stesso campione analizzato in seguito a denaturazione in assenza di agenti riducenti evidenzia due bande di peso pari a circa 32000 e 25000 Da, rispettivamente.

Quale potrebbe essere la struttura quaternaria delle due proteine e come sono unite tra loro le diverse subunità?

3A. Calcolare il campo centrifugo relativo esercitato su di una particella che si trova sul fondo di una provetta in un rotore ad angolo fisso il cui raggio massimo è 12 cm e che gira a 10000 rpm.

4A) Supponiamo che abbiate espresso una proteina di vostro interesse in *Escherichia coli* come proteina fusa ad una coda di poliiistidina (His-tag). Un'analisi su SDS-PAGE vi dimostra che la proteina è espressa in modo molto efficiente ed in forma perfettamente solubile. A questo punto tentate la purificazione della proteina tramite cromatografia di affinità su resina Ni-NTA. A questo scopo caricate un estratto batterico contenente la proteina su una colonnina di Ni-NTA precedentemente equilibrata con Tampone fosfato 50 mM pH, 5.5, NaCl 300 mM. La proteina viene successivamente eluita con un gradiente lineare di imidazolo (da 0 a 250 mM) disciolto sempre nello stesso tampone (Tampone fosfato 50 mM pH, 5.5, NaCl 300 mM). L'analisi elettroforetica delle proteine eluite dal gel evidenzia che tutta la proteina ricombinante è eluita nel "flow through" e non si è quindi attaccata alla colonna.

Quale spiegazione daresti per quanto osservato?

5A) In un esperimento di Western blot, un anticorpo policlonale diretto contro la proteina X presente in un estratto cellulare totale riconosce non solo la banda di peso molecolare atteso, ma anche altre 3 bande che migrano più velocemente di quella attesa.

Quali potrebbero essere le spiegazioni di tale osservazione ?

6A) Cosa sono e in che tipo di esperimenti possono essere utilizzati gli array di proteine?

7A) Gli agenti caotropici (urea, guanidina) possono favorire la dissociazione delle subunità delle proteine multimeriche e, quindi, vengono frequentemente utilizzati in esperimenti di analisi della struttura quaternaria delle proteine

Supponiamo che stiate studiando un enzima dimerico che possiede un residuo di triptofano all'interfaccia tra le subunità. **Quale tipo di tecnica spettroscopica utilizzereste per studiare la dissociazione delle due subunità in funzione della concentrazione di urea? Spiegate le ragioni della vostra risposta**

8A) Spiegare il principio della cromatografia per interazioni idrofobiche. In che modo viene comunemente favorito il legame delle proteine solubili alle resine utilizzate in questo tipo di cromatografia?

9A) Discutere i principali vantaggi ed i limiti dei diversi sistemi microbici utilizzabili per la produzione di proteine eterologhe

10AB) Per ciascuna coppia di lunghezze d'onda elencate di seguito, specificare quale è ad energia più alta e spiegare la ragione della risposta:

- (a) 280 nm (UV); 360 nm (VIS)**
- (b) 200000 nm (microonda); 800 nm (VIS)**