

# Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

---

IAMC - CNR - UOS di Capo Granitola



## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

Masullo T<sup>1</sup>., Cuttitta A<sup>1</sup>., Armata N<sup>2</sup>., Pendolino F<sup>3</sup>., Colombo P<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, TP), Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Fisica e Chimica, Viale delle Scienze Ed17, 90128, Università di Palermo, Italia

<sup>3</sup>Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei", Università di Padova, Via Marzolo 8, 35131 Padova, Italia

<sup>4</sup> Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBIM-CNR), Via Ugo La Malfa, 153, 90146 Palermo, Italia

# **Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata***

## **Sommario**

Introduzione	2
Disegno sperimentale	2
Isolamento mRNA proteina fluorescente	3
Clonazione della proteina fluorescente in vettori di espressione	5
Purificazione e standardizzazione di protocolli di espressione della proteina fluorescente	7
Conclusioni	10
Bibliografia	11

# **Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata***

## **Introduzione**

L'espressione di geni eterologhi in *Escherichia coli* rappresenta uno dei metodi più veloci, semplici ed economici per la produzione di ampie quantità di proteine target. Tuttavia, meccanismi di folding e le modifiche post traduzionali inducono a volte un non corretto ripiegamento delle proteine nella conformazione nativa, con successiva aggregazione in quelli che vengono definiti corpi di inclusione<sup>1,2</sup>. Poiché, l'isolamento di proteine target dai corpi di inclusione richiede la realizzazione di protocolli di denaturazione/rinaturazione, la strategia nell'ottica di ridurre tempi e costi è quella di selezionare procedure che ottimizzino la produzione di tali proteine in forma solubile nel citoplasma<sup>3</sup>. Diviene quindi strategica: la selezione del ceppo ospite, la temperatura di crescita, l'eventuale co-espressione di chaperoni molecolari, l'impiego di modifiche a carico delle proteine, ecc<sup>1,3-5</sup>.

Nel nostro caso, l'attenzione è stata focalizzata su una Green Fluorescent Protein (GFP) di 228 aa estratta da *Anemonia sulcata*, contenente un fluoroforo composto da tre amminoacidi Gln<sup>63</sup>, Tyr<sup>64</sup>, Gly<sup>65</sup> all'interno di una struttura a barile. Il corretto folding della proteina era correlato strettamente alla funzionalità del fluoroforo. Il nostro obiettivo è stato quello, quindi, di ottimizzare il processo di biosintesi della GFP espressa in *E. coli*, ovviando alla formazione di corpi di inclusione contenenti la proteina (non funzionale), definendo e standardizzando inoltre, le condizioni che consentivano di produrre la più alta percentuale di GFP correttamente ripiegata (in condizioni non denaturanti) e quindi funzionale.

## **Disegno sperimentale**

Il processo di biosintesi della GFP ha previsto una fase di clonaggio e una di sintesi della proteina fluorescente, articolate in diverse sotto-attività, ovvero:

- Isolamento mRNA proteina fluorescente: estrazione dell'RNA da *A. sulcata*, isolamento del mRNA, purificazione e retrotrascrizione, costruzione cDNA;
- Clonazione della proteina fluorescente in vettori di espressione;
- Purificazione e standardizzazione di protocolli di espressione della proteina fluorescente.

Tali sotto-attività sono schematizzate in figura 1.

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

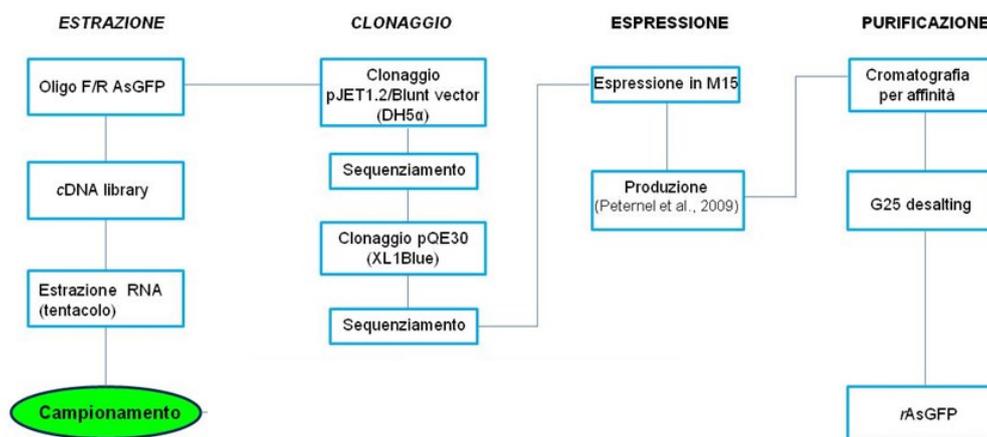


Fig. 1 – Piano delle attività sperimentali.

### Isolamento mRNA proteina fluorescente

In seguito al campionamento di *A. sulcata* lungo la costa siciliana, si è proceduto al processamento dell'organismo. Separata e selezionata la porzione tentacolare, si è dismembrato il tessuto per procedere all'estrazione dell'RNA totale in TRIzol (Invitrogen).

Quindi, tramite Superscript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase con Oligo-d(T) Kit (Invitrogen) si è costruita una libreria di cDNA sulla quale si è fatto uno screening per la regione codificante la proteina di interesse asFP499 (GenBank: AAN52735.1) usando la Pure Taq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare Life Sciences, UK) e lo specifico forward (5'-cgGGATCCATGTATCCTTCCATCAAG-3') e reverse (3'-gcGGATCCTCAGTTATGTCCTAATTTTCG-5') primers (dove le lettere sottolineate indicano il sito per l'enzima di restrizione BamH 1 introdotto per il clonaggio nel vettore di espressione; le lettere minuscole indicano i nucleotidi introdotti per migliorare il riconoscimento degli enzimi di restrizione; in grassetto sono invece indicati i codoni di inizio e fine) (Fig. 2).

La banda di DNA su gel di agarosio ha mostrato una dimensione di 687 bp (Fig. 3). Come controllo, si è incubato il DNA ottenuto per 1h a 37° con Hind III, per il quale è presente un sito di taglio a 550 bp (Fig. 4 A, B). Si è quindi proceduto alla elettro-eluzione della banda del DNA su gel e all'estrazione con cloroformio. Il DNA è stato fatto precipitare con ammonio acetato ed etanolo e quindi digerito con BamH 1 al fine di creare le estremità complementari al vettore di espressione.

# Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

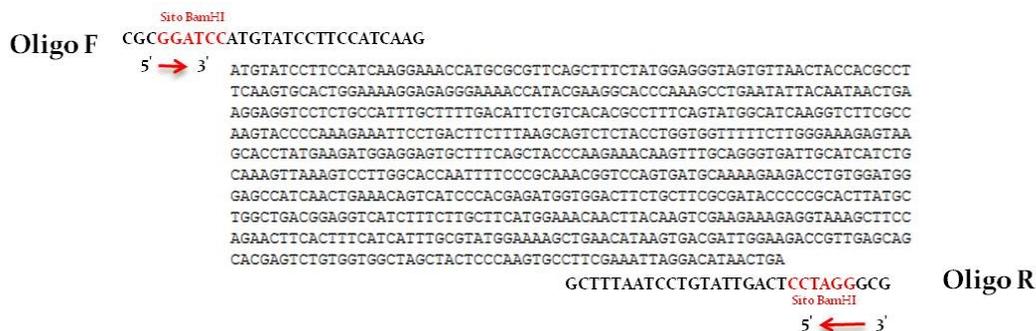


Fig.2 – Sequenza nucleotidica della regione codificante per la proteina asFP499 (GenBank: AAN52735.1)

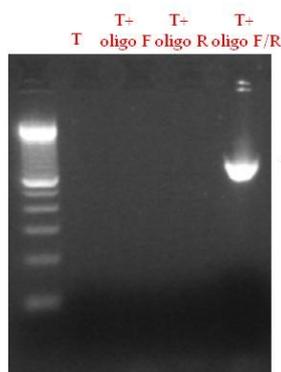


Fig.3 – Banda di DNA di 687 bp ottenuta attraverso PCR con oligo F/R specifici. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, line 2: template; line 3: template con oligo F; line 4: template con oligo R; line 5: template con oligo F/R.

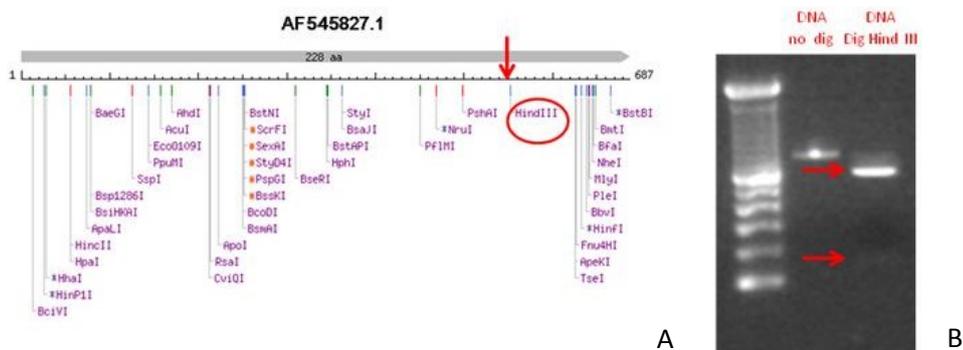


Fig.4 – A) Siti di restrizione per asFP499; B) Prova di digestione sul DNA isolato con Hind III. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, line 2: DNA non digerito, line 3: DNA digerito Hind III (le frecce indicano i frammenti ottenuti in seguito a digestione).

## **Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata***

### **Clonazione della proteina fluorescente in vettori di espressione**

La sequenza codificante per la proteina di interesse è stata inserita nel vettore di clonaggio pJET1.2/Blunt tramite Ligase usando il CloneJet PCR Cloning Kit (FERMENTAS). Si è quindi proceduto alla trasformazione in cellule competenti di *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Le piastre dopo essere state incubate a 37° over night in presenza di X Gal e IPTG e successivamente analizzate attraverso PCR colony usando gli oligo F/R per pJET1.2. La dimensione attesa dei cloni (800bp) è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio (Fig. 5 A). I cloni positivi, come ulteriore controllo, sono stati digeriti con Hind III e le dimensioni dei frammenti ottenuti determinati su gel di agarosio (Fig. 5 B). I cloni delle dimensioni attese sono stati purificati mediante elettroeluzione su gel di agarosio, quindi il DNA è stato estratto ed in seguito precipitato in etanolo. Successivamente, si è proceduto con il sequenziamento dei cloni ottenuti. Dall'analisi in silico delle sequenze è emersa una omologia del 99% rispetto alla sequenza della proteina presente su GenBank: AAN52735.1. E' stato quindi selezionato il clone sequenziato e digerito con Bam H1. Il DNA è stato pertanto clonato nel vettore di espressione pQE30 (QIAGEN) preliminarmente linearizzato con BamH 1 e successivamente defosforilato tramite fosfatasi alcalina. La reazione di ligase è stata trasformata in cellule DH5 $\alpha$  e le colonie cresciute dopo 24h a 37 °C sono state analizzate attraverso PCR con gli specifici oligo F/R per pQE30 (Fig. 6 A). La dimensione attesa dei ricombinanti era di 942 bp, ma dopo digestione con Hind III si è osservato come quest'ultimi avessero un errato orientamento (Fig. 6 B). Il basso numero di colonie ottenute e l'errato orientamento lasciavano supporre come la proteina probabilmente risultasse tossica per quel ceppo batterico. Si è allora modificato il protocollo di trasformazione usando le cellule XL 1Blue. In questo caso la digestione con BamH 1 e Hind III ha evidenziato la presenza di un ricombinante con corretto orientamento (Fig. 7). Il DNA di quest'ultimo è stato estratto e sequenziato. Dall'analisi in silico della sequenza è emersa una omologia del 99% rispetto alla sequenza della proteina presente su GenBank: AAN52735.1. Tale campione è stato quindi selezionato per la messa a punto dei protocolli di espressione e purificazione.

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

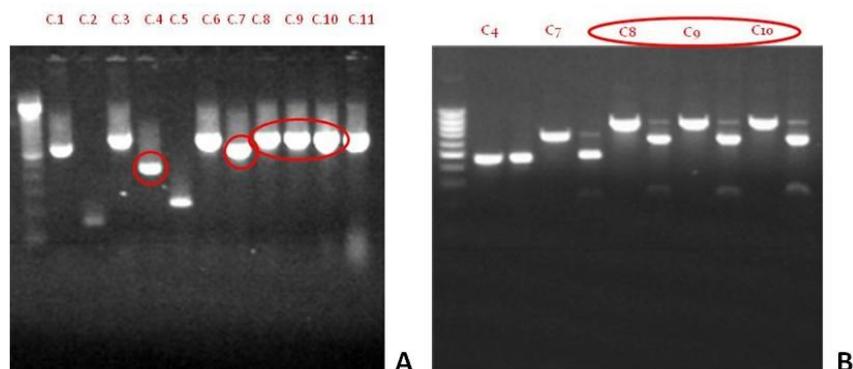


Fig.5 – A) PCR colony sui cloni ottenuti da cellule DH5 $\alpha$  e vettore pJET1.2/Blunt. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2 : DNA clone1; line 3: DNA clone 2; line 4: DNA clone 3; line 5: DNA clone 4; line 6: DNA clone 5; line 7: DNA clone 6; line 8: DNA clone 7; line 9: DNA clone 8; line 10: DNA clone 9; line 11: DNA clone 10; line 12: DNA clone 11. Le aree marcate in rosso identificano i cloni selezionati per la digestione. B) Digestione dei cloni con Hind III. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2 : DNA clone 4; line 3: DNA clone 4 digerito; line 4: DNA clone7; line 5: DNA clone 7 digerito; line 6: DNA clone 8; line 7: DNA clone 8 digerito; line 8: DNA clone 9; line 9: DNA clone 9 digerito; line 10: DNA clone 10; line 11: DNA clone 10 digerito. Le aree marcate in rosso identificano i corretti ricombinanti.

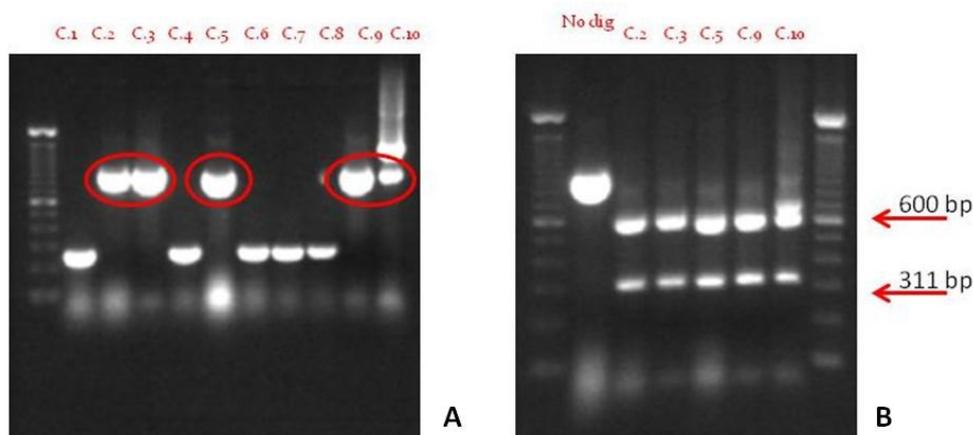


Fig.6 – A) PCR colony sui cloni ottenuti da cellule DH5 $\alpha$  e vettore pQE30. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2 : DNA clone1; line 3: DNA clone 2; line 4: DNA clone 3; line 5: DNA clone 4; line 6: DNA clone 5; line 7: DNA clone 6; line 8: DNA clone 7; line 9: DNA clone 8; line 10: DNA clone 9; line 11: DNA clone 10. Le aree marcate in rosso identificano i cloni selezionati per la digestione. B) Digestione dei cloni con Hind III. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2 : DNA clone non digerito; line 3: DNA clone 2 digerito; line 4: DNA clone 3 digerito; line 5: DNA clone 5 digerito; line 6: DNA clone 9 digerito; line 7: DNA clone 10 digerito, line8: GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Le frecce marcate in rosso identificano la dimensione dei frammenti ottenuti in seguito a digestione.

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

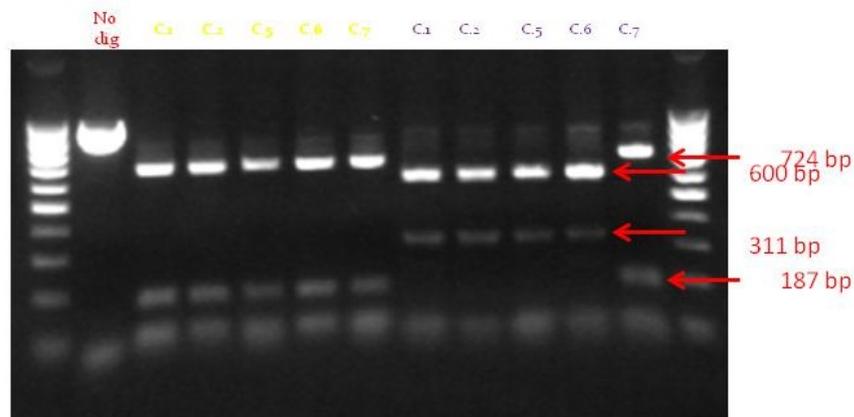


Fig. 7 – Prova di digestione con BamH 1 (in giallo) e Hind III (in blue) dei ricombinanti ottenuti dopo trasformazione con XL 1 Blue. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2: DNA clone non digerito; line 3: DNA clone 1 digerito Bam H1; line 4: DNA clone 2 digerito Bam H1; line 5: DNA clone 5 digerito Bam H1; line 6: DNA clone 6 digerito Bam H1; line 7: DNA clone 7 digerito Bam H1; line 8: DNA clone 1 digerito Hind III; line 9: DNA clone 2 digerito Hind III; line 10: DNA clone 5 digerito Hind III; line 11: DNA clone 6 digerito Hind III; line 12: DNA clone 7 digerito Hind III; line 13: GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Le frecce marcate in rosso identificano la dimensione dei frammenti ottenuti in seguito a digestione con Hind III, nello specifico 600 bp e 311 bp per i ricombinanti con errato orientamento e 724 bp e 187 bp per l'unico con corretto orientamento.

### Purificazione e standardizzazione di protocolli di espressione della proteina fluorescente

Il clone ricombinante selezionato è stato usato per la trasformazione in cellule competenti M15 e XL 1 Blue. Inoltre una delle colonie ottenute dalla trasformazione del DNA plasmidico è stata usata per la messa a punto del protocollo di espressione e purificazione. Dall'inoculo della colonia ricombinante fatta crescere a 37 °C, in seguito a diluizione si è effettuata una pre-induzione di 2h e a seguire una induzione di 2 h a 37 °C e 220 rpm, aggiungendo LB medium, ampicillina e IPTG 0.5 mM. Il pellet ottenuto in seguito a centrifugazione, è stato risospeso in Start buffer a (TRIS 10mM pH 8, NaCl 150mM, Imidazolo 10 mM) e sonicato (6 cicli di 30 s intervallati da 30 s di pausa per ogni ciclo) usando il Bandelin Sonoplus Ultrasonic homogenizer HD 2070 (Berlin). Le cellule non sonicate ed i detriti sono stati eliminati tramite centrifugazione (e conservate per verificare la presenza della proteina nei corpi di inclusione) e il sovrantante usato per la successiva analisi. Quest'ultimo, ipoteticamente contenente la proteina prodotta in forma ricombinante con un *tag* di 6 istidine all'estremità N terminale, è stato filtrato con filtri sterili da 5 µm (Corning Life Sciences) e usato per la messa a punto del protocollo di purificazione.

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

La purificazione è stata effettuata attraverso cromatografia per affinità sfruttando appunto l'affinità del nichel per i residui di istidina della proteina prodotta. Essa è stata condotta usando un gradiente di imidazolo (50-500 mM) come competitore. Le frazioni recuperate sono state analizzate mediante elettroforesi su SDS-PAGE (10%), ma nessuna delle suddette frazioni sembrava contenere la GFP. Quindi l'attenzione si è spostata sul pellet precedentemente ottenuto, in quanto probabilmente la proteina si era aggregata nei corpi di inclusione. Si è quindi proceduto a sospendere il pellet in Start buffer Urea (TRIS 10mM pH 8, NaCl 150mM, Imidazolo 10 mM, UREA 6M ) e come descritto precedentemente, sonicato, centrifugato e filtrato. Le frazioni recuperate dalla separazione cromatografica tramite colonna His-Trap, mostravano su 10% SDS-PAGE la presenza della proteina in elevate quantità (Fig. 8). Trovandosi tuttavia in condizioni denaturate, la GFP non mostrava attività di fluorescenza. Si rendeva così necessaria, la messa a punto di un processo di refolding *ad hoc* fondamentale oltre che per la struttura della proteina in sé ma anche per l'innescò del meccanismo di formazione e maturazione del cromoforo. Tuttavia, nonostante i differenti protocolli di refolding testati<sup>6</sup> la proteina ricombinante prodotta non rinaturava né il cromoforo risultava funzionale.

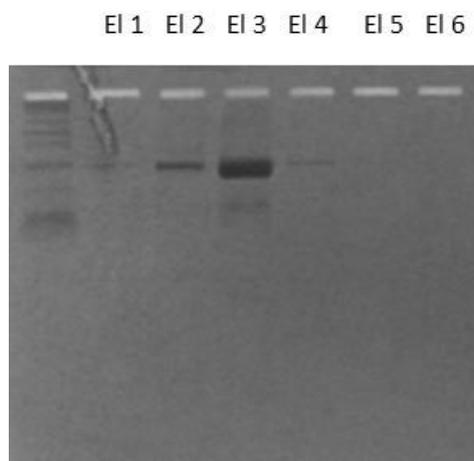


Fig. 8 – SDS-PAGE in condizioni riducenti: *Line 1*: Molecular Weight Marker (3.5 – 260 KDa); *Line 2*: El 1 (1<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo); *Line 3*: El 2 (2<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo); *Line 4*: El 3 (3<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo); *Line 5*: El 4 (4<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo); *Line 6*: El 5 (5<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo); *Line 7*: El 6 (6<sup>a</sup> frazione da 1ml eluita con 500 mM imidazolo).

A questo punto si è deciso di utilizzare un nuovo protocollo di biosintesi, il quale prevedeva l'abbassamento della temperatura di crescita del ceppo batterico, al fine di aumentare la produzione

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

di biomassa finale e rallentare il metabolismo batterico, consentendo inoltre l'aumento della percentuale di GFP prodotta nella forma correttamente ripiegata.

Il ricombinante selezionato, è stato quindi usato per la trasformazione in cellule competenti M15 e una delle colonie cresciute, usata per l'avvio del processo di espressione e purificazione. L'inoculo è stato incubato per 16 h a 25 °C e 160 rpm, quindi si è effettuata un'induzione per 48 h alla stessa temperatura, aggiungendo LB medium (1:20), ampicillina e IPTG 0.4 mM. Il pellet fluorescente, ottenuto in seguito a centrifugazione (Fig. 9 A), è stato risospeso in 1X fosfato buffer (PB) pH 7.4, 0.5 M NaCl and 10 mM imidazolo e sonicato come precedentemente descritto. In seguito a centrifugazione, il sovrinatante è stato filtrato con filtri sterili da 5 µm e usato per la messa a punto del protocollo di purificazione. Sfruttando anche in tal caso l'affinità del nichel per i residui di istidina della proteina prodotta, si è proceduto alla raccolta delle frazioni tramite l'uso di un gradiente di imidazolo (50-500 mM). Le frazioni recuperate sono state analizzate attraverso SDS-PAGE (10%), e le aliquote contenenti la proteina di interesse caricate su una colonna G25 desalting (GE Healthcare) per consentire la modifica del buffer in 20 mM MES pH 7 (Fig. 9 B). L'analisi della sequenza della proteina, prodotta utilizzando l'algoritmo BLAST ha mostrato un certo grado di omologia con sequenze di altre GFP . Nello specifico, ha evidenziato un 98% di identità con la proteina asFP499 (GenBank: AAG412051) dove solo un aminoacido risultava sostituito (Thr-108 to Ala-108) e comunque lontano dal cromoforo e non coinvolto in alcun meccanismo funzionale legato alla fluorescenza (Fig. 10 A). Dopo la purificazione, su 10% SDS-PAGE e colorazione con Coomassie brilliant blue era visibile una singola banda di circa 24 kDa (Fig. 10 B).

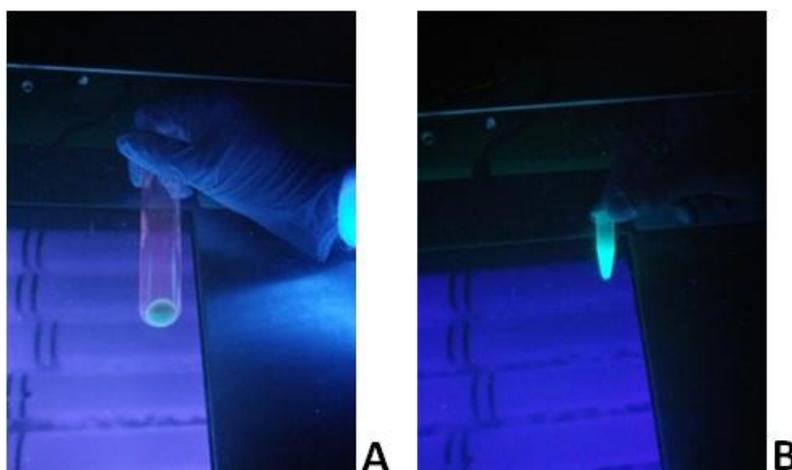


Fig. 9 – A) Pellet ottenuto dopo centrifugazione dell'indotto. B) Frazione della proteina fluorescente raccolta dopo cromatografia per affinità ed esclusione molecolare.

## Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata*

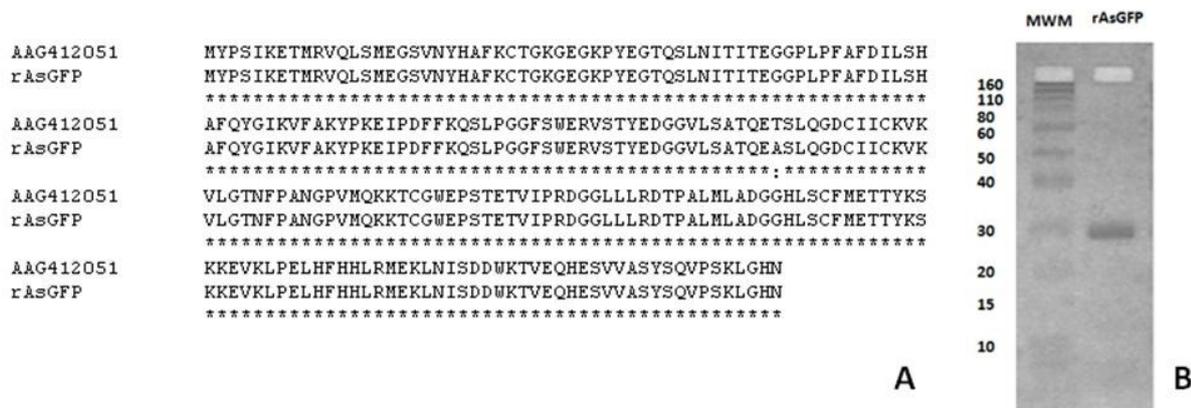


Figure 10. Caratterizzazione della proteina ricombinante: A) allineamento di sequenza (ClustalW) tra la asFP499 (GenBank: AAG412051) e la proteina ricombinante prodotta; B) SDS-PAGE in condizioni riducenti: *Line 1*: Molecular Weight Marker (3.5 – 260 KDa); *Line 2*: proteina ricombinante prodotta (rAsGFP).

### Conclusioni

Il presente protocollo di biosintesi ha consentito di creare una metodica standardizzata di induzione e purificazione della GFP ricombinante da *A. sulcata* in *E.coli*. Infatti, come descritto, diversi esperimenti preliminarmente condotti avevano evidenziato come fossero necessarie determinate condizioni nella fase di induzione per ottenere la proteina fluorescente con il corretto folding e con il cromoforo attivo. L'induzione a 37° difatti causava il mancato folding della proteina e come conseguenza il non funzionamento del cromoforo, oltre che la localizzazione della stessa nei corpi di inclusione del batterio.

Il protocollo standardizzato che è stato eseguito abbassando la temperatura di crescita del ceppo batterico nonché il metabolismo ed usando tempi di crescita più lunghi al fine di rendere possibile il meccanismo di folding e di maturazione del cromoforo (con completa ossidazione), ha permesso quindi la preparazione (in condizioni non denaturanti) di grosse quantità di proteina ricombinante (0.5 mg/L) in forma pura (> 90%) e fluorescente da utilizzare per futuri saggi biologici e funzionali.

## **Rapporto tecnico sulla ottimizzazione del processo di biosintesi di una Green Fluorescent Protein ricombinante estratta da *A. sulcata***

### **Bibliografia**

1. Baneyx, F., Mujacic, M. 2004 - *Nat. Biotechnol.*, 22, 1399–1408.
2. Swietnicki, W. 2006 - *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 367–372.
3. Peternel, S, Porekar, V.G., Komel, R. 2009 – *Acta Chim. Slov.*, 56, 860-867
5. Sorensen, H. P., Mortensen, K. K. 2005 - *Microb.Cell Fact.*, 4, 1.
6. De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., De Marco, A., 2004 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 766–771.
7. Reid, B., Flynn, G. C. 1997 - *Biochemistry*, 36 (22), 6786–6791.