

CHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE: due facce della stessa medaglia – Parte I¹

“Se volete conoscere l’ingegneria genetica, dovete essere pronti a spendere anni studiando la chimica e la biologia. Nulla di prezioso arriva senza impegno.”

ALESSANDRA BARBIN*

(Kary Mullis)

Premessa

In genere la prassi seguita per il tirocinio didattico attivo nelle SSIS consiste nell’affidare alla/o specializzanda/o un tema da sviluppare sul piano teorico-sperimentale e su questo progettare un percorso didattico significativo raccordandolo il più possibile al curriculum programmato dal docente accogliente (tutor). Nel momento del suo sviluppo ritenuto più opportuno la/lo specializzanda/o lo propone agli allievi della classe per cui è stato progettato e successivamente fa un bilancio critico dell’esperienza complessiva. Il lavoro che viene presentato propone una modalità di effettuazione del tirocinio didattico inusuale in cui, cioè, la specializzanda, insieme agli allievi di una classe del docente accogliente (tutor), una IV Liceo scientifico, ha seguito un percorso messo a punto dall’Università e realizzato fuori della classe, in un laboratorio di biologia molecolare (LLC di Bologna). E’ su questo che si sono articolate le varie attività sia preparatorie, sia di riflessione proposta alla classe successivamente all’esperienza. Quello che qui presentiamo è il primo di tre contributi di cui consta questo lavoro.

Fabio Olmi

Riassunto

Un processo di apprendimento efficace si struttura a partire dall’osservazione e dall’esperienza diretta dei fenomeni indagati. Dare fondamento teorico a tale esperienza è il passaggio successivo e questo non può prescindere dal riferimento e dalla conseguente costruzione di un sapere il più possibile unitario. La ricerca di percorsi trasversali si pone quindi come momento indispensabile nella programmazione e nella realizzazione di qualsiasi proposta didattica.

È a partire da questo presupposto che ha preso avvio il progetto educativo di seguito presentato, finalizzato alla ricerca di un percorso interdisciplinare che collegasse argomenti di chimica e biologia molecolare, principalmente allo scopo di dimostrare che la conoscenza della prima è indispensabile per comprendere e interpretare i fenomeni della seconda.

Abstract

A process of effective learning starts from the observation and the direct experience of phenomena under investigation. Then we give a rationale basis to this experience that must consider all knowledgeable elements as a unified whole. The interdisciplinary research process is therefore one of the most important ways to program and to realize the didactic proposal.

Starting from this point we began our educational experiment herein described. This experiment delineates an interdisciplinary method by means of which subjects such as chemistry and molecular biology are linked, so that the former is indispensable to understand and to interpret the phenomena of the latter.

Introduzione

Nel presente lavoro, costituito da una serie di tre contributi, si è inteso descrivere un percorso didattico realizzato con una classe quarta “tradizionale” del Liceo Scientifico Statale ‘A. Righi’ di Bologna.

Il progetto è stato costruito a partire dalla partecipazione degli studenti a un percorso formativo, della durata di due giorni, tenutosi nella sede del *Life Learning Center* (LLC) di Bologna. Questa struttura, nata nel 2000 dalla collaborazione tra Università, Provveditorato agli Studi e Fondazione “Marino Golinelli”, ha lo scopo di avvicinare i giovani alle scienze della Vita.

Le attività svolte hanno avuto la presente scansione:

- una fase preparatoria preliminare curata dall’insegnante in classe
- lo *stage* presso il LLC che ha visto il singolo studente protagonista del proprio apprendimento teorico-pratico in quanto chiamato a operare manualmente nell’effettuazione di semplici esperimenti di biologia molecolare
- un successivo lavoro di gruppo in classe con la finalità di riflettere sulle attività svolte e di organizzare in una relazione i dati, le osservazioni e i risultati raggiunti
- una serie di lezioni di approfondimento di cui questo e i successivi articoli sono la descrizione.

¹ Il lavoro è tratto da una tesi di specializzazione svolta nell’ambito della SSIS-Bologna, indirizzo Scienze Naturali, classe A060: “La chimica di base per comprendere la struttura e le proprietà di molecole complesse: le proteine” di Alessandra Barbin, a.a. 2003/2004.

Preme qui ricordare che una delle idee guida del presente lavoro è stata la ricerca di percorsi trasversali che collegassero argomenti di chimica e biologia, principalmente allo scopo di dimostrare che la conoscenza della prima è indispensabile per comprendere e interpretare i fenomeni della seconda (Kary Mullis, 2004), al di là della pura descrizione degli stessi. Si ritiene, infatti, che questo modo di procedere possa costituire un valido incentivo verso lo studio della chimica, nei confronti della quale spesso gli studenti nutrono diffidenza se non veri e propri pregiudizi.

In questo primo contributo vengono descritti gli esperimenti che hanno consentito di biosintetizzare la proteina verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) e, successivamente, di isolarla e purificarla mediante procedimenti chimico-fisici.

Premessa metodologico-didattica

Come già accennato, il presente lavoro nasce in seguito all'esperienza condotta dagli studenti della IV A nel laboratorio di biologia molecolare del LLC.

Gli intenti che ne stanno alla base sono molteplici:

a) dare fondamento teorico alle operazioni pratiche di laboratorio in modo da collegare i fatti osservati con i prerequisiti di conoscenza e con quanto appreso al momento dell'esperienza;

b) elaborare, soprattutto in riferimento alla proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*), un percorso trasversale di collegamento tra biologia e chimica, quest'ultima intesa e presentata agli studenti come strumento indispensabile per l'interpretazione corretta dei fenomeni esaminati;

c) educare alla razionalità in un campo quale è quello degli OGM (Organismi Geneticamente Modificati) ove sono frequenti le mistificazioni e le forzature ideologiche, indicando agli studenti come si possa agire e ragionare anche in un settore così complesso della biologia secondo il metodo scientifico, togliendo quell'alone di magico e misterioso, a volte persino angustiante, che il grande pubblico associa a tutto ciò che non riesce a razionalizzare.

Lo scopo specifico dell'autrice del presente lavoro è stato quello di descrivere in modo analitico le esperienze effettuate dagli studenti durante lo *stage* al LLC² che hanno avuto per oggetto:

- 1) Trasformazione batterica
- 2) Purificazione della proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*)
- 3) DNA fingerprinting

Il progetto didattico si è sviluppato a partire dall'analisi dei primi due di questi esperimenti, per i quali si riportano di seguito le schede illustrative delle attività svolte dagli studenti in laboratorio.

SCHEDA 1

Trasformazione batterica

Materiali e strumenti

- . Provette eppendorf
- . Micropipette da 10, 100 e 1000 μ l
- . Cellule batteriche competenti: *E. coli* K-12 ceppo HB101
- . Plasmide pGLO
- . Soluzione di trasformazione (TS) costituita da CaCl_2
- . Bagno termostato a 42 °C
- . Incubatore a 37 °C
- . Terreno di coltura liquido Luria-Bertani (LB)
- . Terreni di coltura agarizzati :
LB (LB)
LB + ampicillina (LB/amp)
LB + ampicillina + arabinosio (LB/amp/ara)
- . Piastre Petri suddivise in quattro settori
- . Transilluminatore o lampada UV

Tappe dell'esecuzione

- Contrassegnare due provette eppendorf con i simboli + e - (rispettivamente campione "effettivo" e campione di controllo)
- Aggiungere in entrambe le provette eppendorf contrassegnate la sospensione acquosa in CaCl_2 di cellule batteriche competenti e porle in ghiaccio.
- Solo all'interno dell'eppendorf + aggiungere la soluzione contenente il plasmide pGLO e rimettere in bagno di ghiaccio.
- Attendere 10 minuti.
- Effettuare il passaggio di shock termico: trasferire velocemente entrambe le eppendorf dal ghiaccio al bagno termostato, precedentemente tarato e portato a 42 °C, ove devono rimanere per 90 secondi. Questo trattamento permette al plasmide pGLO di attraversare la membrana cellulare e di entrare nei batteri. Rimettere quindi le eppendorf nel bagno di ghiaccio per 2 minuti.
- Aggiungere il brodo di coltura LB in entrambe le eppendorf e porle per 30 minuti in incubatore. Questo passaggio consente di aumentare il numero complessivo di batteri contenuti nelle due provette.
- Seminare il contenuto delle due eppendorf nei quattro settori [I(-), II(-), III(+), IV(+)] in cui è suddivisa la piastra Petri, contenenti, rispettivamente, i terreni selettivi LB, LB/amp, LB/amp, LB/amp/ara.
- Attendere che il liquido distribuito sull'agar della piastra sia assorbito, quindi porre quest'ultima in incubatore a 37 °C per l'intera notte.
- La mattina seguente osservare la piastra Petri al transilluminatore.

² Per informazioni in merito si consulti il sito internet ufficiale del Life Learning Center: <http://www.llc.it>

SCHEDA 2

Purificazione della GFP

Materiali e strumenti

- Provette eppendorf
- Micropipette da 10, 100 e 1000 μ l
- Batteri *E. coli* K-12 ceppo HB101 trasformati con il plasmide pGLO
- Lisozima
- Vortex
- Incubatore a 37 °C
- Centrifuga da banco
- Colonna cromatografica
- Resina ad interazione idrofobica
- Tampone di interazione (TI: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M), soluzione ad altissima concentrazione salina
- Soluzione di equilibratura (SE: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M), soluzione ad alta concentrazione salina
- Tampone di lavaggio (TL: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 M), soluzione a media concentrazione salina
- Tampone di eluizione (TE: Tris + EDTA 0,1 M), soluzione a bassissima concentrazione salina
- Supporto multi-eppendorf
- Transilluminatore o lampada UV

Tappe dell'esecuzione

- Mediante l'uso del vortex risospendere le cellule batteriche, precedentemente trasformate e concentrate, nella soluzione TE.
- Aggiungere sul fondo della provetta eppendorf contenente i batteri risospesi l'enzima lisozima che comincerà subito a digerire le pareti cellulari batteriche.
- Agitare gentilmente la provetta al fine di distribuire uniformemente l'enzima in tutto il volume della sospensione.
- Porre l'eppendorf nell'incubatore a 37 °C per 10 minuti in modo da consentire al lisozima di agire.
- Centrifugare la provetta.
- Equilibrare la colonna cromatografica precedentemente impaccata con resina di silice introducendo in essa la soluzione SE e facendola correre lungo la parete della colonna per non perturbare la superficie della resina; quindi togliere il tappo di chiusura della colonna e fare eluire il liquido di mantenimento della resina in una provetta di scarto.
- Al termine della centrifugazione il surnatante contenente in soluzione la proteina GFP (facendo attenzione a non asportare frammenti di pellet) e trasferirlo in un'eppendorf, precedentemente contrassegnata con la sigla TI, recante un pari volume di questa soluzione.
- Prelevare dall'eppendorf TI, dopo averla agitata delicatamente, la soluzione contenuta (tampone di interazione + surnatante) e versarla nella colonna con la stessa metodica descritta sopra.
- Filtrare questo volume all'interno della matrice cromatografica e raccogliere l'eluato nella provetta di scarto. In questo passaggio le proteine con caratteristiche superficiali idrofobiche, tra cui la GFP, si fissano alla resina grazie all'instaurarsi di interazioni idrofobiche, mentre quelle con proprietà idrofiliche eluiscono fuori dalla colonna stessa.
- Prelevare un'adeguata quantità di TL, caricarlo in colonna e far fluire l'intero volume all'interno della matrice raccogliendo l'eluato nella provetta di scarto. Questo passaggio ha la funzione di "lavare via" dalla resina le proteine debolmente idrofobiche, ma non la GFP che, rimanendo legata alla resina, risulta in tal modo purificata.
- Trasferire la colonna cromatografica nel supporto multi-eppendorf.
- Prelevare un sufficiente volume di TE e introdurlo all'interno della colonna con la metodica già utilizzata.
- Filtrare l'intero volume di TE e, contemporaneamente, far cadere in successione 1 sola goccia di eluato in ciascuna delle 8 eppendorf presenti nel supporto multi-eppendorf; l'eventuale eluato in eccesso viene raccolto nell'ultima eppendorf.
- Esaminare i sottocampioni alla lampada UV o al transilluminatore.

Tuttavia, non è stata qui presa in considerazione la terza esperienza, poiché non collegata direttamente al percorso svolto, sebbene la classe abbia comunque manifestato un elevato interesse in merito alle procedure di analisi del DNA sia in ambito forense sia nella terapia genica: argomenti di estrema attualità oltre che di grande interesse

etico-sociale.

Tutte e tre le esperienze, peraltro effettuate a fini puramente didattici, hanno avuto lo scopo di mostrare ai ragazzi le conoscenze e le competenze, sia disciplinari sia pratiche, che sono alla base delle metodiche utilizzate, mettendone in risalto gli aspetti biochimici e tecnologici.

1) Trasformazione batterica

a) Realizzazione dell'esperienza

L'obiettivo dell'esperienza è stato quello di effettuare una trasformazione batterica² di *Escherichia coli* mediante il plasmide ricombinante pGLO.

I batteri *E. coli* utilizzati nell'esperimento appartenevano al ceppo mutante innocuo *K12*, che, oltre ad essere privo di plasmidi endogeni, non presenta i recettori di membrana specifici per avviare il processo di trasformazione. In primo luogo, è stato quindi necessario rendere competenti i batteri in questione mediante esposizione ad una soluzione di CaCl_2 .

Anche se il meccanismo d'azione del cloruro di calcio è tuttora poco noto, recentemente alcuni studiosi hanno ipotizzato una sua azione diretta sui canali del calcio. Queste proteine transmembrana, posizionate a livello della membrana plasmatica del batterio, in presenza di CaCl_2 sarebbero indotte ad aprirsi: la loro specifica funzione è infatti quella di trasferire gli ioni Ca^{2+} all'interno della cellula. Nel caso della trasformazione batterica questi canali verrebbero invece sfruttati come "aperture" transmembrana atte a consentire al plasmide di entrare nel batterio, trasformandolo. Il meccanismo di trasporto del plasmide attraverso il canale è anch'esso sconosciuto: si può trattare di un simporto Ca^{2+} -plasmide (di carica superficiale negativa), di un antiporto plasmide-ione negativo (ad esempio Cl^-) o di un altro meccanismo ancora.

Poiché a temperatura ambiente tali canali tenderebbero a richiudersi velocemente, riducendo così la competenza della cellula, i batteri sono stati rapidamente congelati alla temperatura di -80°C . A questa temperatura, infatti, le proteine canale aperte rimangono tali poiché il metabolismo batterico risulta bloccato in modo pressochè totale, consentendo tra l'altro al batterio di entrare in uno stato vitale latente.

In realtà, questa prima parte dell'esperimento è stata svolta dal personale tecnico del LLC che ha quindi fornito ai ragazzi una sospensione acquosa congelata di cloruro di calcio contenente cellule di *E. coli* già rese competenti. Il passaggio successivo ha visto l'aggiunta del DNA plasmidico ricombinante (plasmide pGLO: Figura 1, Scheda 3) alla sospensione batterica data. Questo presenta 4 sequenze geniche importanti:

- l'origine di replicazione (*ori*),
- un gene (*bla*) codificante per una proteina (beta lattamasi) che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina,
- un gene regolatore (*araC*) che codifica per una proteina (proteina C) repressore della trascrizione,
- un gene strutturale esogeno (*GFP*) codificante per la proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*), isolata dalla medusa tropicale *Aequorea victoria*.

Al fine di fare oltrepassare al plasmide la membrana plasmatica di *E. coli* si è reso inoltre indispensabile sottoporre i batteri a shock termico. Tale procedura ha permesso di aumentare la permeabilità della membrana della cellula batterica e quindi la probabilità d'introduzione del DNA plasmidico.

Considerando che *E. coli* è in grado di duplicarsi ogni 20 minuti circa e che durante lo shock termico una percentuale non trascurabile di batteri è deceduta, questi sono stati posti in cella termostatica a 37°C al fine di raddoppiarne il numero. Poiché il processo di duplicazione è energeticamente molto costoso, è stato necessario som-

ministrare ai batteri tale energia sotto forma di "cibo" (brodo di coltura): quest'ultimo fornisce infatti una miscela di carboidrati, amminoacidi, nucleotidi, sali minerali e vitamine indispensabili per la crescita batterica. Inoltre, il periodo di incubazione ha consentito alle cellule trasformate di esprimere la proteina della resistenza all'ampicillina, la cui sintesi costituisce l'unica possibilità di sopravvivenza su terreno selettivo. Così, potendo contare su un maggior numero di batteri, e in particolar modo di quelli trasformati, sono state aumentate le probabilità di formazione di colonie nella successiva fase di semina nelle piastre Petri. Le piastre Petri utilizzate erano suddivise in quattro settori distinti. Ciascuno di essi presentava il medesimo supporto solido di agar; a variare erano invece le sostanze aggiunte all'agar stesso:

settore I → solo brodo di coltura (LB, dalle iniziali degli scienziati Luria e Bertani)

settore II → brodo di coltura + antibiotico ampicillina

settore III → brodo di coltura + antibiotico ampicillina

settore IV → brodo di coltura + antibiotico ampicillina + zucchero arabinosio

Il brodo di coltura è presente in tutti i settori poiché, come già detto, fornisce i nutrienti indispensabili per la crescita batterica.

b) Risultati

Nei settori I e II sono stati seminati i batteri non trasformati (-) o di controllo, mentre nei settori III e IV sono state seminate le cellule batteriche sottoposte a trasformazione (+) in seguito all'aggiunta del plasmide. Mentre la presenza dell'antibiotico ampicillina ha consentito di selezionare le cellule trasformate con il DNA plasmidico da quelle non trasformate, la presenza dello zucchero arabinosio ha permesso di distinguere, tra i batteri trasformati, quelli che avevano sintetizzato la proteina verde fluorescente GFP. Infatti, l'aspetto fenotipico osservabile in seguito alla trasformazione consiste nell'emissione di una luce verde fluorescente da parte delle colonie di cellule batteriche trasformate quando queste vengono sottoposte a radiazioni UV.

La successiva incubazione per tutta la notte a 37°C delle piastre seminate ha consentito ai batteri di duplicarsi in grande quantità nelle condizioni ambientali ottimali.

La verifica dell'avvenuta trasformazione è stata effettuata la mattina successiva. Le cellule batteriche trasformate (+) seminate nei settori III e IV, contenenti i substrati selettivi LB/amp e LB/amp/ara, hanno mostrato una crescita cellulare evidente (formazione di colonie) a conferma del fatto che solo l'acquisizione del plasmide pGLO permette loro di resistere all'azione battericida dell'antibiotico ampicillina presente nel mezzo di coltura, consentendone di conseguenza la proliferazione. Inoltre, riprova dell'incorporazione del plasmide è stata data anche dall'osservazione al transilluminatore delle colonie del settore IV. Solo queste, infatti, grazie proprio all'internalizzazione del plasmide e alla presenza di arabinosio nel terreno di coltura, mostravano il fenomeno della fluorescenza quando esposte a radiazioni UV. Ciò ad ulteriore conferma del ruolo centrale dell'arabinosio come induttore del meccanismo molecolare che controlla la sintesi della GFP, unica e vera responsabile della fluorescenza verde osservata.

Infine, per quanto concerne la semina nei settori I e II del campione di controllo (-), essa è servita per verificare l'effettiva vitalità dei batteri (settore I) e la loro condizione di cellule non trasformate (settore II).

³ I termini sottolineati rimandano alla *SCHEDA 3* ove vengono riportati ulteriori approfondimenti.

SCHEDA 3

Parole e concetti Chiave

• Con il termine **trasformazione batterica** si intende un processo che si realizza quando una cellula batterica incorpora ed esprime un frammento di materiale genetico esogeno, contenente uno o più geni, che comporta una modificazione stabile dei tratti dell'organismo stesso (fenotipo). I **geni esogeni** utilizzati nelle trasformazioni possono essere prelevati da DNA umano, animale o vegetale per essere poi immessi nelle cellule batteriche.

Tale processo, che in natura si verifica in misura minima, ha trovato largo utilizzo in diversi settori delle biotecnologie: dal biorisanamento, alla terapia genica, all'industria farmaceutica.

In agricoltura, ad esempio, possono essere immessi nelle piante geni codificanti per caratteristiche quali la resistenza al gelo, agli insetti e alla siccità.

Nel biorisanamento, i batteri possono essere geneticamente trasformati con geni che permettono loro di digerire, e quindi eliminare dall'ambiente, sostanze inquinanti immesse quali, ad esempio, idrocarburi.

In medicina, malattie causate da geni difettosi potranno essere trattate (almeno questa è la speranza) mediante terapia genica, ossia trasformando geneticamente con copie sane del gene portatore della patologia le cellule delle persone malate.

Un esempio tipico dell'utilizzo delle biotecnologie in ambito medico è quello relativo al gene umano codificante per l'ormone insulina. Sino a pochi decenni fa l'insulina utilizzata nel trattamento del diabete di tipo I (malattia genetica in cui il gene codificante per l'ormone insulina è difettoso) veniva estratta dal pancreas di bovini o suini. L'estratto proteico così ottenuto veniva poi purificato in modo da isolare insulina pura. In realtà, però, la purificazione non permetteva una completa eliminazione dall'estratto delle altre proteine pancreatiche che, somministrate insieme all'ormone, potevano indurre nei pazienti problemi allergici o risposte immunitarie ancor più pericolose. Inoltre, il processo di purificazione richiesto era molto costoso. Oggi, fortunatamente, si può ovviare a questi inconvenienti facendo produrre insulina umana, tra l'altro in grosse quantità, a batteri trasformati con il gene umano. Un altro esempio, analogo al precedente, è quello relativo al gene umano codificante per l'ormone della crescita (GH). Gli individui incapaci di sintetizzare questo ormone sono affetti da nanismo ipofisario, ossia da un ridotto, ma tuttavia armonico, sviluppo della struttura ossea. In passato tale ormone veniva prelevato esclusivamente dall'ipofisi di cadaveri umani e, ovviamente, la quantità ricavabile per questa via non soddisfaceva l'elevata richiesta. Oggi si possono ottenere grandi quantità dell'ormone della crescita trasformando con il gene sano specifici ceppi batterici.

• I **batteri *Escherichia coli*** utilizzati nell'esperimento appartenevano al ceppo mutante innocuo *K12*, che è privo di plasmidi. Questa specie batterica contiene un unico cromosoma di circa 4640 Kbp (bp = paio di basi) e presenta pili o fimbrie per aderire al substrato.

In natura *E. coli* vive solitamente nell'intestino dei mammiferi come simbionte o, talvolta, come parassita (nell'intestino o nella vescica urinaria).

• Solitamente, la **competenza** di una cellula batterica alla trasformazione è data dalla presenza su questa di appositi recettori di membrana (codificati da uno specifico gene batterico), che consentono l'acquisizione del plasmide attraverso un processo simile all'endocitosi mediata da recettori.

In assenza di tali recettori, l'introduzione del DNA esogeno (solitamente plasmidico) nella cellula batterica è promossa da una temporanea alterazione dell'integrità della membrana cellulare. Ciò si può ottenere mediante l'utilizzo di specifiche sostanze chimiche, quali ad esempio CaCl_2 , in associazione a sbalzi repentini di temperatura (shock termico) o a scariche elettriche ad alto voltaggio (elettroporazione). Il risultato è quello di ottenere cellule batteriche competenti, ossia in condizioni tali da poter essere trasformate.

In passato si riteneva che gli ioni calcio positivi (Ca^{2+}) presenti in soluzione facilitassero l'entrata del plasmide nella cellula batterica mediante la neutralizzazione delle cariche negative (determinate dalla presenza di gruppi fosfato PO_4^{3-}) sulla superficie sia del batterio sia del plasmide. Oggi, sebbene tale ipotesi continui ad essere accettata, si ritiene che gli ioni Ca^{2+} , oltre ad aprire i canali di trasporto specifici, indeboliscano i legami tra alcuni costituenti della parete cellulare, determinando un aumento di fluidità del doppio strato lipidico e agevolando, in tal modo, l'entrata del plasmide.

• In aggiunta ad un grande cromosoma, i batteri in natura contengono uno o più piccoli pezzi di DNA circolari in grado di autoreplicarsi detti **plasmidi**. Il DNA plasmidico solitamente porta geni per una o più caratteristiche che possono risultare positive per la sopravvivenza della cellula batterica. In natura i batteri sono in grado di trasferirsi reciprocamente queste informazioni e ciò permette loro di adattarsi al meglio all'ambiente in cui vivono e alle sue eventuali modificazioni.

La presenza sempre maggiore di ceppi batterici resistenti agli antibiotici è dovuta proprio alla trasmissione, tra questi, di plasmidi e delle informazioni in essi contenute.

Con il termine **plasmide ricombinante** si intende una molecola di DNA circolare (assemblata o modificata in laboratorio) capace di replicazione autonoma. Essa presenta di solito uno o più geni codificanti per proteine che possono risultare positive per la sopravvivenza della cellula batterica ricevente (come, ad esempio, proteine che conferiscono resistenza a specifici antibiotici) e un gene estraneo. Nel caso specifico dell'esperimento effettuato, il plasmide ricombinante utilizzato per la trasformazione è il **plasmide pGLO** (5400 bp).

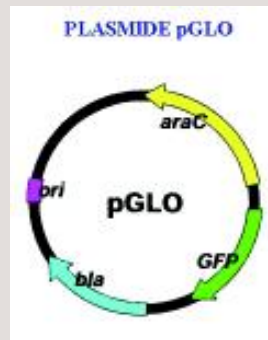


Figura 1

Esso contiene 4 sequenze geniche importanti:

ori → origine di replicazione del plasmide;

bla → gene che codifica per la proteina beta-lattamasi;

araC → gene regolatore che codifica per la proteina C repressore dell'operone arabinosio;

GFP → gene strutturale che codifica per la proteina verde fluorescente (GFP).

La beta-lattamasi è una proteina che fornisce resistenza all'antibiotico ampicillina. Questa proteina, una volta prodotta a livello del citoplasma batterico, viene secreta dal batterio trasformato nell'ambiente circostante, ove inattiva l'antibiotico ampicillina (se presente).

Solo i batteri trasformati, che contengono il plasmide e che quindi possono esprimere la beta-lattamasi, sono in grado di sopravvivere in un mezzo di coltura contenente ampicillina. Tuttavia, soltanto una percentuale molto piccola di cellule batteriche riesce ad acquisire il DNA plasmidico e a trasformarsi (si veda oltre).

Il gene *GFP* è stato originariamente isolato dalla medusa bioluminescente *Aequorea victoria*. Tale gene codifica per la *Green Fluorescent Protein* (proteina verde fluorescente) che rende la medusa fluorescente e visibile al buio.

In seguito alla procedura di trasformazione, i batteri esprimono il nuovo gene acquisito e producono la proteina GFP che li rende luminescenti, di un color verde brillante, sotto radiazione ultravioletta (UV).

È infatti la conformazione tridimensionale di questa proteina che la porta, quando esposta a radiazioni UV, ad emettere l'energia assorbita sotto forma di luce verde visibile.

Il gene *araC* fa parte dell'**operone arabinosio**.

L'**operone** è una sequenza di DNA deputata al controllo della sintesi di RNA messaggero e contiene l'informazione per la produzione di diverse proteine. Esso è costituito da uno o più geni strutturali adiacenti, una zona di regolazione, un operatore e un promotore.

In natura l'**operone arabinosio** presiede alla regolazione della sintesi di tre enzimi digestivi (codificati dai geni adiacenti *araB*, *araA*, *araD*) coinvolti nel metabolismo dell'arabinosio, zucchero utilizzato dai batteri come sostanza nutriente.

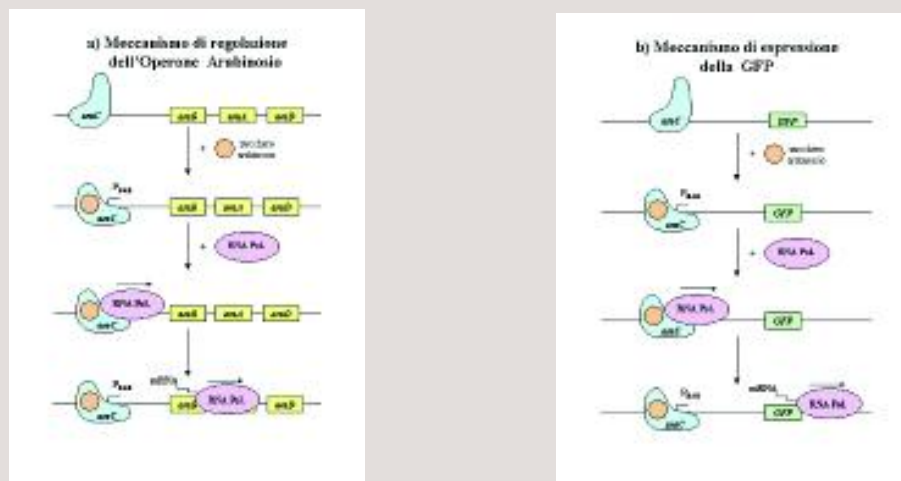


Figura 2

In assenza di arabinosio la proteina C repressore (codificata dal gene *araC*) si lega all'operatore dell'operone impedendo l'attacco della RNA polimerasi al filamento di DNA e, di conseguenza, la trascrizione dei geni strutturali (*araB*, *araA*, *araD*). In presenza di arabinosio, invece, una molecola di zucchero si lega alla proteina C repressore che, modificando la propria struttura tridimensionale, promuove il legame della RNA polimerasi al promotore (P_{BAD}) e avvia la trascrizione.

Nel plasmide pGLO è presente un operone arabinosio modificato: i tre geni strutturali *araB*, *araA* e *araD* sono stati tolti e sostituiti

con il gene della GFP. In tal modo lo stesso meccanismo di regolazione genica può essere utilizzato per controllare l'espressione della proteina GFP nelle cellule trasformate: la trascrizione e la traduzione della proteina verde fluorescente risultano regolati dalla presenza o meno, nel mezzo di coltura, dello zucchero arabinosio.

• Lo **shock termico** consiste nel sottoporre le cellule a due rapidi e successivi cambiamenti di temperatura: $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 42\text{ }^{\circ}\text{C}$, $42\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anche se il meccanismo con cui ciò si verifica non è completamente noto, si ipotizza che durante i 90 secondi di permanenza a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ tale temperatura induca una parziale denaturazione delle proteine canale del calcio. In seguito alla modificazione della loro struttura tridimensionale (il diametro del canale si dilaterebbe), queste proteine sarebbero in grado di far passare il plasmide. L'aumentata fluidità del doppio strato fosfolipidico di membrana (determinata anch'essa dall'aumento di temperatura) sembrerebbe agevolare il processo.

Il ritorno a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e la permanenza a questa temperatura per i 2 minuti successivi indurrebbero la rinaturazione delle proteine canale che, riacquistata la propria struttura tridimensionale e, di conseguenza, la propria funzionalità, tenderebbero a richiudersi. Il plasmide ha quindi a disposizione un tempo brevissimo per entrare in *E. coli*: solo i 90 secondi di permanenza nel bagno termostato a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Come sopra riportato, soltanto una percentuale molto piccola di cellule batteriche riesce ad acquisire il DNA plasmidico e a trasformarsi: la massima efficienza teorica di trasformazione (ossia la percentuale massima di batteri trasformati in rapporto al loro numero iniziale) è pari al 50%. In realtà, l'efficienza di trasformazione effettiva è molto più bassa: nel nostro caso era dell'ordine del 10%. Ciò dipende da diversi fattori che devono essere contemporaneamente soddisfatti:

a) il caso.

Il plasmide ha una probabilità del 50% di entrare e una uguale probabilità di non entrare.

b) la temperatura di trasformazione ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Questa deve essere abbastanza alta (rispetto alla temperatura ottimale di vita di *E. coli*: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) per indurre l'apertura dei canali del calcio, ma, nello stesso tempo, non troppo alta per evitare di uccidere i batteri.

c) il tempo di trasformazione (90 secondi).

Esso deve essere abbastanza lungo da permettere al plasmide di incontrare il batterio (evento del tutto casuale posto che non vi è nulla che attiri il plasmide verso il batterio o viceversa) e di entrarvi, ma non troppo lungo per evitare di uccidere i batteri (l'eccessiva permanenza a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ fa sì che attraverso le proteine canale, mantenute aperte dall'alta temperatura, entri una certa quantità di soluzione acquosa oltre al plasmide; questo porta ad un graduale rigonfiamento e successiva lisi delle cellule batteriche).

d) la modalità di incontro tra plasmide e superficie batterica.

È necessario che l'incontro sia "efficace", ossia il plasmide può entrare solo se incontra la membrana a livello di una proteina canale aperta.

• Con **terreno di coltura selettivo** si intende un mezzo di coltura in cui si agevola lo sviluppo dei batteri che presentano determinate caratteristiche rispetto agli altri che ne sono privi. I primi risultano così selezionati rispetto ai secondi.

• L'**agar** è una sostanza polimerica naturale a basso peso molecolare (contenuta nelle alghe marine) che ha la proprietà di sciogliersi in un mezzo acquoso quando scaldata e di formare un gel solido quando raffreddata a temperatura ambiente. La principale funzione dell'agar è quella di fornire un supporto solido su cui seminare e coltivare i batteri.

A ben guardare, anche il fondo di plastica della piastra Petri può costituire un supporto solido per le cellule; allora perché utilizzare l'agar? La risposta è semplice: le cellule batteriche per vivere e moltiplicarsi hanno bisogno di grandi quantità di nutrienti che non possono estrarre dalla plastica della piastra. Al contrario, quando l'agar è allo stato liquido, ad esso possono essere aggiunte sostanze diverse (nutrienti, antibiotici, ecc.) che risultano poi facilmente assimilabili dai batteri quando l'agar si è solidificato.

• In qualsiasi esperimento di laboratorio è buona norma disporre di un **campione di controllo**. Questo è un campione uguale agli altri, che subisce gli stessi procedimenti a cui gli altri verranno sottoposti tranne uno, solitamente il passaggio fondamentale dell'esperienza. In tal modo, se alla fine dell'esperimento si riscontrano differenti risposte tra il campione di controllo e i campioni "effettivi", queste differenze saranno imputabili al passaggio della metodica sperimentale che i secondi, a differenza del primo, hanno subito.

2) Purificazione della proteina GFP

a) **Realizzazione dell'esperienza**

Lo scopo dell'esperienza è stato quello di estrarre e purificare la proteina verde fluorescente (GFP) da un campione di cellule batteriche (*E. coli*) precedentemente trasformate con il plasmide ricombinante pGLO.

Ciascun batterio trasformato può essere considerato come una sorta di piccola "industria chimica" vivente: esso è in grado di fornire, in tempi relativamente brevi, quantità rilevanti di un "prodotto" (la proteina GFP, ad esempio, oppure l'insulina o l'ormone della crescita GH), seguendo le "indicazioni di produzione" contenute nel materiale genetico esogeno fornitogli (plasmide). I passaggi successivi prevedono l'estrazione, la separazione e la purificazione della proteina d'interesse che può poi trovare largo impiego in ambito medico, farmacologico, agroalimentare o industriale.

Le tecniche cromatografiche, che consentono di isolare e purificare specifiche proteine a partire da una miscela proteica complessa, si fondano sull'utilizzo delle conoscenze chimico-fisiche (massa molare, solubilità, cariche elettriche) raccolte nel corso degli anni relativamente alla sostanza d'interesse.

In riferimento alla presente esperienza, gli studenti hanno iniziato questa seconda attività di laboratorio lisando le cellule di *E. coli* precedentemente trasformate e contenenti la proteina GFP, sintetizzata in seguito a coltura in un terreno liquido contenente arabinosio.

In primo luogo, le cellule batteriche, trasformate dai tecnici del laboratorio e conservate in freezer alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sono state risospese in un tampone (TE) a bassissima concentrazione salina, al fine di creare attorno ad esse un ambiente acquoso utile per le fasi successive.

SCHEDA 4

Parole e concetti chiave

• Con **soluzione tampone** o miscela tamponata si intende una soluzione acquosa di uno o più sali, a concentrazione nota, che conferiscono alla soluzione stessa un pH pressochè costante e specifiche caratteristiche. In generale, serve per creare l'ambiente ideale di reazione.

Tris (acido etilendiamminotetracetico sale disodico) → ha la funzione di stabilizzare il pH della miscela attorno a 8-9 (pH basico), valore ideale per la stabilità della proteina GFP.

EDTA → è un chelante di cationi bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}); nel caso specifico di questo esperimento sembra contribuire a mantenere bassa la salinità all'interno della colonna cromatografica sequestrando i cationi metallici.

• Il **lisozima** (scoperto da Fleming nel 1922) è un enzima che ha la proprietà di lisare alcuni tipi di batteri poiché è in grado di rompere la componente polisaccaridica della loro parete cellulare.

Il polisaccaride costituente la parete batterica è un polimero formato da due residui saccaridici, la N-acetilglucosamina (NAG) e l'acido N-acetilmuramico (NAM), uniti tra loro da legami glicosidici $\beta(1 > 4)$. Il lisozima, una glicosilasi, agisce idrolizzando esclusivamente il legame glicosidico tra il C-1 del NAM e il C-4 del NAG. In tal modo, la parete cellulare batterica viene frantumata e il batterio privato di questa componente cellulare finisce per scoppiare a causa dell'elevata pressione intracellulare.

Il lisozima si trova in natura come componente delle lacrime e della saliva ove assolve alla sua funzione battericida.

• La **centrifugazione** è una tecnica che consente di separare molecole diverse sulla base del loro differente peso molecolare, sfruttando una rotazione ad alta velocità.

Al termine della centrifugazione di un campione, sul fondo dell'eppendorf si osserva il cosiddetto **pellet**: esso è costituito dalle porzioni più pesanti del campione che, per azione della forza centrifuga, precipitano sul fondo del contenitore dove formano un deposito solido. Sopra al pellet si distingue una fase liquida detta **suratante**: essa è formata dalle componenti più leggere del campione che sono rimaste in soluzione.

Ovviamente la velocità di rotazione del rotore della centrifuga e il tempo di durata della centrifugazione sono scelte in base al peso molecolare della componente in soluzione che si desidera separare.

• La **cromatografia** è una delle varie tecniche che consentono di isolare e purificare specifiche proteine a partire da una miscela proteica complessa. Una colonna (di vetro o di plastica particolare) viene densamente riempita (impaccata) con un letto di microscopiche "perline" (di gel di silice), la cui funzione è quella di formare una matrice solida attraverso cui far passare la soluzione contenente le proteine da separare. Nella porzione terminale della colonna la presenza di un filtro poroso consente di trattenere le microsferette all'interno della colonna stessa.

Una matrice costituita da "perline" con caratteristiche chimiche idrofobiche, come quella utilizzata nell'esperimento, è detta **matrice ad interazione idrofobica**.

Per ulteriori informazioni sulla cromatografia ad interazione idrofobica (HIC) si rimanda al prossimo articolo.

Quindi, l'enzima idrolitico **lisozima** è stato aggiunto alla sospensione in modo da degradare la parete cellulare batterica, evento indispensabile al fine di consentire il passaggio in soluzione delle componenti citoplasmatiche solubili, inclusa la proteina GFP. Infatti, una volta privato della parete, il batterio scoppia a causa dell'elevata pressione osmotica intracellulare. La bassa concentrazione salina della soluzione tampone TE ha appunto lo scopo di favorire la diffusione passiva dell'acqua, attraverso la membrana plasmatica, all'interno della cellula batterica che, in tal modo, tende via via a rigonfiarsi sino a scoppiare. Conferma dell'avvenuta lisi delle cellule batteriche è data dalla formazione, all'interno della provetta eppendorf contenente la sospensione, di una componente filamentosa bianca simile a cotone. Questa è costituita dai frammenti della parete e della membrana cellulare ottenuti, rispettivamente, in seguito all'azione litica del lisozima e della pressione osmotica della soluzione.

Al fine di favorire l'azione litica del lisozima, la sospensione batterica è stata posta per una decina di minuti in cella termostatica a 37 °C: questa è la temperatura ottimale per il funzionamento dell'enzima.

La successiva centrifugazione dei campioni ha poi consentito di separare le particelle del lisato di maggiori dimensioni, quali pezzi di membrana e parete cellulare, dalle

proteine (GFP inclusa) che, essendo meno pesanti, sono rimaste in soluzione nel **suratante**. Questo, infatti, se illuminato con luce ultravioletta (UV) risultava di color verde fluorescente, a riprova della correttezza del procedimento di estrazione effettuato.

Il suratante è stato poi velocemente trasferito in una nuova eppendorf (siglata con T1, si veda oltre) facendo molta attenzione a non prelevare frammenti di **pellet**, anche piccoli, che avrebbero potuto interferire negativamente nella successiva fase di purificazione.

La separazione e la purificazione della proteina d'interesse sono state effettuate mediante una **tecnica cromatografica** specifica detta **ad interazione idrofobica** (HIC: *Hydrophobic Interaction Chromatography*). Questa sfrutta le differenti caratteristiche di idrofobicità superficiale delle proteine per la formazione, in ambiente fortemente salino, di interazioni idrofobiche tra i ligandi apolari presenti sulla matrice cromatografica e le stesse regioni proteiche idrofobiche.

Il procedimento di separazione e purificazione della GFP prevedeva 4 passaggi successivi (Figura 3):

- stadio di equilibratura,
- stadio di caricamento del campione,
- stadio di lavaggio,
- stadio di eluizione.

In primo luogo la colonna cromatografica, precedentemente impaccata con resina di silice, è stata equilibrata con un tampone ad alta concentrazione salina, indicato come soluzione di equilibratura [SE = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M]. La sua funzione era quella di creare all'interno della colonna un ambiente a concentrazione salina uguale a quello del campione che sarebbe stato successivamente caricato.

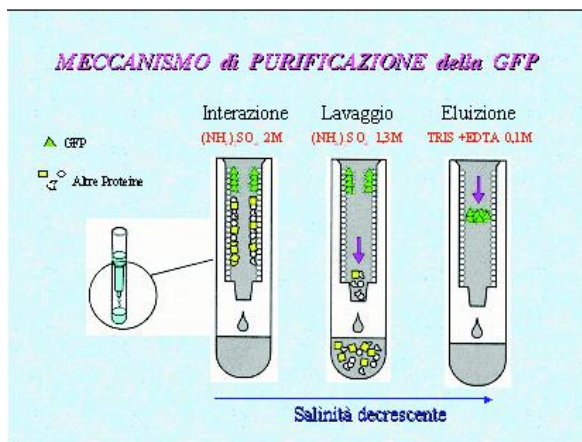


Figura 3

Il surnatante contenente la proteina GFP, ottenuto per centrifugazione del lisato batterico, è stato aggiunto ad un pari volume di tampone ad altissima concentrazione salina: il tampone d'interazione [TI = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M]. Poiché i volumi mescolati erano uguali, la soluzione risultante ha assunto la stessa concentrazione salina presente nella colonna equilibrata, ossia 2 M. Questa elevata concentrazione salina aveva lo scopo di avviare il processo di **desolvatazione** (si veda oltre) delle regioni idrofobiche superficiali delle proteine in soluzione che risultavano, quindi, nelle condizioni ideali per interagire con le "perline" idrofobiche della matrice.

Il campione è stato poi caricato all'interno della colonna cromatografica mediante l'utilizzo di una siringa. In questa fase le proteine completamente idrofile sono transitate all'interno della matrice senza interagire con essa e sono state eluite dalla colonna insieme alla fase acquosa della soluzione caricata. Al contrario, le proteine che presentavano porzioni idrofobiche più o meno estese si sono legate alla matrice, in modo direttamente proporzionale alla loro idrofobicità superficiale, grazie all'instaurarsi di interazioni idrofobiche. Poiché la GFP presenta un discreto numero di residui amminoacidici idrofobici sulla sua superficie, essa ha interagito fortemente con le microsferette della matrice che quindi l'hanno trattenuta. Ciò è stato verificato facilmente illuminando la colonna cromatografica con luce UV tramite cui è risultato evidente un anello di color verde fluorescente a livello della parte alta della matrice.

Nella fase successiva, il caricamento in colonna di una soluzione a media concentrazione salina [tampone di lavaggio (TL) = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 M] ha indotto un graduale abbassamento della salinità della matrice. Tale progressiva modificazione delle caratteristiche ambientali ha portato ad una crescente **risolvatazione** (si veda oltre) dei radicali idrofobici delle proteine legate. Queste, in tal modo, hanno diminuito altrettanto gradualmente la loro idrofobicità complessiva e conseguentemente la loro associazione alla matrice, sino a venire eluite dalla colonna.

38 Solo le proteine con un'elevata idrofobicità iniziale (come la GFP) non si sono distaccate dalla matrice, con la quale hanno continuato a interagire seppure con legami più de-

boli rispetto alla condizione precedente.

È proprio in questo stadio che si è verificato il processo di purificazione della GFP: essa è stata infatti separata da tutte le altre proteine citoplasmatiche che, a differenza della proteina d'interesse, eluiscono dalla colonna. Anche in questo caso la presenza di GFP nella matrice è stata facilmente evidenziata illuminando quest'ultima con luce ultravioletta. Infine, il caricamento in colonna di un tampone a bassissima (rispetto ai passaggi precedenti) concentrazione salina [tampone di eluizione (TE) = Tris + EDTA 0,1 M] ha consentito di eluire dalla colonna anche la proteina GFP. Tale tampone ha agito diminuendo ulteriormente la salinità della matrice e ha indotto, di conseguenza, un aumento proporzionale della idrofilicità delle proteine rimaste ad essa legate nella fase precedente. È stato proprio il ritorno della GFP al grado di idrofilicità iniziale (si veda oltre) che ne ha consentito il definitivo distacco dalla matrice.

Mentre nei passaggi precedenti la fase liquida via via fuoriuscita dalla colonna cromatografica è stata "scartata" poiché priva di interesse per i nostri scopi, in questo ultimo stadio la soluzione eluita, contenente la proteina d'interesse, è stata raccolta e suddivisa in diverse eppendorf.

b) Risultati

L'identificazione della *Green Fluorescent Protein* purificata è stata quindi effettuata esponendo semplicemente l'eluato ottenuto alla luce ultravioletta del transilluminatore o di una lampada portatile. A riguardo, l'illuminazione dei diversi sottocampioni con luce UV ha messo in evidenza una ripartizione non uniforme della proteina GFP negli stessi. Questa, infatti, è apparsa (o tale sarebbe dovuta essere) più concentrata nella prima e/o seconda eppendorf per poi diminuire gradualmente, sino a scomparire, in quelle successive. Tale distribuzione è spiegabile considerando che la quantità di proteina verde fluorescente legata alla matrice si distacca da essa tutta insieme ed eluisce, quindi, dalla colonna soprattutto all'interno delle prime gocce. Poiché ogni sottocampione era costituito da una sola goccia di eluato, è facile comprendere come la/e prima/e eppendorf siano risultate quelle maggiormente fluorescenti.

I casi in cui, invece, è stata osservata una debole fluorescenza distribuita in maniera pressoché uniforme in tutte le eppendorf possono essere spiegati con un mal funzionamento della colonna cromatografica. In questa circostanza la matrice contenuta nella colonna probabilmente non era impaccata in maniera corretta e ciò è bastato per alterare il risultato del processo di purificazione. Infine, una eventuale assenza di fluorescenza in tutti i sottocampioni può essere interpretata con due ipotesi differenti:

a) il campione è andato perduto, nei passaggi precedenti, a causa di un mal funzionamento della colonna cromatografica che non ha consentito alla proteina di legarsi efficacemente alla matrice (in questo caso la proteina può essere rintracciata, sempre grazie all'uso della lampada UV, in soluzione nella fase acquosa eluita e scartata)

b) oppure lo stadio di eluizione non è stato eseguito correttamente e la GFP è rimasta legata alle microsferette idrofobiche della matrice (in tal caso è ancora possibile osservare l'anello color verde fluorescente a livello della matrice).

Il concetto importante da ricordare è che una purificazione cromatografica di elevata qualità è quella che consente di rintracciare la proteina d'interesse in un numero quanto più limitato di sottocampioni.

Posto che il progetto didattico realizzato si è incentrato

sulla spiegazione del processo di purificazione utilizzato in questo esperimento, al termine del presente articolo viene data una breve interpretazione dei fenomeni sopra riportati, che saranno ripresi ed ampliati dettagliatamente nella terza parte di questo lavoro.

In un ambiente acquoso il “ripiegamento” delle molecole proteiche è guidato dalla forte tendenza dei residui idrofobici ad escludere l’acqua: tali gruppi sono infatti termodinamicamente più stabili quando sono addensati all’interno della proteina piuttosto che esposti sulla sua superficie⁴. Perciò, la catena polipeptidica di qualsiasi molecola di proteina citoplasmatica (GFP inclusa) si ripiega spontaneamente in modo che i residui amminoacidici idrofobici si trovino il più possibile all’interno della molecola e le catene polari, provviste di carica, alla sua superficie. Questo porta ad una stabilizzazione della struttura tridimensionale della proteina che tende ad assumere una forma compatta (globulare) con pochi spazi vuoti.

In questo ambiente la superficie proteica è interamente circondata da molecole di acqua che solvatano la proteina rendendola solubile: tuttavia, mentre a livello delle porzioni polari si instaurano interazioni dirette con i dipoli delle molecole d’acqua grazie alla formazione di legami a idrogeno, nelle regioni idrofobiche le molecole d’acqua assumono una disposizione altamente ordinata con la funzione di schermare tali regioni dal contatto con l’acqua circostante (Figura 4).

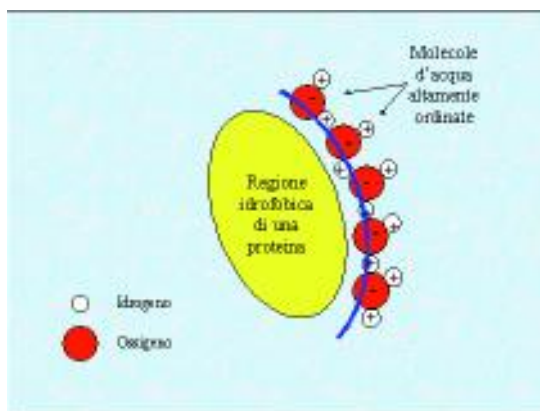


Figura 4

A questo punto, l’aggiunta di una soluzione ad alta concentrazione salina alla soluzione acquosa contenente la miscela proteica complessa innesca un processo di “cattura” delle molecole d’acqua libere, necessarie per la solvatazione degli anioni e dei cationi salini. Se la concentrazione della soluzione salina è elevata (ad esempio 4 M) le molecole di acqua libere non sono sufficienti per solvatare tutti gli ioni presenti in soluzione. Inizia in tal modo un processo di **desolvatazione delle regioni idrofobiche superficiali delle molecole proteiche** che, risultando esposte, ossia non più schermate dal guscio di molecole d’acqua altamente ordinate, tenderanno ad interagire tra loro. Se il campione biologico viene caricato su una matrice per HIC, le porzioni proteiche con caratteristiche idrofobiche propenderanno ad interagire con le microsferette idrofobiche della matrice formando legami tanto più forti quanto più elevata è l’idrofobicità superficiale della proteina.

Se, in seguito, la salinità della soluzione viene gradualmente ridotta, **le regioni idrofobiche ritornano**, con altrettanta gradualità, **ad essere schermate da nuovi gusci**

⁴ A riguardo si rimanda al prossimo articolo.

di molecole d’acqua altamente ordinate. Questo processo porta ad un progressivo distacco dalla matrice delle molecole proteiche che eluiscono quindi fuori dalla colonna cromatografica. Poiché l’ordine di eluizione è inversamente proporzionale al grado d’idrofobicità superficiale delle proteine, queste, alla fine, risulteranno essere state separate.

Per ciò che riguarda la proteina GFP, sapendo che essa espone sulla sua superficie un discreto numero (rispetto ad altre proteine) di residui amminoacidici idrofobici, è facile comprendere come questa proteina, se posta in un ambiente ad elevata salinità, presenti nel complesso una elevata idrofobicità.

Riflessioni didattiche

In questo articolo, si è ritenuto utile riportare nel dettaglio la sequenza delle operazioni eseguite in laboratorio poiché la metodica seguita offre numerosi spunti di riflessione teorica.

A tale riguardo:

- Gli studenti sono stati indotti a ripercorrere i concetti di dissociazione ionica in soluzione e di neutralizzazione fra cariche di segno opposto al fine di interpretare e comprendere il ruolo della soluzione trasformante. In tal modo, sono risultate ancora una volta evidenti le connessioni tra chimica di base e scienze della Vita.
- Si è sottolineato il raccordo tra le due discipline studiando la funzione degli enzimi, che riconduce inevitabilmente alla nozione di energia di attivazione, al ruolo dei catalizzatori e, più in generale, alla cinetica chimica.
- Sono stati riproposti i concetti di soluzione e di solubilità, quest’ultima determinata in gran parte dal carattere idrofilo e idrofobo sia del solvente sia del soluto.
- È stato ribadito il concetto d’interazione ione-dipolo e, conseguentemente, di solvatazione delle sostanze disciolte in soluzione. In modo particolare, gli studenti hanno compreso il meccanismo attraverso il quale gli ioni ammonio e solfato in soluzione richiamano a sé le molecole d’acqua, al punto da desolvatare completamente i residui amminoacidici idrofobici delle catene proteiche.

Ringraziamenti

L’autrice desidera ringraziare il Prof. Gabriele Hakim, docente del Dipartimento di Biochimica dell’Università di Bologna, per la grande disponibilità dimostrata nel fornire indicazioni e suggerimenti riguardanti alcune tecniche utilizzate nel percorso didattico attuato.

Desidera altresì ringraziare il Prof. Rinaldo Cervellati, docente del Dipartimento di Chimica dell’Università di Bologna, e la Prof.ssa Vittoria Stagni, docente di Scienze presso il Liceo Scientifico “A. Righi” di Bologna, per il loro insostituibile apporto alla realizzazione del progetto formativo e del presente articolo.

Bibliografia e opere consultate

- **Atkins P.W.:** Chimica Fisica. 3^a Edizione, 1997, Zanichelli, Bologna.
- **Bertolini P.:** *Introduzione al convegno.* Encyclopaedia – rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 7-14.
- **Brady J.E., Holum J.R.:** Fondamenti di chimica. 1985, Zanichelli, Bologna.
- **Campbell N.A., Mitchell L.G., Reece J.B.:** Immagini della biologia. 2000, Zanichelli, Bologna.
- **Cerruti L.:** Bella e potente. La chimica del Novecento fra

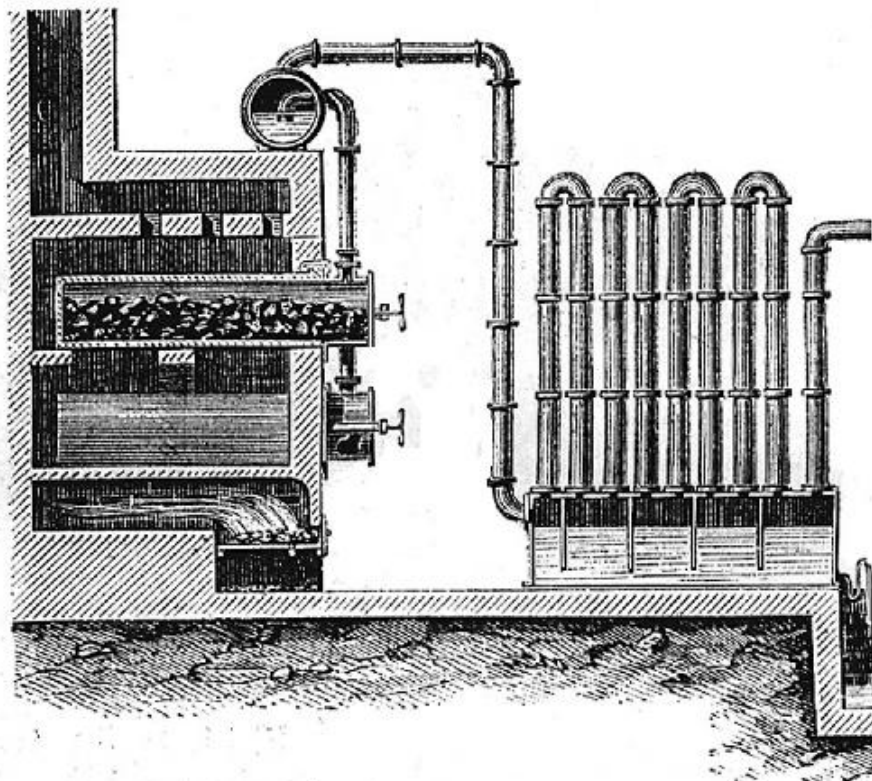
scienza e società. 2003. Editori riuniti, Roma.

- **Cervellati R., Perugini D.:** Guida alla didattica della chimica nella Scuola Secondaria Superiore. 1987, Zanichelli, Bologna.
- **Chang R.:** Chimica Fisica. 2° volume, 2003, Zanichelli, Bologna.
- **Dallari M.:** *Identità personale e politica dell'insegnante.* Encyclopaideia – rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 21-34.
- La nuova enciclopedia delle scienze Garzanti. 3ª Edizione, 1991, Garzanti, Milano.
- Le Tavole M A F B I C. 1ª Edizione, 1989, Zanichelli, Bologna.
- **Moore W.J.:** Chimica Fisica. 1990, Piccin, Padova.
- **Mortari L.:** *Per una presenza responsabile.* Encyclopaideia – rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 49-56.
- **Mullis K.B.** (premio Nobel per la Chimica 1993): Lezione svolta in occasione del conferimento della Laura ad honorem, Università degli Studi di Bologna, 04/06/2004.
- **Russell P.J.:** Genetica. 2ª Edizione, 1996, EdiSES, Napoli.
- **Solomons T.W.G.:** Chimica organica. 2ª Edizione, 1988, Zanichelli, Bologna.
- **Sternberg R.J.:** Stili di pensiero. 1998, Centro studi Erickson, Trento.

- **Stryer L.:** Biochimica. 4ª Edizione, 1996, Zanichelli, Bologna.
- **Tartarotti L.:** La programmazione didattica. Giunti-Lisciani, Firenze.
- **Tsien R.Y.:** The Green Fluorescent Protein. *Ann. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 509-544.
- **Valle G., Citterich M.H., Attimonelli M., Pesole G.:** Introduzione alla bioinformatica. 2003, Zanichelli, Bologna.
- **Wilson K., Walker J.:** Metodologia Biochimica. 2001, Cortina Editore.
- **Zumdahl S. S.:** Chimica. 1993, Zanichelli, Bologna.

Siti internet consultati

- <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/gfp.htm><http://www.bio-rad.com>
- http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda_index.html
- <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol>
- <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- <http://www.llc.it>
- <http://www.pdb.bnl.gov>
- <http://www.rcsb.org/pdb>



Four, barillet et jeu d'orgues.