



Società Italiana di Fisiologia Vegetale

***ESPERIENZE DI LABORATORIO
PER LA DIDATTICA
DEL SETTORE BIO/04.***

**RACCOLTA DI PROTOCOLLI
PROPOSTI DAI DOCENTI DELLA SOCIETÀ**

I edizione – settembre 2005



Società Italiana di Fisiologia Vegetale

ESPERIENZE DI LABORATORIO PER LA DIDATTICA DEL SETTORE BIO/04.

PROTOCOLLI PROPOSTI DAI DOCENTI DELLA SOCIETÀ
A CURA DI GIUSEPPE FORLANI

I edizione – settembre 2005

STRUTTURA DELLE SCHEDE

Parte A: informazioni generali per la scelta del protocollo

<p>Difficoltà Da ☹ a ☹☹☹</p>	Indice globale delle competenze tecniche e/o teoriche richieste allo studente, e della complessità delle attrezzature e dei materiali richiesti
<p>Tempo richiesto ⌚ = 1 h</p>	Numero di ore da programmare per l'esecuzione dell'esperienza
<p>Eseguibilità in giornata ☺ o ☹</p>	Indicazione se il laboratorio possa essere organizzato o meno in modo da essere completato nell'arco di una singola giornata
<p>Studenti per gruppo da 1 a 4</p>	Esperienza adatta all'esecuzione da parte di un singolo o di un gruppo fino a n studenti
<p>Attrezzature necessarie</p>	Elenco della principale strumentazione richiesta
<p>Materiali</p>	Elenco dei reagenti e del materiale più importante richiesto

Parte B: materiale fornibile allo studente per l'esecuzione dell'esperienza

<p> Argomento</p>	Breve descrizione di rimando alle basi teoriche dell'esperienza
<p> Protocollo</p>	Descrizione dettagliata dell'esercitazione <i>step-by-step</i> da fornire allo studente per la sua esecuzione

Parte C: suggerimenti all'esercitatore e schede di verifica da far compilare allo studente

<p> Note per l'esercitatore</p>	Eventuali <i>trucchi</i> per una buona riuscita dell'esperienza, o avvertenze su aspetti peculiari, o possibili varianti nel protocollo
<p> Verifiche</p>	Possibili modalità per la verifica dell'apprendimento, o dell'esattezza dell'interpretazione dei risultati; domande per lo studente

INDICE

Pagina

- 1 Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici in piante di orzo sottoposte a fotoconversione (*thin layer chromatography*)
Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova
- 3 Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici da foglie di spinacio e colture di cianobatteri (*anion-exchange chromatography*)
Giuseppe Forlani, Università di Ferrara
- 6 Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici in foglie di spinacio (*paper chromatography*)
Massimo Crimi, Università di Verona
- 8 Misura del flusso fotosintetico di elettroni in cloroplasti isolati di spinacio (reazione di Hill con DCPIP)
Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa
- 11 Misura del flusso fotosintetico di elettroni in cloroplasti isolati di spinacio (reazione di Hill con K ferricianuro)
Giuseppe Forlani, Università di Ferrara
- 14 Fotoprotezione e *photobleaching* delle antenne del PSII
Massimo Crimi, Università di Verona
- 16 Determinazione dell'attività dell'anidrasi carbonica periplasmica di *Dunaliella salina*
Mario Giordano, Università Politecnica delle Marche
- 17 Analisi della composizione proteica delle membrane fotosintetiche durante l'inverdimento mediante tecniche elettroforetiche e di immunoblotting
Massimo Crimi, Università di Verona
- 20 Reazioni al buio della fotosintesi: analisi di amido primario e amido secondario
Cinzia Berteà, Università di Torino
- 21 Biosintesi e idrolisi enzimatica dell'amido in tuberi di patata ed effetto di alcuni fattori sull'andamento della reazione
Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova
- 23 Misura della fotosintesi e della respirazione in un'alga unicellulare
Sergio Esposito, Università di Napoli
- 25 Misura del potenziale idrico in tessuti vegetali
Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa
- 28 Determinazione della K_M per L'ATP della H^+ -ATPasi
Lorenzo Camoni, Università di Roma *Tor Vergata*
- 30 Effetto della proteolisi controllata con tripsina sulla dipendenza da pH dell'attività della H^+ -ATPasi del plasmalemma
Claudio Olivari, Università di Milano
- 32 Saggio di attività della nitrato riduttasi in estratti da foglia di spinacio
Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova
- 34 Influenza del substrato sull'attività della nitrato riduttasi di orzo
Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa

- 36 Pigmenti idrosolubili non fotosintetici: estrazione e caratterizzazione degli antociani
Cinzia Berteza, Università di Torino
- 37 Estrazione e determinazione dell'attività dell'enzima tirosinasi nei frutti di banana come marcatore della risposta allo stress da taglio
Sergio Esposito, Università di Napoli
- 39 Misurazione dello *scoppio ossidativo* in cellule vegetali in coltura elicitate con idrolisati di micelio fungino
Giuseppe Forlani, Università di Ferrara
- 43 Estrazione, analisi e determinazione della concentrazione di gibberelline tramite saggio biologico
Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa
- 45 Determinazione della presenza di zuccheri riducenti in semi di orzo integri o disembrionati, trattati o meno con gibberelline
Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova
- 46 Determinazione della concentrazione di citochinine mediante test di espansione dei cotiledoni di cetriolo (*Cucumis sativa* L.)
Valeria Scoccianti, Università Carlo Bo di Urbino
- 47 Micropropagazione di espianti vegetali e colture axeniche
Giuseppe Forlani, Università di Ferrara
- 50 Dosaggio dell'attività β -glicuronidasi in piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana*
Maria Cristina Bonza, Università di Milano

Il testo di questo eserciziaro e i suoi aggiornamenti saranno resi disponibili sul sito Web della Società Italiana di Fisiologia Vegetale, all'indirizzo <http://www.sifv.it/index.htm>.

Gli Autori che hanno contribuito con i loro protocolli sono reperibili ai seguenti indirizzi:

Berteza Cinzia	cinzia.bertea@unito.it	Forlani Giuseppe	flg@unife.it
Bonza Maria Cristina	cristina.bonza@unimi.it	Giordano Mario	m.giordano@univpm.it
Camoni Lorenzo	camoni@uniroma2.it	La Rocca Nicoletta	nicoletta.larocca@unipd.it
Ceccarelli Nello	n.ceccarelli@agr.unipi.it	Olivari Claudio	claudio.olivari@unimi.it
Crimi Massimo	massimo.crimi@univr.it	Scoccianti Valeria	v.scoccianti@uniurb.it
Esposito Sergio	esposito@cds.unina.it		

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa raccolta. Tra essi non vanno dimenticati i docenti che hanno contribuito con altri tra i loro protocolli, che non sono però stati compresi nella presente versione in quanto molto simili ad alcuni di quelli presentati. In ogni scheda viene indicato il nome dei ricercatori che hanno fornito direttamente il materiale: ciò non toglie che anche altri possano aver contribuito, negli anni, alla sua messa a punto. Si è cercato, per quanto possibile, di uniformare la presentazione di ogni esperienza: questo potrebbe aver portato a qualche imprecisione, o omissione. A questo, con il contributo di tutti i Soci, potremo cercare di porre rimedio con la seconda edizione, riveduta e – si spera – ampliata. Anche così, la speranza è che comunque queste pagine possano essere utili per la Didattica della Fisiologia Vegetale, in questi anni di grandi cambiamenti nell'Università italiana.

Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici in piante di orzo sottoposte a fotoconversione (*thin-layer chromatography*)

Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova

Difficoltà:	☹☹	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Mortaio e pestello Centrifuga per eppendorfs Pipettatrici (P200 e P1000) Vaschette per TLC	Materiali:	Piante eziolate di orzo, di sette giorni di età, fotoconvertite per 1, 4 o 24 ore Eppendorfs e puntali Lastrine per TLC e capillari Dietiletere, etere di petrolio, acetone Sabbia di quarzo



Base teorica

Le piante contengono diversi tipi di pigmenti fotosintetici liposolubili (apolari), a cui appartengono le clorofille e i carotenoidi, la cui estrazione viene effettuata con solventi organici apolari. La loro caratterizzazione può essere condotta mediante tre diversi sistemi cromatografici: TLC (*thin-layer chromatography*), HPTLC (*high performance thin-layer chromatography*) e HPLC (*high performance liquid chromatography*). In tutti i tre tipi di cromatografia i costituenti del campione in analisi possono essere separati poiché sono trasportati da una fase mobile liquida attraverso una fase stazionaria solida (lastrina per TLC o HPTLC; colonna per HPLC) e ciascun composto è ritardato in funzione dell'interazione che la sua molecola subisce con queste due fasi.

In particolare, il flusso del solvente porterà ogni sostanza dal punto di applicazione verso l'estremità opposta della lastrina o della colonna. Se il composto non avrà interazioni con la fase stazionaria migrerà con il fronte del solvente altrimenti, se trattenuto, subirà un rallentamento. Il "ritardo di migrazione" di ogni composto, rispetto al fronte della fase mobile, è selettivo e dipende dal sistema fase fissa/fase mobile impiegato. I diversi pigmenti si separeranno in modo caratteristico per cui ciascuno avrà uno specifico R_f determinato dal seguente rapporto:

$$R_f = R_p / R_s$$

dove

R_p = distanza tra punto di applicazione e banda del pigmento

R_s = distanza tra punto di applicazione e fronte del solvente

La cromatografia su strato sottile (TLC e HPTLC) è una tecnica rapida e semplice per l'identificazione e la purificazione di pigmenti, usata frequentemente in alternativa alla più precisa, ma complessa, cromatografia su colonna (HPLC). In questa esercitazione si utilizzerà una tecnica specifica per la caratterizzazione dei pigmenti liposolubili più apolari, clorofille e caroteni, che ne permetterà la separazione a partire da estratti di pigmenti totali utilizzando come fase mobile una miscela di etere di petrolio:acetone in rapporto 7:3. La fase stazionaria sarà invece costituita da lastrine TLC ricoperte di un sottile strato di gel di silice.



Protocollo sperimentale

- Prelevare 0.5 g di tessuto fogliare dai diversi campioni: piante eziolate di orzo, di sette giorni di età, fotoconvertite per 1 ora, per 4 ore o per 24 ore.
- Porle in mortai separati e macinarle finemente dopo l'aggiunta di sabbia di quarzo.
- Aggiungere 1 ml alla volta di dietiletere, macinando e mescolando fino a che l'estratto non sarà ben verde.
- Recuperare velocemente l'estratto (è molto volatile) e trasferirlo in una eppendorf.
- Preparare la lastrina da TLC segnando leggermente con la matita 1 punto a 1,5 cm dalla base della lastrina.
- Versare 1 cm di solvente di separazione (etere di petrolio:acetone 7:3) nella vaschetta da cromatografia e lasciarlo equilibrare qualche minuto dopo aver coperto il recipiente.
- Utilizzando il capillare effettuare sul punto segnato sulla lastrina numerose deposizioni dell'estratto ottenuto.
- Immergere la lastrina nella vaschetta da cromatografia, coprire e attendere la separazione dei pigmenti per circa 30 minuti.
- I diversi pigmenti si separeranno in modo caratteristico ed in particolare, in questo sistema di fase stazionaria e fase mobile, i pigmenti più apolari come il β -carotene e le clorofille a e b, migreranno più velocemente mentre le xantofille rimarranno più vicine alla base della lastrina e saranno risolte meno efficacemente.
- A fine cromatografia estrarre la lastrina e farla asciugare qualche minuto.
- Con la lametta grattare il gel di silice in corrispondenza delle macchie e prelevare separatamente le prime 4 bandine

visibili a partire dal fronte del solvente.

- Raccogliere la polvere su un foglio di alluminio e trasferirla poi in una eppendorf.
- Aggiungere 500 µl di acetone, mescolare e centrifugare 1 minuto a massima velocità.
- Leggere allo spettrofotometro lo spettro di assorbimento di ogni singolo composto e confrontarlo con gli spettri caratteristici dei diversi pigmenti fotosintetici.
- Procedere infine alla quantificazione della clorofilla a e b negli estratti totali dei diversi campioni prelevando da questi 50 µl e diluendoli in una eppendorf in 950 µl di acetone all'80%.
- Leggere l'assorbanza delle soluzioni così ottenute alle seguenti lunghezze d'onda:

clorofilla a 663 nm

clorofilla b 646 nm

Il bianco sarà rilevato con il solo solvente. Si utilizzeranno cuvette di vetro.

- Per il calcolo della concentrazione della clorofilla a e b, sostituire i valori di assorbanza misurati alle seguenti formule:

$$\text{CHLa (mg/g)} = (12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}) \cdot V/W$$

$$\text{CHLb (mg/g)} = (20,13 \cdot A_{646} - 3,03 \cdot A_{663}) \cdot V/W$$



Verifiche per lo studente

Quali pigmenti sono stati identificati nei diversi casi?

Come varia il loro andamento e quello delle clorofille a e b durante la fotoconversione?

Confrontando tra di loro i dati ottenuti con i tre diversi materiali (plantule eziolate esposte alla luce per 1, 4 o 24 h), lo studente esponga le proprie considerazioni sulle trasformazioni quali-quantitative dell'apparato fotosintetico durante la fotomorfogenesi.

Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici da foglie di spinacio e colture di cianobatteri (*anion-exchange chromatography*)

Giuseppe Forlani, Università di Ferrara

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Centrifuga per eppendorfs Spettrofotometro VIS Colonnina e stativo Pipettatrici (P200 e P1000) Mortaio	Materiali:	Foglie di spinacio Cellule di cianobatteri raccolte su filtri Sabbia di quarzo DEAE-cellulosa o DEAE-Sephacel Eppendorfs e puntali Tampone acquoso e metanolo



Base teorica

Tutti gli organismi fotosintetici, sia procariotici che eucariotici, catturano l'energia luminosa del sole attraverso l'impiego di pigmenti. Si tratta di composti strutturalmente e chimicamente differenti, ma che presentano quale fattore unificante la presenza di doppi legami coniugati. Ad eccezione dei batteri che effettuano una fotosintesi anossigenica, in tutte le altre specie il pigmento del centro di reazione è costituito da una clorofilla a. Ogni centro di reazione è corredato però da un gran numero di pigmenti accessori, che concorrono a raccogliere i fotoni e a convogliarli al sito attivo. Alcuni di essi, inoltre, sono in grado di dissipare un eventuale eccesso di radiazione, evitando che questo possa determinare un fotodanno. Tra questa nutrita serie di pigmenti ricordiamo le clorofille, i carotenoidi (suddivisi in xantofille e caroteni a seconda che abbiano o meno atomi di ossigeno nella loro struttura) e le ficobiline. Questi composti sono localizzati funzionalmente all'interno della membrana tilacoidale, in stretta connessione con i due fotosistemi. Per questo essi hanno caratteristiche generalmente lipofile. I carotenoidi sono fortemente idrofobi, e anche le clorofille, il cui anello tetrapirrolico è di natura polare, sono provviste di una lunga catena idrofobica, il fitolo, che permette loro di ancorarsi alla membrana. Fanno eccezione le ficobiline, pigmenti presenti solo nelle alghe rosse e nei cianobatteri, che sono idrosolubili. In questi organismi, infatti, essi formano dei complessi di cattura della luce, detti ficobilisomi, che sono sì in stretto contatto con la membrana fotosintetica, ma protrudono nel citoplasma.

La capacità di ogni pigmento di raccogliere l'energia luminosa varia in funzione dell'energia del fotone. In altre parole, i diversi composti assorbono meglio la luce in punti differenti dello spettro luminoso. Misurando al variare della lunghezza d'onda l'assorbimento di un campione che contenga il pigmento solubilizzato e separato dagli altri, è possibile costruire uno spettro di assorbimento, caratteristico di ognuna di queste sostanze, in cui possono essere presenti diversi picchi. Nella tabella sono riportati i massimi di assorbimento dei principali pigmenti fotosintetici.

Tipo di pigmento	massimi ass. (nm)
<i>Clorofille</i>	
clorofilla a	420, 663
clorofilla b	435, 645
clorofilla c	445, 625
clorofilla d	450, 690
<i>Carotenoidi</i>	
β-carotene	425, 450, 480
α-carotene	420, 440, 470
luteina	425, 445, 475
violaxantina	425, 450, 475
fucoxantina	425, 450, 465
<i>Ficobiline</i>	
ficoeritrina	460, 526, 566
ficocianina	598
alloficocianina	650

La disponibilità di pigmenti accessori consente ai cianobatteri di raccogliere la luce in zone dello spettro che non possono essere usate da altre specie, e quindi di occupare nicchie ecologiche altrimenti improduttive. Lo stesso vale per i batteri, le cui batterioclorofille hanno massimi di assorbimento nell'infrarosso, e sono in grado di utilizzare fotoni a bassa energia. Vista la loro differente natura, per estrarre i diversi pigmenti devono essere impiegate procedure differenti. Per le ficobiline è sufficiente omogenare il materiale in un tampone acquoso, mentre per clorofille e carotenoidi la solubilizzazione può essere conseguita solo con l'utilizzo di solventi organici.

La contemporanea presenza di più pigmenti impedisce di fatto una loro adeguata caratterizzazione in estratti grezzi, anche se la presenza di diversi picchi di assorbimento consente con buona approssimazione la loro quantizzazione. Il diverso grado di idrofobicità ci permette però di effettuarne la separazione con tecniche cromatografiche, in modo da poter disporre di campioni omogenei per il loro studio.

Diverse metodologie sono impiegabili a questo fine. Quella forse più diffusa è la cromatografia su strato sottile (TLC): il campione applicato nella parte bassa di una lastrina ricoperta di silice viene trascinato verso l'alto da un eluente, di solito una miscela, che risale per capillarità; i diversi composti presenti procedono con una velocità che è inversamente proporzionale alla loro interazione con la silice, e vengono dunque via via risolti. Questa tecnica è molto semplice, ma risulta più analitica che preparativa. Per ottenere dei campioni da sottoporre in un secondo

momento ad altre prove, una tecnica più adeguata è quella della cromatografia su colonna. Se ne distinguono molte varianti, a seconda del principio su cui si basa la separazione. Ricordiamo qui solo la cromatografia a fase inversa, in cui i composti si legano ad una matrice idrofobica e vengono poi staccati per aumento dell'idrofobicità dell'eluente, e quella a scambio ionico, in cui una matrice carica trattiene sostanze con carica di segno opposto, per poi rilasciarle quando è fatto passare su colonna del sale. Una volta separati, la determinazione a diverse lunghezze d'onda dell'assorbimento consente di costruire lo spettro di assorbimento di ogni pigmento, e quindi di identificarlo.



Protocollo sperimentale

A) PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI

Come ricordato, modalità differenti di estrazione devono essere usate in funzione della natura dei pigmenti che si vogliono isolare. In tutti i casi, comunque, il materiale verrà omogenato in mortaio in presenza dell'opportuno solvente. I materiali forniti sono costituiti da foglie di spinacio (*Spinacia oleracea*) e filtri di carta su cui sono state raccolte cellule del cianobatterio *Spirulina platensis* (o *Nostoc*).

A1) Estrazione con solventi acquosi

Per verificare la presenza e la natura di pigmenti fotosintetici idrosolubili, il filtro a disposizione viene posto nel mortaio, dove si aggiungono 4 ml di tampone 50 mM K fosfato, pH 8.0; pipettando su e giù, si stacchi il materiale cellulare dal filtro, in modo da poter eliminare quest'ultimo. Si aggiunga quindi 1 g di sabbia di quarzo, e con il pestello si omogenizzi accuratamente la sospensione per almeno 5 minuti. Aliquote da 1.4 ml dell'omogenato così ottenuto vengono trasferite in 2 provette eppendorfs, e centrifugate per 3 min a 13.000 rpm, in modo da sedimentare cellule non rotte e materiale particellare. RICORDATE che nella centrifuga le provette devono essere equilibrate le une contro le altre, in modo da non squilibrare il rotore dall'asse; NON avviate la centrifuga senza aver rimesso prima al suo posto il coperchio! Il supernatante che rimane nella parte superiore della provetta costituisce l'estratto che verrà poi frazionato su colonna.

A2) Estrazione con solventi organici

Chi effettua l'estrazione si infili i guanti messi a disposizione.

Per estrarre i pigmenti di natura idrofobica, dopo aver lavato e asciugato pestello e mortaio, si ponga in questo circa 1 g di foglie di spinacio e si aggiungano 3 ml di metanolo 100%. Si proceda quindi a omogenare (con cautela, per evitare che il solvente schizzi all'intorno...) il materiale, fino alla completa dissoluzione delle strutture foliari; a questo punto si aggiunga ancora 1 ml di metanolo, macerando ancora per 1-2 minuti. Al termine si recuperino 2.8 ml dell'omogenato servendosi delle punte blu tagliate, trasferendo aliquote da 1.4 ml in 2 eppendorfs. Centrifugare 3 min a 13.000 rpm.

Attenzione!: il metanolo è un solvente tossico, va maneggiato con cautela: usate sempre camice e guanti. Bisogna evitare soprattutto di inalare i vapori. Prima di lavare i mortai, si gettino i residui negli appositi contenitori.

B) SEPARAZIONE DEI PIGMENTI MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU COLONNA

Ogni gruppo ha ricevuto uno stativo con una colonnina, in cui sono stati impaccati 3-4 ml di resina DEAE-cellulosa, uno scambiatore di anioni in cui gruppi dietil-amino-etilici carichi positivamente sono legati ad una matrice inerte. Ogni colonnina è stata precedentemente equilibrata in acqua.

B1) Frazionamento dell'estratto acquoso

Si carichi per primo l'estratto in tampone fosfato. Facendo attenzione a non toccare il materiale sedimentato, si recuperi tutto il supernatante ottenuto dopo centrifugazione e lo si ponga all'interno della colonna, stratificandolo molto lentamente con la P1000, così da non risospendere la matrice. Si tolga quindi il tappo della colonnina, lasciando che l'estratto si adsorba alla resina; questa trattiene tutte le molecole che a pH 8.0 sono cariche negativamente. Si eluisca quindi in sequenza con 5 ml di tampone contenente 50 mM NaCl, e poi con 7 ml di tampone contenente 200 mM NaCl, raccogliendo contemporaneamente l'eluato in frazioni da 1.5 ml. Segnate con un pennarello il numero progressivo di ogni frazione, così da poterla riconoscere: dovrete ottenerne 8. Ricordate che ad ogni cambio di eluente bisogna aspettare che il precedente sia completamente entrato in colonna; questa NON DEVE però essere mai lasciata andare a secco: nel caso, bloccate l'uscita con l'apposito tappo.

B2) Frazionamento dell'estratto organico

Una volta terminata la prima separazione, la colonna va nuovamente riequilibrata, facendo passare poco per volta almeno 10-12 ml di acqua. Si proceda quindi con il secondo estratto. Per questo si prelevi una aliquota da 700 µl del supernatante da ognuna delle due eppendorfs e la si trasferisca in altre due provette pulite; si aggiungano in ognuna 700 µl di acqua distillata, così da abbassare la concentrazione del metanolo al 50%. Si carichino i 2.8 ml di preparato risultanti sulla colonna, badando di stratificare molto lentamente l'estratto, così da non risospendere la resina. Le molecole di natura lipofila si complessano per interazione idrofobica con la matrice cellulosica. Si eluisca quindi in sequenza con 12 ml di metanolo 60%, e poi con 12 ml di metanolo 80%, dividendo contemporaneamente l'eluato in frazioni da 1.5 ml. Si dovrebbero in tal modo ottenere 16 frazioni.

Anche in questo caso si rammenti che ad ogni cambio di eluente bisogna aspettare che il precedente sia completamente entrato in colonna; ci si ricordi inoltre di chiudere immediatamente le eppendorfs per evitare una significativa evaporazione del metanolo.

PREPARAZIONE DEL MATERIALE NECESSARIO

Per entrambe le procedure vengono fornite soluzioni concentrate da diluire o da mescolare tra di loro per preparare i diversi eluenti; prima di iniziare, eseguire tutti i calcoli per essere poi in grado di miscelarle opportunamente:

servono	sono a disposizione	
	tampone KPi	tampone + 5 M NaCl
5 ml tampone KPi + 50 mM NaCl		
8 (7+1) ml tampone KPi + 200 mM NaCl		
	metanolo 100%	acqua distillata
13 (12+1) ml metanolo 60%		
13 (12+1) ml metanolo 80%		

C) DETERMINAZIONE DELLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO DEI PIGMENTI ISOLATI

Una volta risolti, se non tutti i pigmenti presenti, almeno le principali tipologie in cui si raggruppano, l'esame della capacità di assorbimento a varie lunghezze d'onda dovrebbe permettere la loro identificazione attraverso il confronto con i dati riportati in Tabella 1. Per fare questo è sufficiente leggere una aliquota dei campioni ottenuti variando la lunghezza d'onda dello spettrofotometro, ricordando però di effettuare sempre l'autozero con un bianco (costituito, rispettivamente, da tampone fosfato + 200 mM NaCl o da metanolo 60 o 80%). Per le frazioni ottenute che contengono pigmenti (e che dovrebbero risultare rispettivamente verdi, giallo-arancio o blu), si legga dunque l'assorbanza variando il monocromatore da 400 a 700 nm, con intervalli di 25 nm. Si effettui la determinazione sulle frazioni in cui il pigmento è più concentrato. Una volta presa nota dei valori, si costruisca un grafico ponendo in ascisse la lunghezza d'onda e in ordinata la stessa assorbanza. Confrontate i dati ottenuti, e trattenete delle conclusioni riguardo alla presenza e al ruolo dei pigmenti nei diversi materiali e nei differenti organismi.



Note per l'esercitatore

Nella separazione cromatografica, i gruppi dietil-amino-etilici trattengono i pigmenti idrosolubili, mentre gran parte di quelli idrofobici si legano alla matrice inerte cellulosa. Al posto delle preziose colonnine di vetro per cromatografia possono essere usate delle semplici siringhe da 10 ml, ponendo al loro interno un disco di carta da filtro per trattenere la resina. Per l'estrazione dei pigmenti possono essere impiegati materiali alternativi. L'uso di foglie verdi permette di evidenziare la presenza di elevate quantità di carotenoidi anche in tessuti in cui solo le clorofille sono immediatamente percepibili. Nella scelta dei cianobatteri, i risultati più eclatanti si ottengono con specie, come *Nostoc*, che contengono sia ficobiline blu che ficoeritrine rosse (attenzione che in questo caso può risultare necessario variare le concentrazioni del sale nell'eluente per ottenere una loro adeguata separazione); *Spirulina* contiene solo ficobiline, ma è virtualmente incontaminabile e facile da crescere in breve tempo.



Verifiche per lo studente

RISULTATI (Da consegnare alla fine dell'esperimento)

Cognome e nome	Campione	Materiale sperimentale	Frazione	Colore
.....	1)
.....	2)
.....	3)

Assorbanza dei campioni alle diverse lunghezze d'onda:

nm	400	425	450	475	500	525	550	575	600	625	650	675	700
Campione 1													
Abs													
Campione 2													
Abs													
Campione 3													
Abs													

Conclusioni: il campione 1 è
 il campione 2 è
 il campione 3 è

Estrazione e caratterizzazione di pigmenti fotosintetici in foglie di spinacio (*paper chromatography*)

Massimo Crimi, Università di Verona

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Mortaio e pestello Centrifuga per eppendorfs Pipettatrici (P200 e P1000) Vaschette	Materiali:	Foglie di spinacio Etanolo, etere di petrolio:acetone 9:1 Carta Whatman 3MM Sabbia di quarzo



Base teorica

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

I componenti una miscela vengono separati in base alla loro diversa distribuzione tra due fasi, quella stazionaria (solida o liquida) e quella mobile (liquida o gassosa). La distribuzione delle sostanze è determinata da fenomeni differenti e quindi vari sono i tipi di cromatografia: di adsorbimento, di ripartizione, di gel filtrazione, etc. Nella *cromatografia su carta* la separazione avviene in base al principio di ripartizione. Il supporto è un foglio di carta, la fase stazionaria l'acqua che permea la cellulosa e la fase mobile il solvente organico. La sostanza viene depositata in vicinanza di un bordo, fatta assorbire, quindi il foglio di carta viene posto in una vasca preequilibrata con il solvente, che quindi migra lungo il supporto per capillarità. A fine corsa la carta viene asciugata e le diverse sostanze vengono identificate in base alla posizione raggiunta. Questa posizione è definita dal parametro Rf che è il rapporto fra la distanza percorsa dalla sostanza e quella percorsa dal solvente. Il valore di Rf è caratteristico di ogni sostanza e dipende dal suo coefficiente di distribuzione fra le due fasi. Il valore di Rf è riproducibile se vengono mantenuti costanti i parametri sperimentali (tipo di supporto, temperatura, composizione del solvente, etc.). La posizione delle singole sostanze è evidenziata o in base alla loro colorazione, o facendo reagire con opportuni reattivi in modo da ottenere prodotti colorati, o osservando il supporto a luce UV.

SPETTROFOTOMETRIA

Lo spettro di assorbimento di una sostanza viene rappresentato come un grafico della luce assorbita (assorbanza) dalla sostanza in funzione della lunghezza d'onda. Per una sostanza colorata il grafico mostra uno o più massimi di assorbimento nella regione del visibile (400-700 nm). Gli spettri di assorbimento nel visibile e nell'ultravioletto sono dovuti a transizioni degli elettroni esterni delle molecole dallo stato fondamentale allo stato energetico immediatamente superiore. Le radiazioni vengono assorbite se l'energia ad esse associata è pari alla differenza di energia fra il livello fondamentale e quello eccitato. Le molecole possiedono una serie di livelli di energia quantizzata e quindi vengono assorbite solo le radiazioni compatibili con i livelli di energia. La forma dello spettro e in particolare la posizione dei massimi di assorbimento sono elementi di identificazione di una certa sostanza ovvero di una certa struttura molecolare.

L'intensità dell'assorbimento ad una certa lunghezza d'onda permette invece di ricavare informazioni di tipo quantitativo. I valori posti in ordinata nella costruzione di uno spettro di assorbimento rappresentano l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda. L'assorbanza o densità ottica o estinzione è definita:

$$A = \log I_0 / I \quad \text{dove} \quad \begin{array}{l} I_0 = \text{intensità della luce che colpisce il campione} \\ I = \text{" " " " trasmessa dal campione} \\ I / I_0 = \text{è definita trasmittanza e quindi } A = \log 1/T \end{array}$$

Secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della soluzione analizzata:

$$A = \epsilon b c \quad \text{dove} \quad \begin{array}{l} b = \text{cammino ottico espresso in cm} \\ \epsilon = \text{coefficiente di estinzione molare} \end{array}$$

Il coefficiente di estinzione molare è definito come l'assorbanza di una soluzione 1M della sostanza in esame ad una data lunghezza d'onda, usando un cammino ottico di 1 cm. Le unità sono definite dalle unità di concentrazione della soluzione e dalle unità della dimensione della cuvetta. Si possono quindi trovare costanti espresse in altre unità, ad esempio riferite a concentrazioni espresse in mg/ml o in %.



Protocollo sperimentale

L'esercitazione consiste nell'isolamento, separazione e identificazione dei pigmenti presenti nell'apparato fotosintetico delle piante. L'isolamento viene effettuato mediante triturazione e macerazione delle foglie in un solvente nel quale le clorofille ed i carotenoidi siano facilmente solubili, nel nostro caso etanolo. La separazione avviene mediante metodo cromatografico su carta, alcuni richiami del quale sono riportati più avanti. L'identificazione dei diversi pigmenti viene effettuata spettrofotometricamente mediante confronto con degli standards di clorofilla a, clorofilla b, β -carotene, luteina, violaxantina e neoxantina. L'esercitazione è divisa in tre parti che consistono nella:

A: Estrazione e purificazione dei pigmenti fotosintetici da foglie di spinacio;

B: Identificazione dei pigmenti estratti dalle foglie di spinacio;

C: Elaborazione delle equazioni per il calcolo della concentrazione di singoli pigmenti presenti in una miscela

NB: durante l'intera procedura gli estratti devono essere per quanto possibile protetti dalla luce (che potrebbe fotodistruggere i pigmenti), chiudendoli sotto il bancone e/o avvolgendoli in stagnola, e dal caldo, tenendoli in ghiaccio.

A. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI DA FOGLIE DI SPINACIO

- Lavare e asciugare le foglie con carta morbida (roll).
- Mettere 0.8-1 g di foglia nel mortaio, aggiungere 1/2 cucchiaino di sabbia di quarzo e macinare aggiungendo 3 ml di etanolo 95% tamponato con sodio carbonato 50 mM. Si usa etanolo in quanto è un buon solvente per i pigmenti e sodio carbonato perchè mantiene un pH basico in cui le clorofille sono stabili. I vacuoli delle piante hanno un contenuto acido che potrebbe trasformare le clorofille in feofitine per la perdita del Mg^{++} al centro dell'anello tetrapirrolico. L'acetone sarebbe un solvente ancora migliore ma scioglie le cuvette di plastica che usiamo per le determinazioni.
- Dopo aver lasciato decantare la sabbia per 1/2 min, trasferire il contenuto del mortaio in eppendorf e centrifugare 3 min a 12000 rpm, equilibrando le eppendorf tra di loro.
- Prelevare il sovrantante con una pipetta Pasteur e trasferirlo in una provetta con tappo a vite coperta con stagnola.
- Sulla carta Whatman 3MM segnare un linea, a matita, a 3 cm dal margine inferiore. Con i capillari prelevare aliquote di estratto e deporle accuratamente sulla carta in corrispondenza della linea segnata così da formare una striscia lunga circa 4 cm. Quando il punto di applicazione è asciutto, ripetere l'operazione, fino ad ottenere una striscia di circa 3 mm di spessore colorata molto intensamente. Riporre l'estratto al buio.
- Preparare una camera da cromatografia versando il solvente (etere di petrolio:acetone nel rapporto 9:1), in modo da raggiungere un'altezza di circa 1.5 cm sul fondo della camera.
- Immergere il bordo inferiore della carta cromatografica facendo attenzione che il solvente non lambisca la linea di origine (la macchia dei pigmenti). Chiudere la camera e lasciare sviluppare il cromatogramma.
- Quando il fronte del solvente ha quasi raggiunto il margine superiore della carta Whatman, togliere il cromatogramma e segnare a matita, circondandole, le bande gialle e verdi. Una volta asciugato il cromatogramma ritagliare le bande, sminuzzarle e, per l'eluizione, immergere ciascuna banda in una provetta distinta contenente 1.5 ml di etanolo 95% tamponato. Per accelerare l'eluizione muovere di tanto in tanto con una bacchetta di vetro. Mantenere al buio.

B. IDENTIFICAZIONE DEI PIGMENTI ESTRATTI DALLE FOGLIE DI SPINACIO

Trasferire l'eluato in eppendorf e centrifugare per 2 min alla max velocità per eliminare eventuali frammenti di carta.

Trasferire il sovrantante in cuvetta e determinare lo spettro di assorbimento della miscela di pigmenti purificati tra 400 e 750 nm.

Identificare i diversi pigmenti per confronto con gli spettri dei pigmenti standard di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi forniti.

Confrontare le lunghezze d'onda di massimo assorbimento.

Clorofilla a	Clorofilla b	β -carotene	luteina	neoxantina	violaxantina
665	647	477	474	467	471
430	454	452	447	438	441



Verifiche per lo studente

C. ELABORAZIONE DELLE EQUAZIONI PER IL CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DI SINGOLI PIGMENTI PRESENTI IN UNA MISCELA

L'assorbanza di una miscela ad una certa lunghezza d'onda è data dalla somma delle assorbanze dei diversi componenti la miscela a quella lunghezza d'onda. È quindi possibile elaborare le equazioni per il calcolo delle concentrazioni per esempio di clorofilla a, clorofilla b e β -carotene risolvendo un sistema a tre incognite.

Conoscendo i coefficienti di estinzione molare di clorofilla a, clorofilla b e β -carotene a 665 nm, 647 nm e 470 nm, formulare un sistema di equazioni a 3 incognite per il calcolo della concentrazione dei singoli componenti.

ϵ_{λ} (mg/ml)	ϵ_{665}	ϵ_{647}	ϵ_{470}
Clorofilla a	83.83	20.96	1.52
Clorofilla b	18.49	46.84	114.4
Carotenoidi	/	/	262.0

- Ripetere il lavaggio del precipitato ancora una volta.
- Risospendere infine il precipitato in 4 ml di tampone.

B) REAZIONE DI HILL

Si comincia con la preparazione delle soluzioni standard di DCIP a diversa concentrazione, che servono per costruire la curva di taratura allo spettrofotometro. Partendo da una soluzione stock di DCIP a concentrazione 110 μM , preparare le seguenti concentrazioni diluendo la soluzione stock con opportuni volumi di tampone tricina 50 mM (tab. 1), tenendo conto che il volume finale della soluzione in ciascun tubo deve risultare pari a 2000 μL . Misurare l'assorbanza di un'aliquota di ciascuna soluzione allo spettrofotometro ($\lambda = 575 \text{ nm}$) e riportare i valori in tab. 1.

Concentrazione DCIP (mM)	0	6,87	13,75	27,5	55	110
DCIP 110 μM (μL)						
Tricina (μL)						
Abs a 575 nm						

Si riportino su un grafico i valori di assorbanza (ordinate) in corrispondenza delle relative concentrazioni di DCIP (ascisse) e si cerchi di tracciare una retta che interpoli i punti individuati. Grazie a questa retta potremo misurare la velocità della fotosintesi che si svolgerà in alcuni dei tubi che andiamo a preparare.

Esperimento di Hill

Collocare un beaker di 3 lt contenente acqua a temperatura ambiente e piazzare lateralmente una lampada da 150 W su uno stand. Successivamente, seguendo lo schema descritto nella tabella sottostante (tab. 2), aggiungere ai tubi i diversi componenti. Sotto luce attenuata con l'aiuto di una siringa o pipetta dosare in ciascun tubo di vetro 2.5 ml di tampone tricina e 2.5 ml della soluzione di DCIP (tubi 2, 3, 4 e 5).

Componenti (ml)	Numero tubi				
	1	2	3 (buio)	4	5
Tampone tricina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.4
Soluzione DCIP		2.5	2.5	2.5	2.5
Acqua distillata	2.5				
Soluzione Terbutilazina					0.1
Sospensione cloroplasti	0.25	0.25	0.25		0.25
Sospensione cloroplasti bolliti				0.25	

Quindi:

- Avvolgere il tubo n°3 con stagnola per impedire l'esposizione alla luce. Aggiungere al tubo n°5 0.1 ml della soluzione di Terbutilazina. Aggiungere infine a tutti i tubi, tranne al n° 4, 0.25 ml della sospensione di cloroplasti e mescolare. Bollire per due minuti un'aliquota della sospensione rimanente di cloroplasti e aggiungere 0.25 ml nel tubo n° 4.
- Porre i tubi a bagno nel beaker da 3 lt. Assicurarli alla tavoletta forata mediante gli anelli in gomma.
- Accendere la lampada e illuminare i tubi (misurare il tempo dall'inizio dell'illuminazione).
- Dopo 15 minuti misurare con lo spettrofotometro l'assorbanza di un'aliquota di ciascun tubo, alla lunghezza d'onda di 575 nm, utilizzando acqua distillata come bianco. Osservare in particolare la diversità di assorbanza della miscela contenente cloroplasti integri rispetto a quella contenente cloroplasti bolliti. Notare inoltre l'effetto del diserbante e metterlo in relazione con il suo meccanismo di azione.
- Dopo la lettura, aggiungere alcuni cristalli di acido ascorbico alla miscela del tubo tenuto al buio e osservare il cambiamento di colore.
- Sottrarre la densità ottica della miscela contenuta nel tubo n° 1 (dovuta essenzialmente all'assorbimento da parte dei pigmenti verdi del cloroplasto) da quella degli altri tubi e riportare i valori in tab. 3.

ASSORBANZA (ABS) a 575 nm					
N° Tubo	Abs	Abs tubo 1	Differenza Abs	μM DCIP	μM DCIP ridotto
1				0	-
2					
3 (buio)					
4 (cl. bolliti)					
5 (erbicida)					

- Calcolare la concentrazione del DCIP nei tubi 2, 3, 4 e 5 (per il tubo n° 3 il valore teorico sarebbe 55 μM , ma si possono avere valori differenti a causa di un'imperfetta protezione dalla luce) e riportare i valori in tab. 3. Per questa operazione ci serviamo della curva di taratura precedentemente costruita.



Verifiche per lo studente

Calcolare la velocità di fotosintesi, espressa in μmoli di DCIP ridotte per minuto. Per questo calcolo bisogna innanzitutto determinare la concentrazione del DCIP che è stato ridotto nel periodo di illuminazione, che è data dalla differenza fra la concentrazione iniziale ($55 \mu\text{M}$) e quella finale (al termine dell'illuminazione) del DCIP:

$$[\text{DCIP}]_{\text{rid}} = [\text{DCIP}]_{\text{iniz}} - [\text{DCIP}]_{\text{fin}} = 55 \mu\text{M} - X$$

La $\mu\text{molarità}$ così determinata, riportata in tab. 3, è un valore di concentrazione ed esprime quindi il numero di μmoli in 1000 mL di soluzione. Per i nostri calcoli dobbiamo però conoscere il numero di μmoli (10^{-6}) o di nmoli (10^{-9}) di DCIP che sono state ridotte nei volumi di miscela contenuta nei tubi (volume che approssimiamo a 5 mL per ciascun tubo). La $\mu\text{molarità}$ viene trasformata in numero di μmoli (per 5 mL) mediante la seguente proporzione:

$$\mu\text{M} : 1000 \text{ mL} = X \mu\text{moli} : 5 \text{ mL}$$

La velocità di fotosintesi (V) si calcola dividendo le X μmoli (o nmoli) di DCIP che sono state ridotte per i minuti di illuminazione (T):

$$V = X \mu\text{moli DCIP}_{\text{rid}} / T = \mu\text{mol min}^{-1}$$

In modo analogo potremmo ad esempio misurare la velocità di fotosintesi in relazione a condizioni diverse, come la temperatura o l'intensità luminosa.

DOMANDE

- 1) Spiegare l'effetto causato dalla Terbutilazina sulla reazione di Hill.
- 2) Perché cambia il colore della miscela tenuta al buio quando viene aggiunto acido ascorbico?
- 3) Spiegare perché soltanto nel tubo 2 si verifica la reazione di Hill
- 4) Qual è la relazione fra trasporto elettronico nei tilacoidi e sintesi di ATP?

Misura del flusso fotosintetico di elettroni in cloroplasti isolati di spinacio (reazione di Hill con K ferricianuro)

Giuseppe Forlani, Università di Ferrara

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Centrifuga per provette da 50 ml Spettrofotometro VIS Lampada Pipettatrici (P200 e P1000) Vaschette per acqua (Magenta) Frullatore	Materiali:	Foglie di spinacio Tampone isototonico e ipototonico, garza Acetone K ferricianuro, atrazina Eppendorfs e puntali Cuvette monouso di metacrilato



Base teorica

Il diserbo chimico

Da quando l'uomo si è accinto a dissodare il terreno per aumentarne la produttività si è andato sempre più deteriorando l'equilibrio fitosociologico esistente, condizionato sino ad allora pressochè solo da fattori pedoclimatici. Si è venuta così a selezionare nel tempo una flora spontanea, spesso ridotta nel numero di specie, in grado di avvalersi delle lavorazioni e di tutte le pratiche agronomiche più diverse, in misura anche maggiore delle piante oggetto di coltivazione. Senza i naturali competitori, queste specie hanno conquistato progressivamente spazio, creando seri problemi alle colture agrarie per la lotta per i fattori biologici (luce e spazio), la competizione per l'acqua e le sostanze nutritive, nonché per la secrezione di tossine. Esse costituiscono inoltre il veicolo per l'infestazione da parte di numerosi parassiti. Il danno che tutto questo insieme di fattori è in grado di determinare sulla produttività delle colture è enorme, quantificabile tra il 10 e il 25% della resa potenziale. Per questo l'uomo ha cercato e cerca soluzioni in grado di ovviare, con il minimo aggravio e la massima resa, a questo stato di cose. Negli ultimi 50 anni l'approccio al problema delle infestanti è stato radicalmente modificato dall'introduzione dei diserbanti. Per diserbanti o erbicidi si intendono tutte quelle sostanze chimiche provviste di azione tossica nei confronti delle piante e in grado di distruggerle, o comunque danneggiarle, ogni qual volta ne vengano a contatto. Ovviamente una simile caratteristica è necessaria ma non sufficiente: per poter essere impiegato a questo scopo un composto deve:

- possedere una bassa tossicità acuta nei confronti dell'uomo e degli animali
- avere una sufficiente stabilità una volta disperso nell'ambiente
- esercitare una azione selettiva sulle infestanti senza influire sulla resa finale della coltura.

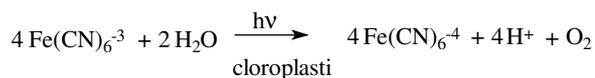
Sostanze in grado di interferire con processi metabolici peculiari delle piante rappresentano quindi dei candidati potenzialmente ideali per questo scopo. Il meccanismo d'azione della maggior parte degli erbicidi di prima generazione si esplica in effetti attraverso l'alterazione di uno degli aspetti del processo fotosintetico. Ad esempio le triazine bloccano il flusso di elettroni tra il PSII e il PSI inserendosi nella tasca del plastochinone a livello della proteina D1, impedendo la riduzione dei chinoni.

Come misurare il processo fotosintetico per trovare inibitori del flusso di elettroni

Nel 1937 l'inglese R. Hill scoprì che un omogenato di foglia è in grado di emettere ossigeno se viene illuminato in presenza di un sale ferrico come l'ossalato. Nel 1944 O. Warburg dimostrò che anche il *p*-benzochinone può essere ridotto da una preparazione grezza di cloroplasti illuminati, con conseguente emissione di ossigeno. Qualche anno dopo si poté infine dimostrare sperimentalmente la riduzione fotosintetica del NADP⁺ da parte dei cloroplasti. A partire dal 1954, quando per la prima volta si riuscì ad ottenere un preparato di cloroplasti intatti e funzionali, poté essere evidenziato come il sistema in grado di svolgere ossigeno sia localizzato nella frazione particolare (non solubile) dell'organulo, il cosiddetto sistema tilacoidale, ottenibile per semplice shock osmotico dai cloroplasti intatti. Si dimostrò quindi che il sistema di fissazione dell'anidride carbonica (cioè gli enzimi del ciclo di Calvin) può essere separato dalle reazioni foto-dipendenti della fotosintesi. Il sistema tilacoidale dei cloroplasti è dunque in grado di catalizzare la cosiddetta reazione di Hill, definita come la fotoreduzione di un accettore di elettroni a spese dell'acqua (che libera il prodotto dell'ossidazione, l'ossigeno molecolare).

In vivo l'accettore finale di elettroni è il NADP⁺, che questi giungono a ridurre dopo essere passati lungo una catena di trasportatori; il passaggio degli elettroni è stechiometricamente accoppiato alla produzione di ATP che si basa sulla traslocazione di protoni tra lo stroma e il lumen. *In vitro* se ad una preparazione di cloroplasti si aggiunge sotto illuminazione un accettore di elettroni non fisiologico, questo, inserendosi in un punto della catena di trasporto degli elettroni determinato dal proprio potenziale di ossidoriduzione, può essere dunque ridotto da uno dei componenti della catena, anche senza poi partecipare a tutto il processo. La reazione di Hill può essere misurata usando come materiale sperimentale cloroplasti preparati da foglie di spinacio o di lattuga attraverso l'evoluzione di ossigeno

monitorata per mezzo di un ossigrafo. Questo strumento è però costoso e relativamente poco sensibile. In alternativa allo stesso fine è possibile sfruttare il cambiamento di assorbanza causato dalla riduzione di alcuni accettori come il ferricianuro di potassio, variazione che può essere facilmente valutata con uno spettrofotometro.



La riduzione del ferricianuro di potassio

Infatti il ferricianuro, un composto giallo-arancio, una volta ridotto cambia le sue proprietà spettroscopiche, non assorbe più a 420 nm, e in soluzione vira dal giallo all'incolore. Seguendo l'andamento nel tempo dell'assorbanza è possibile dunque calcolare la velocità di riduzione del ferricianuro, sapendo che il suo coefficiente di estinzione molare è 1000 U.O. $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Per le sue peculiari proprietà, inoltre, non cede a sua volta l'elettrone a un trasportatore a valle della sequenza, ma interrompe il flusso nello schema a Z. Il ferricianuro si inserisce nella sequenza di trasportatori di elettroni subito a valle del PSI; se dunque in soluzione si aggiunge un altro composto in grado di inserirsi nel trasporto fotosintetico di elettroni tra i due fotosistemi, questi verranno intercettati prima di giungervi, e il ferricianuro non sarà più ridotto. In questo modo è dunque possibile determinare sperimentalmente la capacità di un nuovo composto di sintesi di interferire con il processo fotosintetico.



Protocollo sperimentale

A) PREPARAZIONE E LISI DEI CLOROPLASTI

Foglie di spinacio vengono lavate in acqua corrente, private della nervatura centrale, pesate e tagliate grossolanamente con una forbice; dopo averle lasciate 10 min in acqua e ghiaccio sono poste in un frullatore insieme a circa 2 ml g^{-1} di tampone isototonico (tricina-NaOH 30 mM pH 8.0, saccarosio 0.4 M, NaCl 10 mM e MgCl_2 5mM). Sia il tampone che la coppa del frullatore devono essere stati precedentemente portati a 0°C. Si frulla questo preparato alla velocità massima per 20-30 sec e si filtra l'omogenato attraverso 2 strati di garza in una beuta mantenuta in ghiaccio. Si trasferisce quindi il preparato ottenuto in provette da 50 ml, e si centrifuga per 10 min a 1500 g in una centrifuga refrigerata a 4°C. Si elimina quindi il supernatante, mentre il pellet viene risospeso in circa 10 ml di tampone ipotonico (come il precedente, ma senza saccarosio), determinando la lisi degli organuli; la risultante sospensione viene diluita subito 1:1 con tampone isototonico. I cloroplasti così ottenuti hanno perso lo stroma, ma mantengono l'integrità dei tilacoidi a livello della cui membrana avviene il trasporto fotosintetico di elettroni.

B) MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI CLOROFILLA

Ogni gruppo riceve una provetta contenente i cloroplasti lisati. Il preparato deve essere mantenuto il più possibile al buio e in ghiaccio mentre se ne misura la concentrazione di clorofilla. Una aliquota da 20-50 μl viene trasferita in una cuvetta e diluita con acetone 80% ad un volume finale di 1 ml. Dopo aver accuratamente mescolato tenendo sigillata la cuvetta con un pezzo di parafilm, si legge l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 645 e 663 nm contro un bianco costituito da acetone 80%. Le letture devono essere inferiori a 0.8 di assorbanza, altrimenti si deve ulteriormente diluire il campione sino a rientrare in questo limite. La concentrazione di clorofilla nel preparato diluito si ottiene poi dalla seguente formula di Arnon:

$$\mu\text{g ml}^{-1} \text{ di clorofilla} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

C) MISURA DELLA RIDUZIONE DEL FERRICIANURO

Dopo aver calcolato la concentrazione di clorofilla nel preparato a disposizione, si allestono dei campioni per misurare la velocità del processo fotosintetico nei tilacoidi illuminati. In cuvette di metacrilato in un volume finale di 1 ml si pongono le opportune quantità delle soluzioni stock in modo da ottenere le concentrazioni desiderate, portando a volume con tampone. Mettere nell'ordine: tampone, accettore, (eventualmente l'inibitore) e i cloroplasti:

Sostanza	Concentrazione sol. stock	concentrazione finale	diluzione da effettuare	$\mu\text{l ml}^{-1}$	❶	❷	❸
ferricianuro	20 mM	1 mM				✓	✓
atrazina	0.1 mM	0.005 mM					✓
cloroplasti		25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			✓	✓	✓
tampone			quanto basta a 1 ml =				

Ogni gruppo prepara inizialmente 3 cuvette: ❶, il bianco in cui il ferricianuro è omissso; ❷, il campione di controllo in cui è misurata la velocità di trasporto degli elettroni; ❸, il controllo negativo con un erbicida commerciale di riferimento, in cui la riduzione del ferricianuro dovrebbe essere del tutto bloccata. Il preparato di cloroplasti (N.B.: NON la diluizione in acetone!!) viene messo per ultimo in modo da raggiungere una concentrazione di clorofilla nella cuvetta pari a 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Determinare immediatamente il valore del tempo 0 leggendo a 420 nm i campioni contro il bianco. Se si è operato bene il valore dovrebbe aggirarsi intorno a 1.0.

L'accensione della lampada dà il via alla riduzione del ferricianuro, che viene seguita leggendo i campioni allo spettrofotometro a intervalli di 2 min. Ogni volta lo strumento viene calibrato con il bianco, che fornisce il valore dell'assorbanza di tutte le altre sostanze presenti e che, sottratto, permette di calcolare il valore dovuto al solo ferricianuro. Usare sempre lo stesso spettrofotometro.

Tra una lettura e la successiva i campioni vanno messi a una distanza di 5 cm dalla vaschetta-schermo che a sua volta viene posizionata a 5 cm dalla lampada. Al momento di eseguire la lettura, togliendo i campioni dalla luce, si deve arrestare il cronometro che verrà fatto ripartire solo nel momento in cui si riposizionano i campioni stessi davanti alla lampada, a lettura eseguita. Prima di ogni lettura invertire la cuvetta un paio di volte dopo averla chiusa con un pezzetto di parafilm per mescolare bene il campione. Prima di ogni coppia di letture ricalibrare lo strumento con il bianco.

D) CALCOLO DELLA VELOCITÀ DEL FLUSSO FOTOSINTETICO DI ELETTRONI

Dai dati sperimentali bisogna ricavare un unico risultato quantitativo che rappresenti un indice della velocità della catena di trasporto degli elettroni. A questo fine si costruisce un grafico cartesiano in cui in ascissa viene posto il tempo in minuti, e in ordinata l'assorbanza. Dopo aver tracciato una retta che interpoli al meglio i dati ottenuti, si scelgano su di essa 2 punti da cui portare le perpendicolari ai due assi. Si individua in tal modo un δ di assorbanza in un δ di tempo. Il loro rapporto rappresenta la diminuzione media di assorbanza per minuto. Da questa si ricavi il numero di nmol ridotte per secondo (utilizzando il coefficiente di estinzione molare $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Si rapporti infine il dato ottenuto per $25 \mu\text{g}$ a 1 mg di clorofilla. L'unità di misura dell'attività sarà in nkat (= nmol sec^{-1}) mg^{-1} . L'attività del controllo dovrebbe essere compresa tra i 30 e i 60 nkat mg^{-1} .

E) VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ INIBITORIA DI COMPOSTI IGNOTI

Una volta standardizzate in tal modo le caratteristiche del sistema di controllo, ripetere la procedura preparando altri 3 campioni: il bianco ④, e due campioni ⑤ e ⑥, che contengano ciascuno uno dei due composti di cui si vuole verificare il potenziale quale inibitore del flusso fotosintetico. Considerate che non tutti i gruppi ricevono gli stessi composti.

Sostanza	concentrazione soluzione stock	concentrazione finale	diluzione da effettuare	$\mu\text{l ml}^{-1}$	④	⑤	⑥
ferricianuro	20 mM	1 mM				✓	✓
inibitore A	0.1 mM	0.005 mM				✓	✓
inibitore B	0.2 mM	0.005 mM				✓	✓
inibitore C	0.05 mM	0.005 mM				✓	✓
cloroplasti		$25 \mu\text{g ml}^{-1}$			✓	✓	✓
tampone			quanto basta a 1 ml =				

Dopo aver nuovamente tracciato dei grafici per calcolare nelle rispettive condizioni sperimentali la velocità del processo in nkat mg^{-1} , valutate i composti a confronto dell'erbicida commerciale (atrazina).



Note per l'esercitatore

L'esercitazione, che richiede nel suo complesso circa 4 ore, può essere notevolmente semplificata dal punto di vista dell'esecuzione e accorciata di 1 ora se l'esercitatore prepara la sospensione di cloroplasti 1-2 ore prima dell'inizio del laboratorio, fornendone poi delle piccole aliquote, tenute al buio in ghiaccio, ai diversi gruppi di studenti. Come composti ignoti possono essere forniti altri erbicidi, oppure semplicemente atrazina, ma a concentrazioni a cui dia un effetto rispettivamente forte, medio o nullo.



Verifiche per lo studente

RISULTATI (Da consegnare alla fine dell'esperimento)

Cognome e nome: Diluizione in acetone A_{645} A_{663}
 [] della clorofilla nel preparato

Diminuzione dell'assorbanza a 420 nm (indicare quali erano i composti testati in ⑤ e ⑥):

Abs	T = 0	2	4	6	8	10	12	14	16 min
②									
③									
⑤									
⑥									

Attività di riduzione del ferricianuro in $\text{nmol sec}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ di clorofilla:	②		③		⑤		⑥	
		100%		%		%		%

Valutazioni:

- Il composto A: non è un inibitore è un ottimo inibitore è un mediocre inibitore
 Il composto B: non è un inibitore è un ottimo inibitore è un mediocre inibitore
 Il composto C: non è un inibitore è un ottimo inibitore è un mediocre inibitore

Fotoprotezione e *photobleaching* delle antenne del PSII

Massimo Crimi, Università di Verona

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4 persone
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Pipettatrici (P20, P200 e P1000)	Materiali:	Tampone Hepes 10 mM contenente 0.06% dodecilmaltoside (DM) LHC (antenne purificate del PSII): 223 µM chl; Triton X-100 20% Catalasi 4 mg/ml Glucosio ossidasi 10 mg/ml



Base teorica

Ruolo fondamentale delle proteine antenna, oltre alla raccolta della luce e al trasferimento dell'energia di eccitazione, è la fotoprotezione. Questo meccanismo si basa sulla capacità di allontanare l'eccesso di energia di eccitazione attraverso la dissipazione termica. Le molecole coinvolte in questo processo sono le clorofille e i carotenoidi. In eccesso di luce le clorofille vengono eccitate dallo stato fondamentale allo stato di singoletto e di tripletto. Le clorofille tripletto sono specie molto reattive che venendo a contatto con l'ossigeno molecolare lo eccitano ad ossigeno singoletto, molecola a sua volta estremamente reattiva che può ossidare le clorofille rompendo l'anello porfirinico, con conseguenti gravi danni per l'intero fotosistema. Quando però sono presenti delle molecole di carotenoide, alla giusta distanza e orientazione, le clorofille tripletto possono cedere a questi pigmenti l'energia di eccitazione che viene quindi dissipata come calore (trapping) senza che ci sia la formazione di ossigeno singoletto. I carotenoidi sono in grado anche di reagire con l'ossigeno singoletto facendolo decadere allo stato fondamentale e contemporaneamente dissipando sotto forma di calore l'energia (scavenging). Un ruolo fondamentale in questo meccanismo gioca anche la proteina che grazie alla sua struttura tridimensionale è in grado di mantenere nella corretta posizione le clorofille ed i carotenoidi coordinati che possono quindi interagire. Scopo della esercitazione è fornire delle prove riguardanti il ruolo dei pigmenti e del corretto folding della proteina nella fotoprotezione nonché l'azione diretta dell'ossigeno nei danni da fotoossidazione.

Esamineremo come primo punto l'effetto della forte illuminazione su un campione contenente le antenne del fotosistema II e vedremo come l'eccesso di luce su proteine correttamente ripiegate provocherà solo dei danni limitati che si evidenzieranno in una piccola diminuzione dello spettro di assorbimento.

Quando la proteina sarà invece preventivamente denaturata (anche se non in modo completo) da un detergente (Triton X-100) le clorofille non saranno più correttamente orientate, i carotenoidi saranno staccati dalla molecole e di conseguenza la forte illuminazione provocherà la fotodistruzione delle clorofille che non assorbiranno più (*photobleaching*: le clorofille scolorano).

L'evidenza che l'ossigeno è il responsabile dei danni da fotoossidazione sarà fornita dall'esperimento condotto nelle medesime condizioni descritte sopra (cioè in assenza e in presenza di Triton X-100) e di un sistema enzimatico accoppiato in grado di eliminare l'ossigeno nella soluzione. Lavoreremo cioè in presenza degli enzimi glucosio ossidasi e catalasi. Il primo ossiderà il glucosio e per tornare in forma ridotta consumerà l'ossigeno molecolare sciolto nella soluzione producendo H₂O₂ (acqua ossigenata: anche questo prodotto è tossico) che sarà poi scissa dalla catalasi in H₂O e O₂, ossigeno nuovamente consumato dalla glucosio ossidasi. L'ossigeno così intrappolato non sarà più disponibile in soluzione. Anche la forte illuminazione non provocherà più il danno alle clorofille.



Protocollo sperimentale

Preparare e caratterizzare allo spettrofotometro i seguenti campioni:

Campione 1: controllo	980 µl Tampone con DM 0.06% 20 µl Proteine LHC
	Registrare lo spettro di assorbimento nella regione compresa tra 350 e 750 nm. Illuminare 5 minuti e ripetere lo spettro.
Campione 2: controllo in assenza di O ₂	950 µl Tampone con DM 0.06% 20 µl Proteine LHC 10 µl Catalasi 20 µl Glucosio ossidasi qualche granello di glucosio
	Registrare lo spettro di assorbimento nella regione compresa tra 350 e 750 nm. Illuminare 5 minuti e ripetere lo spettro.

Campione 3: alta concentrazione di detergente	10 µl Tampone con DM 0.06%
	20 µl Proteine LHC
	10 µl Triton X-100
Incubare 5 minuti a temperatura ambiente; diluire con	960 µl di tampone
Registrare lo spettro. Illuminare 5 minuti e poi leggere di nuovo lo spettro.	
Campione 4: alta concentrazione di detergente in assenza di O ₂	10 µl Tampone con DM 0.06%
	20 µl Proteine LHC
	10 µl Triton X-100
Incubare 5 minuti a temperatura ambiente; diluire con	930 µl di tampone
	10 µl Catalasi
	20 µl Glucosio ossidasi
	qualche granello di glucosio
Registrare lo spettro. Illuminare 5 minuti e poi leggere di nuovo lo spettro.	



Note per l'esercitatore

Numerosi protocolli sono a disposizione sul Web per la preparazione delle antenne purificate del PSII. Si veda ad esempio <http://www.jbc.org/cgi/content/full/277/25/22750>.



Verifiche per lo studente

Lo studente esamini accuratamente gli spettri ottenuti, interpretando i risultati sulla base delle proprie conoscenze e degli elementi forniti nella parte teorica introduttiva. Sono coerenti i dati con le ipotesi di partenza?

Determinazione dell'attività dell'anidraasi carbonica periplasmica di *Dunaliella salina*

Mario Giordano, Università Politecnica delle Marche

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:		Eseguibilità per gruppi:	
Strumentazione:	pHmetro agitatore magnetico	Materiali:	tampone fosfato pH 8.36 (reso isoosmotico rispetto al mezzo di coltura con NaCl) soluzione satura di CO ₂ (isoosmotica) sospensione cellulare concentrata di <i>D. salina</i> (circa 1 x 10 ⁷ cellule ml ⁻¹)



Base teorica

Molti organismi acquatici “si affidano esclusivamente alla diffusione della CO₂ per ottenere il substrato della fotosintesi. Altre specie, tuttavia, hanno sviluppato dei meccanismi per migliorare l'efficienza dell'utilizzo del carbonio e per sopprimere la fotorespirazione. Le concentrazioni di HCO₃⁻ nell'acqua sono spesso molte volte superiori ai livelli di CO₂, e la capacità di utilizzare questa fonte di carbonio supplementare è stata evidenziata in un'ampia gamma di macrofite acquatiche. Nonostante che ciò sia dimostrato in poche specie, è generalmente accettato che l'HCO₃⁻ sia trasportato attivamente e che quindi elevati livelli di CO₂ si instaurino in prossimità della Rubisco, con il risultato che l'attività ossigenasica sia soppressa. Siccome in alcune specie è stata trovata una anidraasi carbonica esterna, diversi autori hanno ipotizzato il suo coinvolgimento nell'aumentare la disponibilità o di CO₂ o di HCO₃⁻ per le cellule” (Dennis, Turpin, Lefebvre, Layell, *Metabolismo vegetale*, Ed. Calderini). La reazione catalizzata dall'anidraasi carbonica è la seguente:



Protocollo sperimentale

A) DETERMINAZIONE DEL TASSO NON CATALIZZATO DI CONVERSIONE DELLA CO₂ IN HCO₃⁻ (t₀)

- Aggiungere 5.8 ml tampone Pi + 0.2 mL mezzo di coltura nel recipiente di saggio. Il recipiente di saggio conterrà un magnete e sarà posto in ghiaccio, su un agitatore;
- Inserire l'elettrodo per pH nel recipiente di saggio. Assicurarsi che il magnete non tocchi l'elettrodo e che l'elettrodo sia sufficientemente coperto dalla soluzione;
- Attendere alcuni minuti perché la temperatura sia omogenea in tutta la soluzione;
- Verificare che il pH sia stabile;
- Avviare la reazione per aggiunta rapida e in unica soluzione di 1 ml di soluzione satura di CO₂;
- Determinare il tempo necessario (t₀) ad avere una variazione del pH di una unità (es. da pH 8.0 a pH 7.0). Ripetere la procedura un numero adeguato di volte (n ≥ 5) per avere un dato statisticamente significativo.

B) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ PRESENTE NEL CAMPIONE (t_c)

Per valutare la velocità enzima-dipendente della conversione della CO₂ in HCO₃⁻ (n ≥ 5) la procedura è la medesima utilizzata per la determinazione dei tassi non catalizzati, salvo il fatto che nel recipiente di saggio andranno aggiunti 5.8 ml di tampone fosfato + 0.2 ml di sospensione cellulare.



Verifiche per lo studente

Calcolare media e deviazione standard delle repliche ottenute nei due casi. L'attività della anidraasi carbonica periplasmica potrà poi essere ricavata ed espressa in unità Wilbur-Anderson (UAW) applicando la seguente relazione:

$$\text{attività (UAW)} = 10 [(t_{0 \text{ media}} / t_c) - 1]$$

Analisi della composizione proteica delle membrane fotosintetiche durante l'inverdimento mediante tecniche elettroforetiche e di immunoblotting

Massimo Crimi, Università di Verona

Difficoltà:	☞☞☞	Durata:	☞☞☞☞ + ☞☞☞☞
Eseguibilità in una giornata:	⊗ (2 giorni)	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Apparato per elettroforesi, alimentatore Mortaio e pestello, azoto liquido Apparato per elettrotrasferimento	Materiali:	Soluzioni preparate come indicato Anticorpi contro polipeptidi delle membrane fotosintetiche



Base teorica

L'esercitazione ha per scopo quello di completare la caratterizzazione dello sviluppo dell'apparato fotosintetico durante il passaggio dal buio alla luce. Ci sono molti modi per analizzare la composizione proteica di una preparazione biochimica ma quello più largamente usato è certamente il metodo dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE). In questa esperienza ci proponiamo di analizzare la composizione in polipeptidi di un estratto totale di foglie in termini di numero e quantità relativa dei polipeptidi contenuti in esse. Ci proponiamo inoltre di calcolare il peso molecolare apparente dei polipeptidi di interesse attraverso la comparazione della loro mobilità elettroforetica con quella di un certo numero di proteine di peso molecolare noto. La procedura sperimentale per queste due misure è la stessa per cui si effettuerà un solo esperimento andando poi ad analizzare separatamente i dati per ottenere i due tipi di informazione.

SDS-PAGE

Le proteine sono cariche, ad un pH diverso dal loro punto isoelettrico, e quindi migrano in un campo elettrico in maniera dipendente dalla loro densità di carica. Se il campione è inizialmente presente in una zona stretta, proteine di mobilità diversa migreranno come bande discrete e quindi si separeranno. Nonostante l'elettroforesi possa essere effettuata in fase libera, i risultati migliori si ottengono usando un supporto che limiti la diffusione e faciliti l'evidenziazione delle proteine risolte. Il supporto migliore per separare proteine di PM compreso tra 2000 e 200.000 daltons è un gel di poliacrilamide. Durante l'elettroforesi le proteine migrano in base alla loro densità di carica e al loro PM. Con un particolare accorgimento si può eliminare l'influenza della densità di carica ed ottenere quindi una separazione esclusivamente in base al PM. Questo consiste nell'aggiungere alla proteina il detergente carico sodio-dodecil-solfato (SDS) il quale si lega a tutte le proteine in misura di 1.4 g per g di proteina aggiungendo così un tale numero di cariche negative da rendere trascurabili le differenze di carica dovute alle sequenze amminoacidiche.

WESTERN BLOTTING E IMMUNO RIVELAZIONE

In una miscela di proteine, come un estratto cellulare, si possono identificare uno o più polipeptidi sfruttando la specificità di legame con un anticorpo. Gli anticorpi, o immunoglobuline, sono glicoproteine sintetizzate dal sistema immunitario (nei vertebrati) in risposta allo stimolo "estraneo" prodotto da antigeni quali molecole proteiche, polisaccaridiche, ecc. Il gruppo riconosciuto dall'anticorpo è chiamato epitopo o determinante antigenico. Le proteine che compongono la miscela da analizzare devono essere preventivamente separate mediante gel elettroforesi (in SDS) quindi, per renderle accessibili alle molecole di anticorpo, devono essere trasferite dalla matrice che compone il gel su un supporto che generalmente è costituito da una membrana di nitrocellulosa o nylon. Abitualmente si usa una procedura di trasferimento attraverso un campo elettrico (elettroblotting). Poichè la struttura della membrana è predisposta per legare proteine, onde evitare che le immunoglobuline interagiscano con i siti non occupati dalle proteine trasferite, è necessario saturarla mediante un polipeptide (albumina di siero bovino o da latte scremato) che l'anticorpo non è in grado di riconoscere. Per permettere il riconoscimento ed il legame tra l'anticorpo e la proteina specifica è necessario incubare per un certo intervallo di tempo la membrana con una soluzione contenente l'anticorpo stesso. Dopo che la quota non legata viene allontanata mediante dei lavaggi, si passa alla rivelazione. Fino a qualche tempo fa gli anticorpi che si usavano venivano preventivamente marcati radioattivamente così da permettere l'identificazione diretta mediante autoradiografia. Attualmente si preferisce usare un metodo indiretto che consiste in una seconda reazione di riconoscimento anticorpale (si usa una immunoglobulina che riconosce il tipo di anticorpo, specie specifica) accoppiata ad una reazione enzimatica colorimetrica. Questo secondo anticorpo infatti è coniugato ad un enzima (fosfatasi alcalina o perossidasi) che in presenza dei substrati adatti produce una reazione colorata a livello della banda proteica riconosciuta.



Protocollo sperimentale

A) SDS-PAGE

Preparare o fornire allo studente le seguenti soluzioni madre:

- Acrilamide/bisacrilamide (30%): 29.2% acrilammide, 0.8% bisacrilammide. Filtrare e conservare a 4°C al buio.
- 0.625 M Tris-HCl, pH 8.8, 16% saccarosio. Conservare a 4°C
- 0.5M Tris-HCl, pH 6.8. Conservare a 4°C
- Tampone per la solubilizzazione del campione:
H₂O distillata, 4.2 ml; 0.5 M Tris pH 6.8, 1.0 ml; glicerolo, 0.8 ml; 10% SDS, 1.6 ml; β-mercaptoetanol, 0.4 ml
Inibitori proteasi: PMSF 100 mM, 0.2 ml/100 ml; ac. amm. capr. 500 mM, 1 ml/100 ml; benzamidina 100 mM, 1 ml/100 ml
- Tampone di corsa (5 volte concentrato): Tris- base, 9 g; glicina, 43.2 g; SDS, 3 g; a 600 ml con H₂O
- APS 10% (ammonio persolfato), preparato fresco

Per preparare un gel discontinuo al 12% di acrilammide, mescolare in un becker i seguenti componenti:

separating gel:		stacking gel:	
0.625 M Tris pH 8.8, 16% saccarosio	6.0 ml	0.5 M Tris pH 6.8	1.25 ml
Acrilamide/Bis 30%	4.0 ml	Acrilamide/Bis. 30%	0.65 ml
APS 10%	50 µl	APS 10%	25 µl
TEMED	5 µl	Temed	5 µl
		acqua distillata	3.15 ml

Mescolare bene le soluzioni in becker, su un agitatore magnetico. Aggiungere APS e TEMED e versare tra le lastre di vetro con l'automatica (facendo attenzione a non fare bolle) la soluzione di acrilammide al 12% fino a 1 cm dalla fine dei pozzetti (segnare con il pennarello dopo aver inserito il pettine). Su questa soluzione si mette dolcemente con l'automatica un po' di H₂O, che poi viene eliminata aiutandosi, caso mai, con un po' di carta. In seguito si stratifica, senza mescolare, un po' della soluzione del gel superiore, dopo di che si inserisce il pettine fino a che i denti sono completamente immersi nel gel e si rabocca con l'automatica. A questo punto si attende per circa 25 min finchè il tutto polimerizza. Una volta che il gel si è polimerizzato si toglie il gel, assieme alle lastre di vetro, dal supporto di polimerizzazione e si monta sull'apparato da elettroforesi. Si posiziona la griglia con i pozzetti disegnati come riferimento per il caricamento e si estrae il pettine, facendo attenzione a non rompere i pozzetti che si sono formati. Si lavano i pozzetti con H₂O e si riempie la camera con il tampone di corsa in modo che i pozzetti siano completamente riempiti. Il gel è ora pronto per la corsa. A questo punto si possono caricare i campioni da analizzare.

Preparazione del campione

Piante di mais sono state fatte crescere al buio e poi esposte alla luce per tempi diversi (0, 1, 5 e 24 ore).

- Pesare le foglie (circa 30 mg), immergerle in azoto liquido ed attendere alcuni secondi. Nel mortaio pestarle, sempre sotto azoto liquido, fino ad ottenere una polvere omogenea. Trasferire il tutto in un tubo eppendorf, aggiungere 1 ml di tampone di solubilizzazione. Mescolare e vortexare vigorosamente.
- Centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm e trasferire il sovrantante in un tubo pulito. Aggiungere 3 µl di colorante (blu di bromofenolo).
- Di ciascun campione preparare 1 tubo con circa 100 µl.
- Mettere per 3 minuti in forno a micro-onde a denaturare insieme ai tubi contenenti i marcatori di peso molecolare.
- Raffreddare e caricare il gel. Il volume massimo che è possibile caricare nei pozzetti è di circa 20 µl. I pozzetti laterali non hanno di solito una migrazione perfetta per cui si lasciano vuoti.

Una volta caricato il gel, collegare l'apparato all'alimentatore e impostare un voltaggio costante di 200 V. Dopo circa 45 min il colorante dovrebbe essere giunto al limite inferiore del gel. A questo punto si smontano le lastre. Metà del gel viene colorata come descritto sotto, mentre l'altra metà viene preparata per l'elettroblotting.

Colorazione

Le proteine separate nel gel vengono evidenziate mediante colorazione con un colorante selettivo per le proteine: il blu Coomassie. Il gel, in una scatola dotata di coperchio, viene immerso nella soluzione di colorazione (0.1% di Coomassie blue R 250 in 40% metanolo e 10% acido acetico) per circa 30 minuti. L'eccesso di colorante non legato alle proteine viene eliminato lavando con la soluzione di decolorazione (40% metanolo e 10% acido acetico). Dopo 15' appaiono le bande proteiche osservando al transilluminatore.

B) WESTERN BLOTTING

- Immergere il gel nel tampone di trasferimento (20 mM TRIS/HCl pH 8.8, 152 mM glicina, 20% metanolo) per ottenere l'equilibratura con la composizione ionica di quest'ultimo.
- Equilibrare anche le spugne e la nitrocellulosa in 2 vaschette.
- Assemblare il sandwich in modo che la nitrocellulosa sia disposta fra il gel di poliacrilammide e il polo positivo della cella di trasferimento secondo l'ordine seguente:
1) polo negativo (nero); 2) spugna; 3) carta da filtro bagnata; 4) gel; 5) nitrocellulosa; 6) carta da filtro bagnata; 7) spugna; 8) polo positivo (rosso)
- Immergere nella cella di trasferimento precedentemente riempita con il tampone di trasferimento.
- Applicare una differenza di potenziale di 25 V per 12 ore a temperatura ambiente.
- Alla fine del trasferimento smontare il sandwich e mettere la nitrocellulosa ad asciugare per mantenerla fino alla immunorivelazione.

Immunorivelazione

In questa seconda parte dell'esperienza si andranno ad evidenziare alcuni polipeptidi dell'apparato fotosintetico con anticorpi specifici. Lo scopo è quello di studiare la comparsa delle diverse componenti, fotosistemi ed antenne, durante l'inverdimento. Per fare ciò, useremo anticorpi contro:

PSI core complex
OEC
LHCII

Si preparano le seguenti soluzioni:

Tampone PBS pH 7.2: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

Soluzione proteica: Tampone PBS pH 7.2, 0.2% Tween 20 (detergente), 2% latte in polvere scremato

Soluzione di sviluppo: 100 mM TRIS/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, NBT 0.33 mg/ml, BCPIP 0.16 mg/ml

Procedura

- Saturare nella soluzione proteica per almeno 1 ora.
- Rimuovere la soluzione proteica e sostituirla con la soluzione contenente il primo anticorpo.
- Incubare per almeno 1 ora
- Lavare 3 volte con soluzione proteica.
- Incubare con la soluzione contenente l'anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina.
- Lavare 3 volte con soluzione proteica ed una volta con tampone PBS.
- Rimuovere il tampone PBS e aggiungere la soluzione con il substrato della fosfatasi alcalina.
- Incubare agitando fino a che non appare la colorazione.
- Bloccare la reazione di colorazione con H₂O fredda.

I filtri così colorati riveleranno solo alcuni polipeptidi, quelli riconosciuti in modo specifico dagli anticorpi.

**Verifiche per lo studente****CALCOLO DEL PESO MOLECOLARE DELLE PROTEINE CHE MOSTRANO UNA DIVERSA QUANTITÀ.**

A questo scopo con un righello si misura la distanza di migrazione delle bande proteiche dall'inizio del gel di corsa nella corsia degli standard di peso molecolare e si allestisce un grafico in cui sull'asse delle ascisse è indicata la R_f (ponendo uguale ad 1 la mobilità del fronte) e sull'asse delle ordinate il logaritmo del peso molecolare. Il peso molecolare delle bande proteiche degli standard dall'alto in basso è il seguente:

proteina standard	peso molecolare	mobilità	R _f
albumina bovina	66.000		
ovalbumina	45.000		
G3P DEH	36.000		
anidrasi carbonica	29.000		
tripsinogeno	24.000		
Inibitore della tripsina	20.000		
lattalbumina	14.200		
aprotinina	6.500		

Si possono ora ricavare i cambiamenti nel numero e abbondanza relativa delle bande proteiche conseguenti allo sviluppo del cloroplasto avvenuto esponendo alla luce le piante. Individuate le bande che cambiano maggiormente la loro quantità, si calcola il loro peso molecolare apparente dal confronto delle mobilità con quelle degli standard.

Reazioni al buio della fotosintesi: analisi di amido primario e amido secondario

Cinzia Berteà, Università di Torino

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:		Eseguibilità per gruppi:	
Strumentazione:	Becco di bunsen Mortaio e pestello Microscopio ottico	Materiali:	Foglie esposte per 48 h al buio o alla luce Patate, fagioli, farine varie Reattivo di Lugol Provette e vetrini porta/coprioggetto



Base teorica

L'amido sintetizzato nei cloroplasti è chiamato *primario* (o di assimilazione) e rappresenta la condensazione provvisoria degli zuccheri prodotti durante la fotosintesi; si trova concentrato nello stroma. Pertanto la produzione di amido rappresenta un'altra misura indiretta dell'attività fotosintetica. Esso compare però solo temporaneamente perché di notte viene demolito in zuccheri che sono inviati poi al resto della pianta. L'amido depositato negli amiloplasti è chiamato *amido di riserva* o *amido secondario*. Esso è accumulato nei parenchimi di riserva della radice, del fusto e dei semi ed organi specializzati come bulbi, rizomi e tuberi. L'amido di riserva del fusto e della radice viene utilizzato dalla pianta nella ripresa dell'attività vegetativa per costruire la nuova chioma; l'amido dei semi costituisce la fonte di zuccheri che consente l'avvio dei processi metabolici che sono alla base della germinazione del seme e dello sviluppo della plantula.

Sia l'amido primario che il secondario sono organizzati in *granuli*, quale carattere intrinseco della molecola che tende ad avvolgersi. Ma a differenza di quello primario, i granuli dell'amido secondario presentano spesso, e in particolare nelle principali piante alimentari, spiccate e costanti caratteristiche morfologiche sfruttabili come elemento diagnostico a livello generico, specifico ed anche varietale (identificazione di semi, indagine di sofisticazione delle farine, ecc.). Quasi tutti i granuli di amido presentano un centro di formazione più o meno visibile, chiamato *ilo*. I granuli possono essere *semplici* o *composti*, a seconda se la stratificazione concentrica dell'amido inizia intorno ad un solo ilo o no. L'amido è costituito da *amilosio* e *amilopectina*. L'amilosio consiste in una catena lineare formata da residui glucosidici legati da legami α -1,4, il cui numero può variare da pianta a pianta. La catena dell'amilosio ha tendenza da avvolgersi ad elica. L'amilopectina è una molecola ramificata. I legami più frequenti sono α -1,4 ed i legami nel punto di ramificazione sono α -1,6.



Protocollo sperimentale

A) AMIDO PRIMARIO

- Foglie di una pianta esposta alla luce o lasciata al buio per 48 ore vengono fatte bollire in acqua per 1 minuto e successivamente in metanolo per 5 minuti al fine di rimuovere i pigmenti fotosintetici
- Si versano 2-3 gocce di reattivo di Lugol sulle 2 foglie ed si osservano gli eventuali cambiamenti di colore e le differenze fra foglie illuminate e tenute al buio

B) AMIDO SECONDARIO

- Sminuzzare la patata (o i fagioli) a pezzettini. Pestare i pezzettini nel mortaio con un po' di acqua distillata. Versare il liquido in una provetta
- Per le farine (di mais, frumento e riso) mettere un po' di farina in una provetta e aggiungere direttamente dell'acqua distillata
- Versare un paio di gocce di reattivo di Lugol e osservare il cambio del colore
- Mettere una goccia della soluzione prelevata da ciascuna provetta su di un vetrino e coprirlo con il coprioggetto. Osservare la diversa forma dei granuli di amido



Verifiche per lo studente

Il reattivo di Lugol è una soluzione acquosa contenente iodio, molecola che ha la capacità di legarsi alla parte interna dell'elica dell'amilosio. In presenza di amido il reattivo di Lugol di colore rosso-marrone si colora di blu. Nel caso dell'amido secondario il reattivo, complessandosi ai granuli, ne evidenzia le diverse forme. In sezioni di patata si possono osservare le cellule parenchimali piene di granuli di amido. Lo studente commenti quanto osservato nei diversi casi.

Biosintesi e idrolisi enzimatica dell'amido in tuberi di patata ed effetto di alcuni fattori sull'andamento della reazione

Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Frullatore Bagno termostatico Centrifuga Pipettatrici (P200, P1000) Spettrofotometro VIS	Materiali:	patate, ammonio solfato tampono KOH-maleato 0.1 M pH 6.5 Reattivo di Lugol GLU-1-PO ₄ (30 mg/ml) Amido (5 mg/ml)



Base teorica

Nel momento della sua utilizzazione, l'amido insolubile deve essere convertito in zuccheri solubili. "Si ritiene che nella maggior parte dei casi la degradazione del granulo inizi con l'azione delle α -amilasi, ma in seguito può essere coadiuvata dall'amido fosforilasi. Questo enzima promuove l'attacco fosforolitico dell'ultimo legame $\alpha(1\rightarrow4)$ all'estremità non riducente di catene di glucano, e quindi porta alla formazione di glucosio-1-fosfato, utilizzando Pi come substrato" (Pupillo, Cervone, Cresti, Rascio, Biologia vegetale, ed. Zanichelli). "A causa della reversibilità della reazione di fosforilazione questo enzima è in grado sia di sintetizzare glucani, sia di degradarli. ... Sebbene la costante di equilibrio e la V_{max} siano a favore della sintesi di glucani, si ritiene che *in vivo* la funzione dell'enzima sia prevalentemente quella di degradare polimeri" (Maffei, Biochimica vegetale, ed. Piccin).



Protocollo sperimentale

A) ESTRAZIONE DELL'ENZIMA AMIDO FOSFORILASI

- Pelare e tagliare a cubetti 100 g di patate. Conservare i cubetti in un beaker con acqua per prevenirne l'ossidazione.
- Omogenare il tessuto in un frullatore, contenente 50 ml di acqua distillata ghiacciata, fino a ottenere un omogenato denso; evitare di prolungare il procedimento poiché l'enzima è suscettibile di inattivazione nell'omogenato crudo.
- Filtrare l'omogenato con la garza montata su un imbuto
- Mettere il filtrato, contenuto in una beuta, in un bagno a 50°C per qualche minuto, per inattivare l'amilasi. L'amido-fosforilasi non è inattivata da questa temperatura.
- Aggiungere gradualmente 20 g di solfato di ammonio a 100 ml di filtrato ottenuto, misurati con il cilindro (eventualmente aggiustare il volume), agitando la beuta fino a completa dissoluzione del sale. Distribuire il filtrato nelle provette.
- Sedimentare il precipitato tramite centrifugazione alla max velocità per 5 minuti. È importante equilibrare con precisione le provette prima di inserirle nella centrifuga.
- Eliminare il precipitato e conservare il soprannatante in una beuta, mantenendola in un bagno di ghiaccio.
- L'enzima viene ora precipitato aggiungendo lentamente 15 g di solfato di ammonio per 100 ml di soprannatante. Dopo che il sale si è sciolto ripetere la centrifugazione come sopra. Questa volta eliminare il soprannatante e conservare il precipitato.
- Sciogliere il precipitato che si forma in ciascuna provetta e che contiene l'attività fosforilasica, distribuendo 10 ml di tampono KOH-maleato 0.1 M pH 6.5 fra le 4 provette che contengono i precipitati. Riunire i 4 precipitati così risospesi in un'unica provetta, conservando la preparazione in un bagno di ghiaccio.

B) ATTIVITÀ DELL'ENZIMA FOSFORILASI

- In 4 provette separate aggiungere i reagenti come indicato nello schema.

Reagenti	1	2	3	4
GLU-1-PO ₄ (30 mg/ml)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	-
FOSFORILASI	0.25 ml	-	-	0.25 ml
FOSFORILASI DENATURATA*	-	-	0.25 ml	-
H ₂ O DISTILLATA	-	0.25 ml	-	0.5 ml

*La fosforilasi denaturata si prepara scaldando in una provetta 1 ml dell'enzima estratto in H₂O bollente per 5 minuti prima di aggiungere la soluzione di glucosio-1 fosfato.

- Incubare le provette a 37°C in un bagno termostatico; agitare le provette all'inizio del periodo di incubazione.
- Ad intervalli di circa 5' e per circa 15', prelevare una goccia da ciascuna delle 4 miscele di incubazione (usando puntali diversi) e trasferirla su un pezzetto di parafilm.

- Aggiungere una goccia di soluzione iodo-iodurata (Lugol) e determinare a che intervallo di tempo appare la colorazione blu in ciascuna provetta. Il colore blu è indicativo della presenza di amido.

C) EFFETTI DEI PRODOTTI DI REAZIONE SULL'IDROLISI DI AMIDO CATALIZZATA DALLA FOSFORILASI.

La prova richiede la determinazione colorimetrica della presenza di amido. È necessario dunque aver determinato in precedenza una curva standard di confronto nel seguente modo: partendo da una soluzione standard di amido 1mg/ml, pipettare in 6 provette distinte i seguenti quantitativi di amido: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ml

aggiungere 3 ml di acqua distillata, poi 0.1 ml di soluzione iodo-iodurata e portare ad un volume di 15 ml con acqua distillata. Usare come bianco la provetta in cui non è stato aggiunto amido. Misurare l'assorbanza per ciascuna delle provette allestite in uno spettrofotometro a 660 nm. Disegnare la retta standard usando la carta millimetrata.

In 3 provette separate aggiungere quindi i reagenti come indicato nello schema.

Reagenti	1	2	3
KOH-MB pH 7.5	8.0ml	8.0 ml	7.0 ml
AMIDO (5 mg/ml)	6.0 ml	6.0 ml	6.0 ml
KH ₂ PO ₄	1.0 ml	-	-
H ₂ O distillata	-	1.0 ml	-
GLU-1-PO ₄ (30 mg/ml)	-	-	1.0 ml

Porre le 3 provette a 37 °C in bagno termostatico per 5' per permettere di equilibrare la temperatura. Al raggiungimento della T di equilibrio aggiungere 0.5 ml dell'estratto enzimatico in ogni provetta e mescolare. Immediatamente prendere 0.2 ml da ciascuna delle 3 miscele di incubazione e trasferirli in 3 provette distinte; a ciascuna di queste 3 provette aggiungere 3 ml di acqua distillata, 0.1 ml di soluzione iodo-iodurata e portare a volume di 15 ml con acqua distillata. Determinare la presenza di amido alla spettrofotometro, leggendo l'assorbanza a 660 nm, e riferendosi alla curva standard precedentemente preparata.

Ad intervalli di 5' e per 15' circa prelevare nuovamente da ciascuna delle 3 miscele di incubazione altre aliquote di 0.2 ml e determinare il contenuto di amido allo spettrofotometro.



Verifiche per lo studente

Sulla base della retta standard, si ricavi l'andamento quantitativo nel tempo della produzione di amido nei tre diversi campioni. Lo studente commenti quanto osservato nei diversi casi, formulando delle conclusioni relativamente alle proprietà dell'enzima e alla sua velocità di catalisi in presenza di prodotti e reagenti, discutendone le possibili conseguenze *in vivo*.

Misura della fotosintesi e della respirazione in un'alga unicellulare

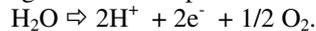
Sergio Esposito, Università di Napoli

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:		Eseguibilità per gruppi:	da  a 
Strumentazione:	centrifuga, spettrofotometro VIS bagno termostatico agitatore magnetico lampade 150W a spettro emiss. solare ionalizzatore ORION 720a/520°/710 elettrodo ad ossigeno ORION 97-08	Materiali:	sospensione algale bottiglia BOD N,N-dimetilformamide cuvette di vetro ottico

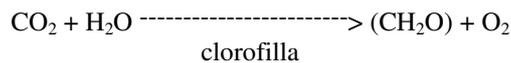


Base teorica

La fotosintesi può essere definita come produzione di sostanza organica a partire da anidride carbonica ed acqua negli organismi vegetali fotoautotrofi. Questo processo implica dapprima la trasformazione di energia luminosa in energia chimica e quindi la generazione di potere riducente, NADPH, con la fotolisi dell'acqua:

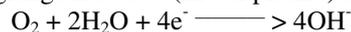


La produzione di ossigeno è inoltre collegata alla produzione di composti organici. Il processo può essere così rappresentato:



La fotosintesi può quindi essere definita come una reazione di ossido-riduzione, in cui il carbonio della CO_2 viene ridotto a materiale organico a spese dell'acqua che viene ossidata ad ossigeno che si libera come gas. Pertanto la misura della fotosintesi nelle piante può essere effettuata determinando gli scambi gassosi (CO_2 oppure O_2) o anche attraverso la produzione di sostanza secca nelle piante. Poiché gli organismi vegetali effettuano, almeno in parte, la respirazione anche durante la fotosintesi, si rende necessaria, in entrambi i casi una correzione a causa della contemporaneità di scambi gassosi esattamente opposti. L'eccesso di fotosintesi rispetto alla respirazione è spesso indicato come "assimilazione lorda" o "fotosintesi lorda". *Chlorella* è un'alga verde unicellulare, con un unico grande plastidio a coppa che occupa gran parte del volume cellulare e uno o due piccoli vacuoli. Si riproduce per formazione di 4 spore. L'organismo utilizzato è un ceppo, capace di sopravvivere a temperature molto alte (35-40°C), di un'alga molto comune: *Chlorella sorokiniana* 211/8k. L'alga viene coltivata in condizioni ottimali di crescita, di temperatura (35°C), e di luminosità ($> 400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$).

La velocità della fotosintesi verrà misurata come velocità di evoluzione di O_2 in sospensioni di alghe unicellulari, termostate ed opportunamente illuminate. E' dunque possibile misurare la variazione nel tempo della concentrazione di O_2 disciolto utilizzando un elettrodo ad ossigeno collegato ad un sistema potenziometrico. L'elettrodo per ossigeno misura la pressione parziale di O_2 ; per leggere i livelli di ossigeno disciolto in parti per milione, bisogna considerare che la solubilità dell'ossigeno nell'acqua varia in funzione della temperatura e della pressione barometrica. Per esempio, la solubilità dell'ossigeno a 20°C e 760 mm Hg è di 9.08 ppm (mg/l); quindi si deve tarare l'apparecchio ad un valore della scala corrispondente alla concentrazione dell' O_2 disciolto in equilibrio alla temperatura sperimentale con l'ossigeno atmosferico ($p\text{O}_2 = 0.21$). La velocità di fotosintesi netta verrà espressa come $\mu\text{moli di O}_2 \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{chl min}^{-1}$. L'ossigeno disciolto viene misurato mediante un dispositivo potenziometrico del tipo descritto da Clark nel 1956. Esso consiste in una coppia di elettrodi polarizzati e da un elettrolita (soluzione di KCl satura) separato dal campione da una membrana sottile di teflon a permeazione di gas. L' O_2 diffondendo attraverso la membrana raggiunge il catodo (filo di platino) dove viene ridotto ad idrossilione secondo la reazione:



Gli elettroni per tale processo sono forniti dall'anodo d'argento che contemporaneamente reagisce con gli ioni cloruro dell'elettrolita secondo la reazione:



Ad una data temperatura, la corrente che fluisce tra il catodo e l'anodo è direttamente proporzionale al livello di ossigeno presente all'esterno della membrana. Un agitatore magnetico mantiene omogenea la distribuzione dell' O_2 nella sospensione cellulare ed il suo flusso attraverso la membrana.



Protocollo sperimentale

A) Dosaggio della clorofilla

L'attività fotosintetica viene normalmente riferita al contenuto in clorofilla del campione in esame. Per questo si procede alla

determinazione del contenuto in clorofille a e b del campione utilizzato. Le clorofille sono estratte quantitativamente dai tessuti fotosintetici con *N,N*-dimetilformammide. Il vantaggio di usare la *N,N*-dimetilformammide e non l'acetone è quello di poter estrarre clorofilla da tessuti intatti in tempi notevolmente più rapidi. Si procede nel modo seguente: 5 ml di sospensione algale vengono prelevati, centrifugati a bassa velocità ($2000\text{ g} \times 5'$), il terreno di coltura (surnatante) viene allontanato e vengono aggiunti 5 ml di *N,N*-dimetilformammide; il materiale viene quindi risospeso nel solvente e posto in frigo al buio per circa 2 ore.

Al termine dell'esperimento con l'elettrodo la miscela contenente clorofilla viene centrifugata a 5000 rpm per 5 min, e quindi si misura allo spettrofotometro l'assorbanza del supernatante alle lunghezze d'onda di 647 nm (Abs_{647}) e di 664 nm (Abs_{664}) contro un bianco contenente il solo solvente. La concentrazione delle clorofille $a + b$ viene calcolata nel modo seguente:

$$17.90 \cdot (Abs_{647}) + 8.08 \cdot (Abs_{664}) = \mu\text{g clorofilla } a + b \cdot \text{ml}^{-1}$$

per conoscere la concentrazione della sola clorofilla a :

$$12.70 \cdot (Abs_{664}) - 2.79 \cdot (Abs_{647}) = \mu\text{g clorofilla } a \cdot \text{ml}^{-1}$$

Dalla concentrazione della clorofilla misurata si risale a quella contenuta nel campione moltiplicando la concentrazione per il fattore di diluizione.

B) TARATURA DELL'ELETTRODO

Avvertenze: Non toccare MAI il modulo membrana/elettrolita con le dita.
Inserire e togliere l'elettrodo dall'imbuto sempre lentamente per non alterare la taratura.
Tra un'analisi e l'altra riporre sempre l'elettrodo nella bottiglia BOD usata per la calibrazione in aria.

Taratura dello Ionalizzatore

1. Collegare l'elettrodo in posizione OFF allo ionizzatore e disconnettere la sonda per la misurazione automatica della temperatura ATC.
2. Premere sullo ionizzatore il tasto MODE fino a posizionare lo strumento sulla lettura in unità pH. L'elettrodo, in posizione OFF, deve dare una lettura di 7.00 sul display dello strumento.
3. Premere sullo ionizzatore il tasto HOLD fino alla comparsa della scritta HOLD OFF.
4. Premere sullo ionizzatore il tasto MEASURE e quindi SET TEMP. Inserire il valore della temperatura standard di 25°C. Premere YES.
5. Premere sullo ionizzatore il tasto CALIBRATE. Verrà chiesto il numero di tamponi o punti di taratura utilizzati per la calibrazione dell'elettrodo; inserire il valore 1 e quindi premere YES.
6. Inserire il valore dell'unico punto di taratura, 7.00, e premere YES; lo strumento mostrerà il valore di deriva (SLOPE) calcolato in base alla taratura effettuata; tale valore deve essere 100 o di poco inferiore. Per il calcolo del valore di SLOPE consultare l'Appendice 2. Premere YES e lo strumento ritornerà automaticamente al modo MEASURE.

Taratura dell'elettrodo

1. Ruotare il commutatore di funzione dell'elettrodo su BATT e verificare che le batterie siano cariche (lettura di 13 o superiore).
2. Ruotare il commutatore su ZERO. Agendo sul comando di calibrazione di zero, impostare la lettura 0.00 ± 0.01 sullo strumento.
3. Inserire l'elettrodo nella bottiglia BOD contenente un sottile velo d'acqua assicurandosi che l'elettrodo non tocchi l'acqua e non vi siano gocce d'acqua sulla membrana.
4. Mettere il commutatore in posizione AIR. Fissare, agendo sul comando di calibrazione dell'aria, il valore della pressione barometrica in ppm diviso per 100 (al livello del mare tale valore è 7.60).
5. Commutare l'elettrodo in posizione H₂O, immergerlo nella sospensione ed iniziare l'esperimento.

C) MISURA DELLA RESPIRAZIONE E DELLA FOTOSINTESI

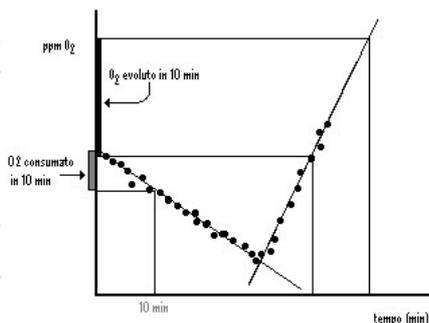
Dopo aver tarato l'elettrodo, versare la sospensione di alghe nella bottiglia BOD (Biological Oxygen Demand), opportunamente termostata e oscurata con un foglio di alluminio; al buio si osserva la diminuzione della concentrazione di ossigeno dovuta alla respirazione, annotando la misura indicata dal display dello ionizzatore ogni minuto. Dopo circa 20 minuti di lettura si toglie il foglio di alluminio e si accende la lampada illuminando la sospensione. In pochi istanti si osserva l'evoluzione fotosintetica di ossigeno; si segue quindi la fotosintesi per altri 15-20 minuti, sempre annotando ad ogni minuto i valori indicati dallo ionizzatore.



Verifiche per lo studente

Riportando su un foglio di carta millimetrata i valori registrati si ottiene un grafico che mostra la diminuzione della concentrazione di ossigeno nella sospensione al buio, e il successivo incremento fotosintetico di O₂ alla luce. Le velocità verranno calcolate misurando il coefficiente angolare delle 2 rette probabili (di fotosintesi e respirazione) passanti per i punti determinati sperimentalmente. I valori saranno espressi come $\text{ppm O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La velocità di fotosintesi netta del campione si ottiene facendo la somma in valore assoluto delle due velocità di fotosintesi e respirazione. Le velocità di fotosintesi e respirazione, espresse in $\text{ppm O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ vengono divise per le concentrazioni di clorofilla così determinate, e quindi convertite in $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{chl tot}$ oppure $\text{chl } a$.



Misura del potenziale idrico in tessuti vegetali, e plasmolisi e deplasmolisi in cellule di epidermide di cipolla

Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa

Difficoltà:	☞	Durata:	⌚ + ⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺ - ☹ (meglio su 2 giorni)	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	set di beakers da 100 ml bilancia analitica cilindretti graduati pinzette e lamette foratappi di 1 cm di diametro microscopio ottico	Materiali:	tuberi di patata, frutti di pera o mela, epidermide di cipolla soluzioni di saccarosio (100 ml ciascuna) con le seguenti molarità: 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6 M capsule Petri carta da filtro vetrini porta e coprioggetto



Base teorica

Nelle cellule vegetali il plasmalemma e tutto il sistema di membrane intracellulari degli organelli hanno come caratteristica quella di essere semi-permeabili. Questo significa che le molecole di acqua si muovono attraverso le membrane passivamente e con relativa facilità, mentre ciò non accade per le molecole di soluto e per gli ioni. Se ai due lati di una membrana sono presenti due soluzioni con differenti concentrazioni l'acqua diffonderà dalla soluzione meno concentrata alla soluzione più concentrata (osmosi). Mettendo queste soluzioni in un osmometro, la pressione, che dovrà essere applicata, per fermare la diffusione dell'acqua verso la soluzione più concentrata è chiamata pressione osmotica o potenziale osmotico. Una cellula vegetale ha tutte le caratteristiche di un osmometro. Data l'alta concentrazione di soluti, presenti nel succo cellulare di una cellula vegetale, l'acqua tenderà a diffondere verso l'interno dando luogo ad un aumento di pressione che causerà lo schiacciamento del plasmalemma contro la parete, la quale però, essendo rigida, resisterà alla pressione ed eserciterà una pressione uguale e contraria, questa pressione è detta pressione di turgore o potenziale di pressione.

Concetto di potenziale idrico.

L'energia libera o energia libera di Gibbs è una proprietà termodinamica di un sistema o di un componente del sistema ed è definita come l'energia disponibile per fare un lavoro. L'energia libera di un componente del sistema è in relazione alla quantità del componente presente quindi in genere si esprime come energia per mole o per grammo di sostanza in questione. L'energia libera per mole di una specie chimica (es. acqua) in un sistema con più componenti (es. soluzione) è definito come il potenziale chimico di quella specie (μ). Il potenziale chimico dell'acqua o potenziale idrico (Ψ) si esprime in termini di pressione, bar o pascal (1bar = 0.1MPa). Valori assoluti del potenziale idrico tuttavia non sono facilmente misurabili mentre possono essere misurate differenze di potenziale idrico. Quindi il potenziale idrico viene definito come la differenza del potenziale chimico per unità di volume molale (V volume occupato da 1 mole di acqua: 0.018 L/mole), tra l'acqua pura (μ°) e l'acqua nelle cellule (μ) alla stessa temperatura, per convenzione il potenziale idrico dell'acqua pura a pressione atmosferica è uguale a 0 quindi il potenziale idrico dell'acqua nelle cellule è negativo. Il potenziale idrico è la misura della forza guida che causa il movimento dell'acqua in qualsiasi sistema (tessuti vegetali, suolo-pianta-atmosfera etc).

$$\Psi_w = \frac{\mu - \mu^\circ}{V} = P - \pi$$

dove P = pressione idrostatica
 π = pressione osmotica

Componenti del potenziale idrico

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g (+ \Psi_m)$$

Ψ_s = potenziale osmotico o di soluto (sempre di segno negativo)

Ψ_p = potenziale di pressione o pressione di turgore (positivo, negativo o uguale a 0)

Ψ_g = potenziale di gravità

Ψ_m = potenziale matriciale (sempre negativo)

Metodo del volume del tessuto

Campioni di tessuto, in questo caso cilindretti di tubero di patata pre-pesati, vengono immersi in una serie di soluzioni di un non elettrolita come saccarosio, mannitolo o PEG (polietilenglicol). Dopo un periodo di tempo i campioni di tessuto vengono rimossi e pesati. Si tratta di trovare la soluzione nella quale il peso del campione di tessuto non cambia. Ciò significa che sin dall'inizio il tessuto e la soluzione erano in equilibrio. In altre parole il potenziale idrico del tessuto doveva essere uguale a quello della soluzione. Quando il $\Psi_w = \Psi_s$, $\Psi_p = 0$, il

potenziale di soluto della soluzione può essere calcolato con la formula di Van't Hoff.

Plasmolisi e deplasmolisi

Nelle cellule vegetali turgide il potenziale di pressione (P), o pressione di turgore è positivo ed il plasmalemma è compresso contro la parete cellulare. In queste condizioni il $\Psi_{\text{osmotico}} = \Psi_{\text{pressione}}$, quindi il $\Psi_{\text{cellula}} = 0$.

Se immergiamo questa cellula in una soluzione ipertonica, la cellula inizierà a perdere acqua, con relativa perdita di turgore, fino a quando il $\Psi_{\text{pressione}} = 0$, in queste condizioni il $\Psi_{\text{cellulare}} = \Psi_{\text{osmotico}}$; inizia il distacco della membrana cellulare dalla parete, ed il volume cellulare diminuisce. Questo fenomeno è detto plasmolisi. La perdita di acqua avviene essenzialmente a carico del vacuolo, infatti, nelle cellule mature, questo organello occupa circa il 90% della cavità cellulare. Nel momento in cui inizia il distacco della membrana dalla parete si parla di plasmolisi incipiente. Aumentando la concentrazione della soluzione esterna, la cellula continuerà a perdere acqua fino alla plasmolisi completa. In questa fase il plasmalemma si stacca completamente dalla parete. Alla plasmolisi incipiente in diverse cellule si può notare che in corrispondenza dei plasmosdesmi il citoplasma rimane attaccato alla parete. La forza e la frequenza di queste connessioni conduce ad una notevole variabilità nella forma dei protoplasti plasmolizzati.

Le cellule in condizioni di plasmolisi incipiente possono essere deplasmolizzate, cioè possono riguadagnare la loro turgidità se vengono poste in una soluzione ipotonica o acqua distillata. Il processo di plasmolisi e deplasmolisi può essere facilmente osservato al microscopio ottico, impiegando una striscia di epidermide di una varietà di cipolla rossa. Le cellule dell'epidermide di questa cipolla hanno un vacuolo centrale molto grande, che contiene una antocianina di colore rosa-rosso. La presenza di questo pigmento rende visibile, al microscopio, la variazione di volume dei protoplasti delle cellule.



Protocollo sperimentale

A) METODO DEL VOLUME DEL TESSUTO

- Preparare le soluzioni di saccarosio (MW = 342).
- Con il foratappi prelevare da un tubero di patata 10 cilindretti lunghi 4 cm.
- Depositare i cilindretti dentro capsule Petri munite di carta da filtro inumidita con acqua.
- Pesare i cilindretti dopo aver asciugato con della carta da filtro l'eccesso di acqua e immergerli nelle soluzioni, oltre ad un controllo con acqua distillata.
- Stoccare i beakers in camera fredda per 24 ore. Alternativamente: a) tagliare i cilindretti in 4 pezzi e aspettare per 3-4 ore; b) tagliare i cilindretti in fettine di 2 mm di spessore e aspettare per 1-2 ore.
- Prelevare i campioni di tessuto dalle soluzioni, asciugarli e pesarli. Riportare nella tabella allegata in corrispondenza delle soluzioni il peso iniziale e finale dei campioni di tessuto, il cambiamento in peso e la sua percentuale.

$$\% \text{ cambiamento in peso} = \frac{\text{peso finale} - \text{peso iniziale}}{\text{peso iniziale}}$$

Costruire un grafico riportando sulle ordinate le variazioni in peso dei campioni di tessuto e sull'ascissa le concentrazioni delle soluzioni usate. Calcolare il potenziale osmotico di una soluzione con la formula di Van't Hoff sottoriportata :

$$\Psi_s = R T i C_s$$

dove C_s = concentrazione molare della soluzione
 i = costante di ionizzazione (saccarosio = 1)
 R = costante dei gas (0.083 L bar/mole K)
 T = temperatura assoluta (0° C = 273 K)

a 20 °C e per 0.15 M di saccarosio avremo:

$$\Psi_s = 0.083 \times 293 \times C_s i = 24.37 \text{ L bar / mole} \times 0.15 \text{ mole / L (} = 0.15 \text{ M)} = 3.6 \text{ bar}$$

Il punto nel quale la curva del volume interseca la linea dello zero indica la concentrazione della soluzione che ha lo stesso potenziale idrico del tessuto all' inizio dell' esperimento.

B) PLASMOLISI E DEPLASMOLISI

- Prelevare da una scaglia interna del bulbo di cipolla un pezzetto di epidermide (circa 0.5 cm) e depositarlo su un vetrino.
- Aggiungere qualche goccia di acqua distillata ed adagiare sopra la sezione un coprivetrino. Osservare le cellule dell'epidermide al microscopio.
- Applicare delle strisce di carta da filtro su entrambi i lati del vetrino e tra questo e il coprivetrino.
- Plasmolisi: far cadere sulla striscia di destra alcune gocce della soluzione di saccarosio 2 M o NaCl 1 M.
- Lasciare che la striscia di sinistra assorba la soluzione. Se necessario rimpiazzarla dopo qualche minuto con della carta da filtro asciutta. Osservare al microscopio l'effetto della soluzione sulle cellule dell'epidermide.
- Deplasmolisi: sostituire le strisce di carta su entrambi i lati del vetrino. Far cadere sulla striscia di destra alcune gocce di acqua distillata.
- Lasciare che la striscia di sinistra assorba l'acqua. Osservare al microscopio l'effetto dell'acqua distillata sulle cellule dell'epidermide.



Verifiche per lo studente

DOMANDE

1) Il potenziale idrico è la risultante di diverse componenti:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_g$$

Alcune di queste componenti sono assenti, o trascurabili, secondo le condizioni. Indica quali di queste componenti concorrono alla determinazione del potenziale idrico rispettivamente delle soluzioni di saccarosio e dei cilindretti di patata usati nell'esperimento di misura di Ψ con il metodo del volume del tessuto.

2) Sulla base della risposta alla domanda precedente esponi come è possibile calcolare il potenziale idrico dei tuberi di patata conoscendo soltanto la molarità delle soluzioni di saccarosio.

3) Nelle risposte a questo quesito supponiamo che il volume della cellula non cambi e che non si verifichi alcuna diluizione del contenuto cellulare. Una cellula di Chara, un'alga, ha un $\Psi_s = -1,2$ MPa e un $\Psi_p = +0,5$. Qual è il potenziale idrico totale di questa cellula in MPa?

$$\Psi_{\text{cellula}} = \quad \text{MPa}$$

Supponiamo di immergere questa cellula in una soluzione di saccarosio con un $\Psi_s = -1,0$ MPa e di lasciare raggiungere l'equilibrio. Quali saranno i valori finali dei componenti del potenziale idrico della cellula di Chara all'equilibrio?

$$\Psi_s = \quad \text{Mpa} \qquad \Psi_p = \quad \text{Mpa} \qquad \Psi_w = \quad \text{MPa}$$

Successivamente togliere la cellula di Chara dalla soluzione di saccarosio e immergerla in un recipiente di acqua pura. Quali saranno all'equilibrio i valori dei componenti del potenziale idrico?

$$\Psi_s = \quad \text{Mpa} \qquad \Psi_p = \quad \text{Mpa} \qquad \Psi_{\text{tot}} = \quad \text{MPa}$$

Determinazione della K_M per L'ATP della H^+ -ATPasi

Lorenzo Camoni, Università di Roma *Tor Vergata*

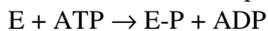
Difficoltà:	☞	Durata:	⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Pipettatrici (P20, P200, P1000)	Materiali:	Membrane plasmatiche Reagente per il fosfato, a. ascorbico Tampone di incubazione, ATP (per le composizioni si veda il protocollo successivo)



Base teorica

L' H^+ -ATPasi è la principale pompa ionica presente sulla membrana plasmatica delle cellule vegetali. Essa, estrudendo protoni dalla cellula, genera un potenziale elettrico (circa -120 mV) ed un gradiente di pH ($pH_{in} \approx 7$, $pH_{out} \approx 5$) attraverso la membrana plasmatica; ciò costituisce il meccanismo primario mediante il quale le cellule vegetali mantengono la concentrazione di protoni, sia citoplasmatica che apoplastica, a valori compatibili con le attività enzimatiche cellulari. L'alcalinizzazione del citoplasma, che risulta da un incremento dell'attività dell' H^+ -ATPasi, può influenzare numerose funzioni della cellula vegetale. L'interruzione della dormienza dei semi, ad esempio, è preceduta da un aumento del pH citoplasmatico. L'energia racchiusa nel gradiente elettrochimico, generato dall' H^+ -ATPasi, costituisce inoltre la forza guida per l'assunzione degli ioni a livello della radice e per il trasporto di nutrienti nel floema. L' H^+ -ATPasi controlla anche numerosi altri processi, come l'apertura e la chiusura degli stomi, la crescita per distensione delle cellule (crescita acida) e le risposte di difesa della pianta a stress biotici e abiotici.

L' H^+ -ATPasi del plasmalemma utilizza l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per estrudere protoni dal citosol nell'apoplasto. Essa è costituita da un singolo polipeptide di circa 100 kDa immerso nel doppio strato fosfolipidico. Sono presenti dieci domini transmembrana, che formano il poro attraverso il quale passa il protone. La regione citosolica compresa tra le eliche trans-membrana 4 e 5 contiene il sito catalitico dell'enzima, mentre il dominio C-terminale ha una funzione regolativa, avendo un'attività autoinibitrice. L' H^+ -ATPasi forma un intermedio fosforilato durante l'idrolisi del substrato, per questo motivo è detta di "tipo E-P".



Il fosfato è trasferito dall'ATP ad un residuo di acido aspartico, localizzato nel sito catalitico; la successiva idrolisi dell'intermedio rilascia il fosfato e libera l'enzima per un nuovo ciclo catalitico. L'attività dell'enzima è specificamente inibita dal vanadato; questo composto è infatti un analogo del fosfato e compete con esso nella formazione dell'intermedio fosforilato. L'intermedio E-V non è idrolizzabile e l'attività dell' H^+ -ATPasi viene quindi inibita in maniera irreversibile.

Misura dell'attività specifica dell' H^+ -ATPasi

L'attività specifica dell' H^+ -ATPasi viene stimata determinando il numero di moli di fosfato (P_i) prodotte, uguali alle moli di ATP idrolizzato ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$).

Per il dosaggio del fosfato può essere utilizzato un metodo colorimetrico, il quale sfrutta la capacità del fosfato di complessarsi con il molibdato in ambiente acido. Questo complesso in condizioni riducenti assume una colorazione blu, la cui intensità è, entro certi valori, proporzionale alla concentrazione del fosfato liberato. La stima della concentrazione del fosfato di un campione incognito può essere quindi fatta confrontando i valori di assorbanza a 740 nm con quelli di una retta di taratura ottenuta facendo reagire il molibdato con quantità note di fosfato. Una volta determinate le moli di P_i prodotte, e conoscendo la quantità di proteine presenti nel campione, si potrà calcolare l'attività specifica dell' H^+ -ATPasi, che viene espressa nel seguente modo:

$$\mu\text{moli } P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$$



Protocollo sperimentale

A) DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI TARATURA PER IL FOSFATO

Una soluzione di potassio fosfato 2 mM è opportunamente diluita in modo da ottenere 9 soluzioni che in 500 μ l contengano:

0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 μ mol fosfato

A questi

- Aggiungere 1.0 ml di reagente per il fosfato
- Aggiungere 10 μ l di acido ascorbico al 10%

- Agitare bene e attendere 10 min
 - Leggere l'assorbanza a 740 nm allo spettrofotometro
- Con i dati così ottenuti costruire un grafico di taratura con la quantità di fosfato in ascisse e l'assorbanza sulle ordinate.

B) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA H⁺-ATPasi

- Preparare i campioni seguendo le indicazioni riportate in tabella

	Tampone incubazione	ATP	H ₂ O	Membrane plasmatiche
1 (senza ATP)	480 µl	-	10 µl	10 µl (conc. 3 mg/ml)
2 (ATP 125 µM)	480 µl	5 µl 12.5 mM	5 µl	10 µl (conc. 3 mg/ml)
3 (ATP 250 µM)	480 µl	10 µl 12.5 mM	-	10 µl (conc. 3 mg/ml)
4 (ATP 500 µM)	480 µl	2.5 µl 0.1 M	7.5 µl	10 µl (conc. 3 mg/ml)
5 (ATP 1 mM)	480 µl	5 µl 0.1 M	5 µl	10 µl (conc. 3 mg/ml)
6 (ATP 2 mM)	480 µl	10 µl 0.1 M	-	10 µl (conc. 3 mg/ml)
7 (ATP 4 mM)	480 µl	10 µl 0.2 M	-	10 µl (conc. 3 mg/ml)

- Agitare bene e incubare per 45 min a temperatura ambiente
- Aggiungere 1.0 ml di reagente per il fosfato
- Aggiungere 10 µl di acido ascorbico al 10%
- Agitare bene e attendere 10 min
- Leggere l'assorbanza a 740 nm allo spettrofotometro
- Sottrarre ai valori dei campioni 2-7 il valore del campione 1
- Convertire i valori di assorbanza in µmoli di Pi sulla base del grafico di taratura ottenuto in precedenza

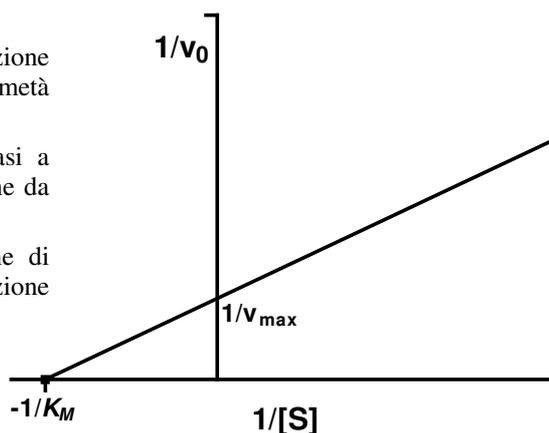


Verifiche per lo studente

La costante di Michaelis-Menten (K_M) è uguale alla concentrazione di substrato alla quale la velocità iniziale della reazione è metà della velocità massima

La K_M viene determinata misurando l'attività dell'H⁺-ATPasi a varie concentrazioni di ATP, fino a raggiungere la saturazione da substrato

Il metodo migliore per calcolare la K_M utilizza l'equazione di *Lineweaver-Burk*, che rappresenta in diagramma $1/v_0$ in funzione di $1/[S]$. L'intercetta sull'asse $1/[S]$ sarà infatti pari a $-1/K_M$



Dunque:

- Calcolare l'attività specifica per ogni campione
- Mettere in grafico i valori di attività ATPasica ottenuti in funzione della concentrazione di ATP
- Calcolare i reciproci della concentrazione dell'ATP e dell'attività ATPasica

[ATP]	[ATP] ⁻¹	µmoli Pi • min ⁻¹ • mg proteina ⁻¹	µmoli Pi • min ⁻¹ • mg proteina ⁻¹

- Calcolare la K_M per l'ATP dell'H⁺-ATPasi utilizzando il diagramma dei doppi reciproci

Effetto della proteolisi controllata con tripsina sulla dipendenza da pH dell'attività della H⁺-ATPasi del plasmalemma

Claudio Olivari, Università di Milano

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Pipettatrici (P20, P200, P1000)	Materiali:	Membrane plasmatiche Reattivi di Ames Miscela di tripsinizzazione Miscela di saggio della H ⁺ -ATPasi (per le composizioni si veda nel testo)



Base teorica

Si veda la scheda precedente.



Protocollo sperimentale

Si preparano o vengono fornite le seguenti soluzioni:

Miscela di tripsinizzazione 5X:

DTT	3.75mM
Glicerolo	25%
ATP	5 mM
CaCl ₂	1.25 mM
Brij58	1.875 mg/ml
BTP-Hepes pH 7.5	50 mM

Miscela base per dosaggio H⁺-ATPasi:

EGTA	0.4 mM
glicerolo	20% (v/v)
KNO ₃	100 mM
MgSO ₄	10 mM
ammonio molibdato	0.2 mM
Brij 58	0.25 mg/ml
ATP	6 mM
PEP	2 mM
piruvato kinasi	4 unità/ml
gramicidina	10 µM

Tripsina 1mg/ml (in H₂SO₄ 1 mM)

H₂SO₄ 1 mM

Inibitore della Tripsina della soia: 0.5 mg/ml

Tamponi (BTP/MES o BTP/HEPES) 400 mM a pH 6.1, 6.4, 6.7, 7.0, 7.3

Vanadato 1 mM

Plasmalemma isolato da cellule di *A. thaliana* : 1.2 mg proteine/ml.

Reattivo di Ames: ammonio molibdato 0.35%, H₂SO₄ 0.83 M, acido ascorbico 1.67%, sodio dodecilsolfato (SDS) 5%.

Na-citrato 10% (p/v).

A) TRATTAMENTO DEL PLASMALEMMA CON TRIPSINA

Prima di procedere al trattamento del plasmalemma con tripsina, preparate le provette per il dosaggio dell'attività della H⁺-ATPasi. Predisporre in ghiaccio due provettine contenenti:

Miscela per tripsinizzazione 5X:	8 µl
Plasmalemma:	32 µl

Aggiungere 1.6 µl di H₂SO₄ (al controllo) o di tripsina (la tripsina è sciolta in H₂SO₄ perchè se no si digerisce da sola), agitare e incubare per 5 min in ghiaccio. Al termine aggiungere 280 µl di Inibitore della Tripsina, agitare e conservare in ghiaccio.

B) DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ DELLA H⁺-ATPasi

La H⁺-ATPasi è l'ATPasi di gran lunga più abbondante e attiva del PM; la sua attività verrà saggiata come la quota di attività che viene inibita da vanadato 100 µM (> 90%). Il fosfoenolpiruvato (PEP) e la piruvato kinasi (PK) hanno la funzione di mantenere costante la concentrazione di ATP nel mezzo di saggio: in presenza di PK l'ADP prodotto dalla reazione della H⁺-ATPasi reagisce con il PEP a dare ATP e piruvato. Il Brij 58 è un detergente che rende accessibili al substrato siti catalitici dell'enzima esposti al lume delle vescicole, ma non modifica lo stato di attività dell'enzima.

Predisporre per ogni pH 8 provette contenenti:

	1-2	3-4	5-6	7-8
miscela base	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl
Tampone	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Vanadato		25 µl		25 µl
H ₂ O	fino a un volume totale di 240 µl			

Aggiungere 10 µl di plasmalemma CONTROLLO ai campioni 1,2,3,4 e TRIPSINIZZATO ai campioni 5,6,7,8; agitare e incubare a 30°C per 30 min. Far partire il cronometro al primo campione e intervallare i campioni di 15 o 20 sec.

Al termine dell'incubazione aggiungere 500 μl di reattivo di Ames (consente la determinazione colorimetrica del fosfato in soluzione tramite la formazione del complesso fosfomolibdico che, nell'ambiente riducente dato dall'acido ascorbico, è blu; inoltre l'ambiente fortemente acido e l'SDS determinano la denaturazione delle proteine, bloccando la reazione della H^+ -ATPasi). Dopo 15 min aggiungere 250 μl di Na-citrato (il citrato chela il molibdato in eccesso, bloccando l'idrolisi del substrato ATP catalizzata dal molibdato in ambiente acido). Leggere l'assorbanza a 820 nm, contro H_2O . Le letture contengono il "bianco", cioè il fosfato presente in soluzione indipendentemente dal procedere della reazione enzimatica.

pH	mOD ₈₂₀			
	Controllo		Tripsinizzato	
	- vanadato	+ vanadato	- vanadato	+ vanadato
6.1				
6.4				
6.7				
7.0				
7.4				



Note per l'esercitatore

Per rendere un po' più complessa ma anche più completa l'esperienza, invece di un saggio con 5 diversi valori di pH con una unica dose di substrato, si possono impostare delle prove con concentrazioni crescenti di ATP a soli 3 valori di pH: 6.2, 7.0 e 7.3. In tal caso far allestire per il saggio, per ognuno dei valori di pH, 2 serie di provette contenenti ciascuna:

	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20
miscela base	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
MgSO ₄ -ATP	5 μl	5 μl	7.5 μl	7.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	25 μl	25 μl	75 μl	75 μl
Vanadato	---	25 μl	---	25 μl	---	25 μl	---	25 μl	---	25 μl
H ₂ O	fino a un volume totale di 235 μl									

Aggiungere 15 μl di plasmalemma CONTROLLO a una serie di provette e TRIPSINIZZATO all'altra; agitare e incubare a 30°C per 30 min. Far partire il cronometro al primo campione e intervallare i campioni di 15 o 20 sec.

In questo modo è possibile calcolare nei tre casi come varia l'affinità per il substrato (si veda anche la scheda precedente). Per la preparazione del plasmalemma, sono disponibili numerosi protocolli sul Web, o si può chiedere quello utilizzato dai Colleghi di Milano e di Roma.



Verifiche per lo studente

Sapendo che il coefficiente di estinzione del Pi in queste condizioni è di 14 OD/ μmole di fosfato, determinare l'attività della H^+ -ATPasi (attività totale meno quella in presenza di vanadato) espressa in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteina.

pH	H^+ -ATPasi ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteina)	
	Controllo	Tripsinizzato
6.1		
6.4		
6.7		
7.0		
7.4		

e mettere in grafico i risultati. Commentare la dipendenza da pH dell'attività nei campioni non trattati e in quelli tripsinizzati. Inoltre, sapendo le concentrazioni delle varie soluzioni utilizzate, calcolare la concentrazione di ciascun componente della miscela di saggio:

EGTA		PEP	
glicerolo		piruvato kinasi	
KNO ₃		gramicidina	
MgSO ₄		tampone	
ammonio molibdato		vanadato (dove presente)	
ATP		Brij 58	

Saggio di attività della nitrato reduttasi in estratti da foglia di spinacio

Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova

Difficoltà:	☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Spettrofotometro VIS Mortajo e pestello Centrifuga per eppendorfs Pipettatrici (P20, P200 e P1000) Bagno termostatico Macchina per il ghiaccio	Materiali:	spinaci tampone di estrazione, sabbia di quarzo Hepes 50 mM pH 7.5 KNO ₃ 10 mM pH 7.5 NADH 0.2 mM sulfanilamide 1 % in 3N HCl naftiletildiamina 0.02% (☠!!!) NaNO ₂ 0.1 mM



Base teorica

Le piante assimilano la gran parte del nitrato assorbito dalle loro radici in composti organici dell'azoto. La prima reazione di tale processo avviene nel citoplasma con la riduzione del nitrato a nitrito ad opera dell'enzima nitrato reduttasi che catalizza la seguente reazione:



dove NAD(P)H indica sia NADH che NADPH. La più comune forma di nitrato reduttasi tipica dei tessuti verdi usa NADH come donatore di elettroni.

(Si veda anche il protocollo successivo)



Protocollo sperimentale

A) ESTRAZIONE DELL'ENZIMA CITOSOLICO

- Preraffreddare il mortaio e il pestello ponendoli in ghiaccio.
- Pesare 0.5 g di foglie di spinacio e porle nel mortaio.
- Aggiungere una punta di spatola di sabbia di quarzo e 3.5 ml di TAMPONE DI ESTRAZIONE (Hepes 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerolo 11.5 %, Triton X-100 0.1%).
- Macinare, mantenendo il mortaio in ghiaccio, fino ad ottenere un omogenato.
- Trasferire l'omogenato in due provette eppendorf da 2 ml, equilibrare i volumi e centrifugare per 5' a massima velocità.
- Recuperare dalle due provette il surnatante, che contiene l'enzima nitrato reduttasi, e riunirlo in una provetta in vetro che sarà mantenuta in ghiaccio fino alla fine dell'esperimento.

B) REAZIONE ENZIMATICA

- Allestire 6 provette in vetro temprato aggiungendo i reagenti nel modo seguente:

1- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) 50 µl Enzima estratto 250 µl H ₂ O	2- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) ---- 250 µl H ₂ O
3- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) 100 µl Enzima estratto 200 µl H ₂ O	4- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) ---- 200 µl H ₂ O
5- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) 150 µl Enzima estratto 150 µl H ₂ O	6- 100 µl Hepes 250 mM pH 7.5 50 µl KNO ₃ 100 mM 50 µl NADH 2 mM (freddo) ---- 150 µl H ₂ O
- Chiudere le provette con foglio di alluminio e porle in bagnetto a 30°C per 15'.
- Fermare quindi la reazione ponendo le provette in ghiaccio.

C) DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI NITRITO PRODOTTO DALLA REAZIONE ENZIMATICA

La determinazione colorimetrica della concentrazione in nitrito viene effettuata determinando una curva standard di confronto ottenuta dalle misure di assorbanza di soluzioni di NaNO_2 a concentrazione crescente.

- Preparare 6 provette eppendorf da 2 ml come segue:
0; 10; 30; 50; 70; 100 μl di NaNO_2 0.1 mM (0.1 nmoli/ μl) (portare a 500 μl con H_2O distillata)
- Aggiungere ora alle provette in vetro n° 2-4-6 rispettivamente 50-100-150 μl di estratto enzimatico.
- Mescolare quindi il contenuto di ciascuna delle sei provette in vetro e trasferire 500 μl del loro contenuto in 1 provetta eppendorf da 2 ml.
- Centrifugare per 5' a 10000 rpm e trasferire 500 μl del surnatante in altrettante provette eppendorf .
- Aggiungere a ciascuna delle sei provette della curva di riferimento e alle sei contenenti l'estratto enzimatico 500 μl di sulfanilamide.
- Aggiungere subito dopo 500 μl di NED (naftiletilendiamina).
- Tappare bene, mescolare e attendere 15' a temperatura ambiente.
- Leggere l'assorbanza a 540 nm utilizzando come blank una cuvetta vuota.



Verifiche per lo studente

·Costruire, con i dati così ottenuti, la retta di taratura per il nitrito e calcolarne la quantità prodotta dalla reazione enzimatica nelle provette n° 1-3-5 dopo aver sottratto l'assorbanza rispettivamente delle provette n° 2-4-6 in cui il colore è dovuto solamente ai pigmenti dell'estratto e non alla sintesi di nitrito.

Verificare, infine, se all'aumentare della quantità di estratto enzimatico utilizzata per la reazione aumenta, in modo lineare, anche la quantità di nitrito prodotta.

Influenza del substrato sull'attività della nitrato riduttasi di orzo

Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa

Difficoltà:	☹☹	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Centrifuga Spettrofotometro VIS Pipettatrici (P200 e P1000) Mortaiolo e pestello	Materiali:	K nitrito 100 μM tampono fosfato 1 M, pH 7.5 KNO ₃ 0,1 M Na ₂ EDTA 10 mM Tris-HCl 1 M, pH 7.5-8 NADH 4 mM (+ goccia di NaOH 0,05 N) sulfanilamide all'1% (w/v) in HCl 1,5 N N-naftil etilenediamina diidrocloreuro allo 0.02% (w/v) (☹!!!).

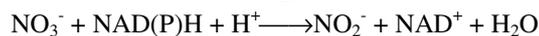


Base teorica

L'azoto nelle sue diverse forme rappresenta l'elemento maggiormente richiesto dalle piante per la crescita. La disponibilità nel suolo di questo elemento dipende da fattori abiotici e biotici, come l'erosione, la lisciviazione e l'attività microbica. Le piante hanno sviluppato diversi meccanismi per poter utilizzare l'azoto presente nel terreno in limitate concentrazioni. La maggior parte delle piante riesce ad utilizzare l'azoto sotto forma inorganica come nitrato e ammoniaca o sotto forma organica come urea o aminoacidi; alcune piante inoltre possono assimilare l'azoto atmosferico instaurando delle simbiosi con batteri. La risposta ad una particolare forma di un azoto è tuttavia diversa da specie a specie. La più abbondante fonte di azoto per le piante che non formano associazioni con microrganismi azotofissatori è costituita dai nitrati.

Il primo passaggio nella acquisizione di azoto (come nitrato) consiste nell'assorbimento dello ione nitrato attraverso la membrana plasmatica delle cellule epidermiche e corticali della radice. La concentrazione dei nitrati nei suoli non coltivati è sempre piuttosto bassa (10-100 μM) con forti variazioni stagionali e spaziali. Nei suoli coltivati i valori sono naturalmente assai più alti (in media 5-10 mM). Il trasporto del nitrato attraverso la membrana plasmatica avviene mediante un gradiente elettrochimico generato da una pompa ATP-asica; per ogni ione nitrato vengono trasportati all'interno della cellula due protoni. Successivamente lo ione nitrato può essere trasportato attraverso il tonoplasto ed immagazzinato nel vacuolo, oppure può essere organicato, nelle cellule della radice o, a seguito del trasporto con la linfa xilematica, nelle foglie. Il nitrato non può essere assimilato come tale ma deve essere prima convertito in NH₄⁺. La riduzione del nitrato è un processo a due stadi: l'NO₃⁻ viene prima ridotto a nitrito dall'azione della nitrato riduttasi (NR). Il nitrito quindi passa nel plastidio dove tramite la nitrito riduttasi si riduce ad ammoniaca. L'ammoniaca è tossica in quanto agisce da disaccoppiante nel cloroplasto e quindi viene rapidamente convertita in glutammina e glutammato.

La riduzione del nitrato e l'assimilazione dell'ammonio sono processi molto regolati. Sia nei funghi che nelle piante la somministrazione di nitrato induce l'espressione dei geni per la sintesi dei trasportatori dei nitrati, della nitrato riduttasi, della nitrito riduttasi e della glutammina sintetasi. Nelle piante l'induzione si verifica in pochi minuti e in risposta a concentrazioni di nitrato molto basse (inferiori a 10 μM). L'enzima che appare sottoposto alla regolazione più complessa e anche quella più conosciuta è la nitrato riduttasi. La NR, localizzata principalmente nelle cellule corticali ed epidermiche della radice e nelle cellule del mesofillo del germoglio, trasferisce due elettroni dal NAD(P)H al nitrato attraverso tre centri redox composti da due gruppi prostetici (FAD e eme) ed un cofattore MoCo NR



L'attività della NR è regolata da molti fattori. Tra i fattori che entrano in gioco vi è naturalmente il nitrato ma anche la luce, il livello di CO₂, l'attività fotosintetica. L'attività della NR è inoltre regolata secondo ritmi circadiani. La regolazione dell'attività della NR avviene sia a livello di trascrizione del gene e sintesi/degradazione della proteina sia tramite processi di inattivazione reversibile della proteina. Nell'espressione della nitrato riduttasi un ruolo importante oltre al nitrato è svolto dalla luce: piante cresciute al buio hanno una attività della NR molto bassa. In seguito a trasferimento alla luce, mediante un meccanismo in cui è coinvolto il fotorecettore fitocromo, le piante eziolate tendono ad aumentare sia la sintesi sia l'attività di NR. L'attività della NR è controllata nel breve periodo anche da meccanismi reversibili di inattivazione/attivazione della proteina. In assenza, o carenza di luce o in un ambiente con bassa concentrazione di CO₂, l'attività della NR decresce rapidamente da 3 a 10 volte. La regolazione rapida e reversibile dell'attività della NR (l'inattivazione ha una semivita di 15 minuti) comporta una modifica covalente della proteina e si basa su un meccanismo di fosforilazione e defosforilazione di uno specifico residuo di

serina. L'obiettivo dell'esercitazione è la valutazione dell'influenza della luce sull'attività della nitrato riduttasi in giovani piante di orzo (*Hordeum vulgare* L.).



Protocollo sperimentale

A) ESTRAZIONE DELL'ENZIMA

Semi di orzo (*Hordeum vulgare* L.) vengono messi a germinare in un substrato a base di vermiculite. Le plantule sono allevate in assenza di luce per 11 giorni e successivamente esposte alla luce per 24 ore, secondo il seguente protocollo sperimentale:

1. piante alle quali viene somministrata una soluzione nutritiva contenente nitrati;
2. piante alle quali viene somministrata una soluzione nutritiva senza nitrati.

Tagliare circa 5-10 cm delle prime foglie formate di ciascun germoglio fino ad ottenere un peso fresco di circa un grammo. Porre il materiale in una navicella e conservare in ghiaccio. Effettuare tutte le successive operazioni utilizzando soluzioni e vetreria ben freddi. Porre le foglie nel mortaio ed omogenizzare il materiale utilizzando come solvente di estrazione una soluzione di tampone fosfato 0.2 M, contenente Na₂EDTA 1 mM; il rapporto tessuto/solvente deve essere pari a 1:20 (peso/volume). Una volta che il tessuto è completamente omogenizzato, centrifugare a 27000 x g per 15 minuti. Al termine, prelevare il supernatante e conservare in ghiaccio.

B) PREPARAZIONE CURVA DI TARATURA

Utilizzando una soluzione stock di nitrito di potassio con una concentrazione pari a 100 µM, calcolare la quantità di soluzione di nitrito e di acqua da aggiungere a ciascuna provetta per poter ottenere le concentrazioni di nitrito indicate nella tabella. Il volume finale di ogni provetta (2 ml di sol. di reazione + 2 ml sol. colorimetrica ottenuta mescolando al momento 1:1 le soluzioni di sulfanilamide e N-naftil etilenediamina) è pari a 4 ml. Leggere infine allo spettrofotometro l'assorbanza delle soluzioni a 540 nm.

[] NO ₂ , µM	0	1.5	3	4.5	6	7.5	9
Stock NO ₂							
H ₂ O							
Colorante	2 ml (1+1)						

C) SAGGIO DI ATTIVITÀ DELL'ENZIMA

- Preparare la soluzione stock di nitrato utilizzando le soluzioni fornite dal docente:
 - 2 ml di tampone fosfato 1 M, pH 7.5
 - 10 ml di KNO₃ 0,1 M
 - 2 ml di Na₂EDTA 10 mM
 - 8 ml di Tris-HCl 1 M, pH 7.5-8
 - 50 ml di acqua distillata
- 1.6 ml soluzione nitrato + 0.20 ml soluzione NADH +
 - 200 µl enzima (campione)
 - 200 µl H₂O (bianco)
- Aggiustare il pH a 7.5 con HCl e portare al volume di 80 ml con acqua distillata.
- Preparare due tubi per ciascuna tesi ed uno per il bianco, ed effettuare la reazione nel seguente modo:
- Aggiungere 1,6 ml della soluzione di nitrato a ciascun tubo; poi aggiungere 0,20 ml di soluzione di NADH.
- Iniziare la reazione aggiungendo 0,20 ml di estratto enzimatico a ciascun tubo, ad eccezione del bianco dove si sostituisce l'enzima con acqua distillata in eguale quantità. Mescolare e tenere a temperatura ambiente per 15 minuti.
- Bloccare la reazione aggiungendo 2 ml della soluzione colorante (sulfanilamide e N-naftil etilenediamina diidrocloreuro in rapporto 1:1).
- Mescolare nuovamente e conservare circa 10 minuti a temperatura ambiente fino ad una completa formazione del colore (rosa più o meno intenso). L'intensità del colore fornisce una misura del nitrito formato dal nitrato. Misurare l'assorbanza dei campioni allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm.



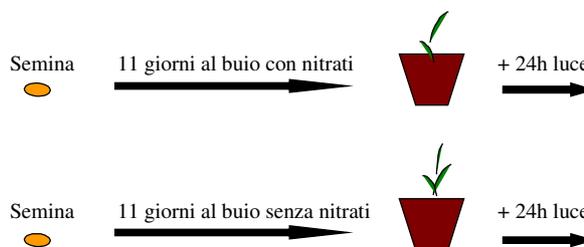
Verifiche per lo studente

Confrontando i valori ottenuti nel saggio di attività con quelli della curva di taratura, risalire alla quantità di nitrito formato ed esprimere i valori in pkat (= pmoli/s).

Le moli possono essere calcolate mediante la seguente proporzione:

$$\text{mM} : 1000\text{ml} = x \text{ micromoli} : 4 \text{ ml}$$

Discutere i risultati ottenuti nei due casi (estratti da piante cresciute in presenza o in assenza di nitrato).



Pigmenti idrosolubili non fotosintetici: estrazione e caratterizzazione degli antociani

Cinzia Berteà, Università di Torino

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:		Eseguibilità per gruppi:	
Strumentazione:	Mortaio e pestello Centrifuga	Materiali:	Pericarpo di mandarino, foglie di cavolo rosso o di radicchio Azoto liquido Etanolo, cloroformio, provette



Base teorica

Oltre ai pigmenti fotosintetici la cellula vegetale possiede anche altri tipi di pigmenti presenti soprattutto nei vacuoli. Ad esempio gli antociani sono pigmenti colorati che impartiscono un colore rosso e blu alle corolle dei fiori. In alcuni casi la corolla del fiore presenta più di un colore (garofano, bocche di leone, viole del pensiero, dalie) e ciò è dovuto alla contemporanea presenza nella stessa corolla di antociani di colore diverso. Antociani sono presenti anche in altre parti della pianta, frutti, fusto, foglie e anche radici. I colori rosso ed aranciato delle foglie in autunno e prima della loro caduta sono in gran parte dovuti agli antociani.

Il colore degli antociani spesso dipende dal pH del succo vacuolare. In genere il colore rosso si ha in ambiente acido, mentre il colore azzurro si ha in ambiente basico (es. fiori delle ortensie). È sufficiente trattare con una base una fogliolina rossa di radicchio o un petalo di geranio, o l'epidermide che si ottiene per spellatura, perché scompaia il colore rosso e appaia il colore azzurro. Lavando con acqua e aggiungendo poche gocce di un acido ricompare il colore rosso che, magari, può risultare anche più intenso di quello originario se il pH raggiunto in seguito all'aggiunta dell'acido è più basso di quello di partenza. A questo fenomeno si dà il nome di viraggio degli antociani, analogamente al viraggio di altri composti usati come indicatori chimici (tornasole ecc.).

Non tutti i colori presenti nella pianta sono però di natura fenolica. Anche i carotenoidi svolgono spesso una azione vessillifera. I cromoplasti sono plastidi colorati per la presenza di pigmenti, tra cui i più abbondanti sono proprio i carotenoidi. Questi plastidi sono tipicamente presenti nei fiori e nei frutti, ai quali impartiscono colorazioni che vanno dal giallo, all'arancio, al rosso.



Protocollo sperimentale

- Foglie di radicchio (o di cavolo rosso) e pericarpo di mandarino vengono estratti separatamente polverizzando il materiale vegetale in azoto liquido. Alla polvere viene aggiunta una miscela di etanolo:cloroformio 2:1 e l'omogenato è filtrato e centrifugato. Una frazione di 500-600 µl dal surmatante viene trasferita in provette eppendorfs.
- Si aggiungono due o tre gocce di acqua distillata nei tubi Eppendorf contenenti i 2 estratti. Dopo aver chiuso molto bene il tubo si mescola invertendo 3-4 volte, lasciando riposare la miscela nel porta provette: osservare dove si ripartiscono i pigmenti.
- Prelevare la fase idrofila (colorata di rosso) dall'estratto di radicchio/cavolo rosso e metterla in una provetta pulita. Si aggiunge quindi qualche goccia di NaOH 1M alla miscela, si chiude e si agita. Osservare il viraggio di colore. Aggiungere quindi qualche goccia di HCl 1M, chiudere ed agitare. Osservare il viraggio di colore



Note per l'esercitatore

Per rendere più semplice l'esperienza ed evitare la manipolazione di reagenti organici e di azoto liquido, gli estratti possono essere preparati e direttamente forniti agli studenti.



Verifiche per lo studente

L'aggiunta di acqua distillata all'estratto di pericarpo di mandarino fa sì che i pigmenti lipofili (caroteni) si ripartiscano nella fase organica (inferiore). L'aggiunta di acqua distillata all'estratto di radicchio porta invece alla ripartizione dei pigmenti idrofili nella fase acquosa superiore, mentre nella fase lipofila inferiore si ripartiscono le clorofille. L'aggiunta di una base o di un acido all'estratto del radicchio, porta al viraggio degli antociani. Questo fenomeno è legato alla presenza di gruppi -OH sulla molecola. Un maggior numero di gruppi ossidrilici sposta l'assorbimento verso lunghezze d'onda più elevate e dona una colorazione tendente sempre più al blu.

Lo studente commenti quanto osservato nei diversi casi.

Estrazione e determinazione dell'attività dell'enzima tirosinasi nei frutti di banana come marcatore della risposta allo stress da taglio

Sergio Esposito, Università di Napoli

Difficoltà:	☞	Durata:	⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Centrifuga per provette da 10 ml Spettrofotometro VIS Pipettatrici (P200 e P1000) Mortai e pestello	Materiali:	Banane Sabbia di quarzo tampone fosfato 100 mM a pH 7.2 DOPA 25 mM



Base teorica

Le polifenolo ossidasi (PPOs) sono ampiamente distribuite in natura e sono note per i ruoli fisiologici che svolgono: impediscono l'attacco di insetti e microorganismi, fanno parte del sistema di risposta da taglio e sono costituenti dei prodotti secondari sintetizzati dalle piante. Quando la frutta matura, la suscettibilità a malattie ed attacchi aumenta a causa del declino nel loro contenuto di polifenoli. Gli enzimi PPOs della frutta e della verdura catalizzano la produzione di chinoni da costituenti fenolici. Una volta formati, tali chinoni subiscono reazioni di polimerizzazione che portano alla formazione di melanine con proprietà antibatterica ed antifungina e con il ruolo di mantenere fisiologicamente integro il frutto. Le melanine hanno lo scopo di formare delle barriere che impediscono il propagarsi dell'infezione nelle piante. Composti fenolici come l'acido clorogenico, l'acido caffeico e la scopulina mostrano proprietà fungicide. Le PPOs sembrano essere localizzate nei plastidi e cloroplasti, anche se sono state osservate nel citoplasma di piante senescenti o in maturazione. Studi di clonaggio e di sequenziamento della regione legante rame di tali enzimi hanno mostrato una alta percentuale di conservazione tra piante, animali e microorganismi. Le piante che possiedono una maggiore resistenza a stress climatici hanno un contenuto di PPOs maggiore delle varietà suscettibili. Altri sistemi enzimatici nelle piante come le chitinasi, le perossidasi, le fenilalanina ammonia liasi, mostrano una aumentata attività quando sottoposte a stress.

Le PPOs catalizzano due reazioni: l'idrossilazione in posizione *o* adiacente a un preesistente gruppo idrossilico del substrato fenolico (attività monofenolo ossidasi) e l'ossidazione dei difenoli ad *o*-benzochinoni (attività difenolo ossidasi). Entrambe le reazioni utilizzano l'ossigeno molecolare come co-substrato. Non è ancora ben chiaro se un singolo enzima mostri sia attività mono- che difenolo ossidasi. Comunque, quando nelle piante è presente sia attività mono- che difenolo ossidasi, il rapporto delle attività è rispettivamente di 1:10 e può raggiungere il valore di 1:40. Gli isoenzimi PPOs furono inizialmente isolati nei funghi. Le subunità dell'enzima erano differenti dal punto di vista chimico, fisico e cinetico. Si riteneva che tali differenze nelle subunità fossero responsabili delle relative affinità degli enzimi per substrati mono- o di fenolici. Le PPOs isolate da mango possiedono due isoenzimi ed entrambi mostrano specificità per gli *o*-difenoli. Alcune varietà di PPOs ossidano solo gli *o*-difenoli ma non i monofenoli, mentre altre hanno sia attività mono- che difenolo ossidasi.

Le monofenolo ossidasi catalizzano l'idrossilazione dei monofenoli ad *o*-difenoli. L'enzima è chiamata tirosinasi negli animali, poiché la L-tirosina costituisce il principale substrato monofenolico. Nelle piante l'enzima è a volte detto anche cresolasi per l'abilità ad utilizzare il substrato monofenolico cresolo. L'attività della tirosinasi designa spesso anche le mono- e difenolo ossidasi delle piante, nonostante la L-tirosina non costituisca il principale substrato per l'enzima nei vegetali, data la grande abbondanza di fenoli nel regno vegetale (ecco perché l'enzima è considerato una polifenolo ossidasi nelle piante).

L'attività monofenolo ossidasi è spesso trascurata nelle piante poiché l'idrossilazione è una reazione estremamente più lenta dell'ossidazione richiesta per produrre chinoni e per l'inizio della reazione di incurimento. La tirosinasi è stata particolarmente studiata nei crostacei e negli insetti per l'importanza fisiologica che riveste insieme con la difenolasi, nell'ispessimento della cuticola per la sclerotizzazione. L'enzima può anche metabolizzare ammine aromatiche ed *o*-amminofenoli, entrambi molto simili ai mono- e difenoli.

L'incurimento enzimatico non avviene nelle cellule vegetali integre poiché i composti fenolici nei vacuoli sono separati dalle PPOs nel citoplasma. Quando il tessuto è danneggiato da taglio si ha subito la formazione di pigmenti scuri. Sia la caratteristica organolettica che biochimica del frutto sono alterate dalla formazione di pigmenti. La velocità di incurimento enzimatico nei frutti e nei vegetali è dettata dal contenuto in PPOs, dal contenuto in polifenoli, dal pH, dalla temperatura e dalla presenza di ossigeno nel tessuto.

Se la frutta viene tagliata, punta o urtata, provocando una lesione dell'organo, si genera una serie di reazioni di difesa da parte della pianta (del frutto): le *risposte allo stress da taglio*. Uno degli effetti più evidenti è dato dall'incurimento della frutta quando viene esposta all'aria. L'imbrunimento è dovuto a delle ossidazioni, in parte spontanee, in parte provocate dalla reazione dell'enzima tirosinasi. La tirosina viene trasformata in L-DOPA

(diidrossifenilalanina) e quindi in DOPAcromo, di colore rosso, fino ad ottenere il polimero della melanina, di colore bruno. I passaggi iniziali, tirosina-DOPA-DOPAcromo sono mediati dalla tirosinasi.

Scopo dell'esercitazione

Durante l'esercitazione si vuole misurare l'attività dell'enzima tirosinasi nella polpa della banana (*Musa cavendishii* L.). Bisognerà quindi prima estrarre l'enzima e poi valutare l'attività tirosinasi. Poiché la trasformazione della tirosina in DOPA è una reazione piuttosto lenta, il substrato che verrà fornito nella miscela di reazione è la L-DOPA, che si trasforma rapidamente in DOPAcromo.



Protocollo sperimentale

1. Tagliare da una banana appena sbucciata un disco di polpa del peso di circa 10 grammi. Pesare quindi su una bilancia l'esatta quantità di materiale prelevato.
2. Mettere il disco di polpa in un mortaio freddo, aggiungere della sabbia di quarzo lavata e ridurre in poltiglia il materiale. Man mano che l'estrazione procede aggiungere 8 ml di tampone fosfato 100 mM a pH 7.2 fino ad ottenere una poltiglia omogenea.
3. Raccogliere l'omogenato in due provette da 10 ml e centrifugare a 4000 rpm per 5'. Al termine della centrifugazione raccogliere il surnatante limpido e versarlo in un cilindro di vetro per misurare la quantità di estratto ottenuta.
4. Conservare l'estratto a freddo.

SAGGIO DELLA TIROSINASI

Allestire 6 campioni secondo il seguente schema in cuvetta (vol. finale = 1 ml; i volumi sono in ml):

	Bianco	1	2	3	4	5
Tampone	0.8	0.750	0.700	0.650	0.600	0.550
L-DOPA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Estratto	-----	0.050	0.100	0.150	0.200	0.250

La reazione parte con l'aggiunta dell'estratto (minuto 0). Leggere ogni minuto per 10 minuti a 475 nm contro il bianco.



Verifiche per lo studente

Sapendo il peso esatto della banana e il volume di estratto, calcolare per ognuno dei 5 campioni la quantità iniziale di tessuto che corrisponde al volume di estratto incubato. Per ognuno di questi si dovrebbe disporre di una serie di dati secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A_{475}											

Con tali dati costruire un grafico su un foglio di carta millimetrata, ponendo il tempo in ascissa e l'assorbanza in ordinata: la pendenza della retta che interpola i dati sperimentali corrisponde all'aumento di assorbanza per minuto.

Sapendo che il coefficiente di estinzione molare per il DOPAcromo è $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, cioè in altri termini che un incremento di assorbanza a 475 nm di 0.0036 in 1 ml corrisponde alla sintesi di 1 nmol di prodotto, calcolare in ogni caso il valore di unità enzimatiche presenti, definendo 1 U come quella quantità di enzima che catalizza la produzione di 1 nmol al secondo (nkat). Rapportate questi valori alla quantità di tessuto corrispondente al volume di estratto posto in ogni campione.

Misurazione dello scoppio ossidativo in cellule vegetali in coltura elicitate con idrolisati di micelio fungino

Giuseppe Forlani, Università di Ferrara

Difficoltà:	☹☹☹	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	Centrifuga per eppendorfs Spettrofotometro VIS Shaker rotativo Bilancia Pipettatrici (P200 e P1000)	Materiali:	Colture cellulari in sospensione tamponi K fosfato 350 mM pH 6.5 soluzione 20 mM di AAP soluzione 25 mM di DCHBS sol. 2 mg ml ⁻¹ di perossidasi di rafano Eppendorfs e puntali Acqua ossigenata (sol. commerciale) Idrolisati di micelio fungino



Base teorica

LE DIFESE DELLA PIANTA DALL'ATTACCO DEI PATOGENI

Le piante sono continuamente sottoposte all'attacco di una pletera di altri organismi. Erbivori e insetti fitofagi si nutrono preferenzialmente della parte aerea; virus, batteri e numerosi ceppi fungini tentano d'altra parte di penetrare attraverso la cuticola cerosa che protegge la superficie di foglie e steli per diffondere all'interno dei tessuti, e colonizzare via via tutta la pianta. Anche a livello dell'apparato radicale i vegetali entrano ripetutamente in contatto con altre specie in grado di minacciarne l'integrità, tra cui, oltre ai microorganismi già citati, nematodi e piccoli invertebrati. Per difendersi, i vegetali superiori hanno sviluppato nel tempo tutta una serie di meccanismi che tendono a riconoscere precocemente la presenza del patogeno, e a porre in atto la sintesi di composti di difesa (*fitoallessine*) che possano risultare tossici per il parassita o che siano in grado di contrastarne la diffusione. Nella maggior parte dei casi studiati la resistenza di una cultivar e la virulenza di un patogeno sono ereditati come un carattere mendeliano semplice; si parla pertanto di geni di resistenza (*r*, solitamente dominanti) e di geni di virulenza (*vir* recessivi) o avirulenza (*avr*, in genere dominanti). Questo non significa che i meccanismi di attacco e difesa siano estremamente semplici, ma che il successo o l'insuccesso dell'attacco dipendono da un punto critico, superato il quale l'attacco ha successo, ma a livello del quale la pianta può impedire la diffusione del parassita. Quando l'interazione volge a favore del patogeno, essa viene detta *compatibile*; quando la pianta è in grado di sopravvivere all'attacco la risposta viene definita al contrario *incompatibile*, o anche *ipersensibile*.

LA RISPOSTA IPERSENSIBILE

In questi ultimi anni la comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui la pianta percepisce l'attacco di un patogeno ha compiuto enormi progressi. L'interazione di recettori posti sulla membrana della cellula vegetale con molecole derivanti dall'idrolisi della propria parete, conseguente alla produzione da parte del patogeno di enzimi litici, o con sostanze che si liberano dal patogeno stesso (dette in entrambi i casi *elicitori*), fa sì che le cellule contigue al punto di invasione inneschino la produzione di composti tossici dell'ossigeno (il cosiddetto *oxidative burst*, scoppio ossidativo) avviando una vera e propria morte cellulare programmata che tende a fare terra bruciata intorno al parassita, impedendone la moltiplicazione. La risposta ipersensibile può dunque essere descritta fenotipicamente come una necrosi localizzata che si accompagna al blocco della diffusione del patogeno oltre il punto di infezione. Non solo. Opportuni segnali, tra cui il più conosciuto è l'acido salicilico, vengono prodotti e diffusi in tutte le altre parti della pianta, in modo che anche senza essere ancora entrate in contatto con il patogeno queste si possono preparare ad un suo eventuale arrivo, sintetizzando elevate concentrazioni di composti di difesa e migliorando così la resistenza della pianta. In questo modo il contatto con un primo patogeno permette alla pianta di contrastare un eventuale attacco da parte di un altro parassita, che non può più coglierla impreparata e non riesce quindi a diffondere. Questa proprietà di indurre l'attivazione generalizzata dei meccanismi di difesa è nota come *resistenza sistemica acquisita* (SAR).

LO SCOPPIO OSSIDATIVO

La produzione di specie reattive dell'ossigeno nell'apoplasto avviene ad opera di una NADPH-ossidasi presente sulla membrana della cellula vegetale che catalizza la formazione di superossido. La sua attività è indotta da numerose categorie di proteine, carboidrati, β -glucani, acidi grassi e oligogalatturonidi, derivanti sia dalla parete della cellula vegetale (a seguito dell'attività litica di enzimi fungini) che da quella fungina (a opera di enzimi *difensivi* della pianta). Si è visto che anche preparati grezzi ottenuti dal micelio di funghi patogeni sono in grado di innescare la risposta ipersensibile. Nel caso di interazione compatibile, la produzione di perossido di idrogeno è transiente, e quantitativamente poco rilevante; in quella incompatibile, al contrario, ad un primo *scoppio* ne segue un secondo, molto più persistente, e si innesca la sintesi di salicilato. Quest'ultimo, una volta diffuso nel floema e

giunto agli altri tessuti della pianta, è in grado di avviare uno scoppio ossidativo con caratteristiche differenti, che non conduce a morte cellulare, ma induce la produzione di fitoalessine.

DISTINGUERE UN PATOGENO DA UN NON PATOGENO

Le diverse caratteristiche dello scoppio ossidativo risultante dal contatto con elicitori preparati da un ceppo fungino virulento rispetto a uno non patogeno possono dunque consentire di distinguere tra una interazione compatibile e una incompatibile. Questo ha un potenziale applicativo notevole. Molti trattamenti antiparassitari sulle colture sono preventivi, e in assenza di un possibile patogeno si configurano di fatto inutili, costosi e dannosi da un punto di vista ambientale. La comparsa nell'ambiente di ceppi fungini può essere monitorata attraverso l'uso di piastre contenenti adeguati terreni di coltura che vengano aperte in campo, ma questo non dice se si tratti di ceppi virulenti o avirulenti. La valutazione dello scoppio ossidativo derivante dal contatto di cellule vegetali con elicitori preparati da questi isolati ambientali può dunque aiutare a decidere se sia o non sia il caso di procedere al trattamento della coltura con anticrittogamici.



Protocollo sperimentale

A) DETERMINAZIONE DELLA RETTA DI TARATURA PER IL PEROSSIDO DI IDROGENO

La rilevazione della presenza di specie reattive dell'ossigeno si basa sull'ossidazione dell'amino-antipirina (AAP, 0.1 mM) e sulla sua conseguente reazione con l'acido 3,5-dicloro-2-idrossi-benzensulfonico (DCHBS, 1 mM) a formare un composto colorato con un massimo di assorbimento a 515 nm. L'ossidazione è catalizzata da una perossidasi quando dell' H_2O_2 è presente in soluzione. Lo sviluppo di colore rosso riflette dunque proprio la comparsa del perossido. Prima di procedere alla misurazione di questa produzione durante il burst ossidativo, è necessario determinare il rapporto quantitativo che esiste tra il perossido e il colore che si sviluppa; in altri termini, dobbiamo calcolare il coefficiente di estinzione molare (ϵ) per il prodotto della reazione equimolare tra H_2O_2 , AAP e DCHBS.

Vengono forniti: una eppendorf con una aliquota di una soluzione commerciale al 3% di H_2O_2
 una provetta con tampone K fosfato 350 mM pH 6.5
 una soluzione 20 mM di AAP
 una soluzione 25 mM di DCHBS
 una soluzione 2 mg ml⁻¹ di perossidasi di rafano (POX)

Attenzione! ☠: alcuni di questi composti sono tossici, vanno maneggiati con cautela; il perossido, in particolare, a contatto con la pelle la scolora, lasciando macchie bianche: usate camice e guanti!

Una volta calcolate ed effettuate le opportune diluizioni della soluzione al 3% per ottenerne una 1 mM, ponete in 6 eppendorfs quantità di perossido pari a 0-5-10-15-20-25 nmol; aggiungete quindi in sequenza aliquote opportune delle soluzioni di AAP, DCHBS e di perossidasi, portando ad un volume finale di 1 ml (fate però prima tutti i conti, in modo da poter mettere per primo il tampone!). RICORDARSI DI RIPORRE IMMEDIATAMENTE L'ENZIMA IN GHIACCIO.

campione		1	2	3	4	5	6
nmol		0	5	10	15	20	25
		μ l					
μ l soluzione 1 mM di H_2O_2		0					
AAP	conc. stock 20 mM						
DCHBS	25 mM						
POX	2 mg ml ⁻¹						
μ l tampone q.b. a 1 ml							

Una volta aggiunta la perossidasi e mescolato il campione, si lascia sviluppare il colore (bastano 2-3 minuti) e si legge a 515 nm utilizzando come bianco il campione che non contiene perossido. Utilizzate la stessa cuvetta leggendo dal campione meno concentrato a quello più concentrato. Scartate i campioni già letti negli appositi contenitori per rifiuti acquosi.

Ottenuti i dati, costruire un grafico ponendo in ascissa la concentrazione del perossido in nmol ml⁻¹, in ordinata l'assorbanza a 515 nm; la pendenza della retta interpolante rappresenta l'assorbanza corrispondente a 1 nmol in 1 ml, cioè il coefficiente di estinzione micromolare (per avere ϵ sarà dunque sufficiente moltiplicarlo per 10⁶)

Per calcolare la pendenza di una retta che passa per l'origine basta determinare un punto comodo sulla retta e identificarne i corrispondenti valori di y e x (attraverso una retta perpendicolare agli assi che passi nel punto prescelto): $a = y/x$

B) MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI PEROSSIDO DI IDROGENO IN CELLULE ELICITATE DI RISO

Nella parete cellulare vi è continuamente produzione di specie attive dell'ossigeno, che servono ad esempio per la polimerizzazione degli alcoli fenilpropanoici nella sintesi di lignina; la stessa manipolazione meccanica delle cellule incrementa questa produzione. Le superossido dismutasi convertono il superossido in perossido, e delle perossidasi di parete potrebbero usare questo perossido per catalizzare la reazione tra AAP e DCHBS, ma durante il *burst* la loro attività potrebbe divenire limitante, per cui aggungeremo comunque al sistema della perossidasi di rafano pura.

Per calcolare il livello basale di produzione di H_2O_2 e il suo eventuale incremento in seguito al contatto con elicitori ricavati dalla parete del micelio di patovar fungine virulente, ciascun gruppo trasferirà in ognuno di 4 tubi da 20 ml una quantità di cellule - appena filtrate - pari a 200 mg di peso fresco, che saranno risospese in un volume finale di 12 ml. Anche in questo caso bisogna calcolare i volumi delle soluzioni da aggiungere, in modo da utilizzare diverse quantità di tampone per arrivare comunque a questo volume.

campione				①	②	③	④
composto	conc. sol. stock	conc. finale in 12 ml	volume da aggiungere				
AAP	20 mM	0.2 mM	✓	✓	✓	✓
DCHBS	25 mM	1 mM	✓	✓	✓	✓
perossidasi	2 mg ml ⁻¹	0.01 mg ml ⁻¹	✓	✓	✓	✓
tampone quanto basta a 12 ml			
elicitore <i>Magnaporthe grisea</i> (EM), 120 µl					✓		
elicitore ceppo A (EA), 120 µl						✓	
elicitore ceppo B (EB), 120 µl							✓

In un tubo non vi sarà alcuna altra aggiunta, consentendo di valutare l'attività basale. Nel secondo saranno aggiunti 120 µl di elicitore preparato da un ceppo sicuramente patogeno di *Magnaporthe grisea*, che fungerà da controllo positivo. Negli ultimi due tubi verranno aggiunti 120 µl di elicitori preparati da altri ceppi che devono essere valutati.

Dopo aver mescolato, i tubi sono posti ad incubare sullo shaker a disposizione sul bancone centrale a circa 100 rpm. A 10 min dall'avvio, e successivamente ogni 10 min fino a 60 min, da ogni tubo si preleva rapidamente una aliquota da 1.2 ml che viene trasferita in una eppendorf. Dopo aver immediatamente riposto le provette ad incubare sullo shaker, si centrifugano i campioni per 1 min a 13000 rpm (ricordarsi di equilibrare in modo simmetrico le provette nel rotore della centrifuga!) in modo da far sedimentare il materiale particolato, e il supernatante viene letto a 515 nm contro tampone. Lavate ogni volta le 4 cuvette, in modo da poterle riutilizzare; scartate i liquidi negli appositi contenitori, e le eppendorfs nel materiale monouso. Si otterranno in questo modo 4 serie di valori.

Attenzione a non risospesare le cellule sedimentate, perché questo altererebbe completamente le letture: non rovesciate il supernatante nella cuvetta, prelevatene una aliquota da 1 ml con la P1000. Verificate che il valore numerico corrisponda all'intensità visuale di rosso....

C) CALCOLO DELLE ATTIVITÀ NEI DIVERSI CAMPIONI

Con ogni serie di dati sperimentali bisogna ricavare un unico dato quantitativo che rappresenti un indice della produzione di perossido da parte delle cellule. A questo fine si costruisce un grafico cartesiano in cui in ascissa viene posto il tempo in minuti, e in ordinata l'assorbanza. Dopo aver tracciato una retta che interpoli al meglio i dati ottenuti, si proceda analogamente a quanto già visto per l'attività fotosintetica (scheda a pag. 11), ma considerando che la retta questa volta passa per lo 0. Si scelga su di essa un punto da cui portare le perpendicolari ai due assi, individuando in tal modo un δ di assorbanza in un δ di tempo. Il loro rapporto rappresenta l'aumento medio di assorbanza per minuto. Da questa si ricavi il numero di nmol (o pmol, se è troppo piccolo) ridotte per secondo (utilizzando ϵ trovato nella prima parte dell'esercitazione). Si rapporti infine il dato ottenuto a 1 g di cellule. L'unità di misura dell'attività sarà in nkat (= nmol sec⁻¹) g⁻¹ o in pkat (= pmol sec⁻¹) g⁻¹.

Una volta ottenuti i 4 valori, il confronto tra l'esito sortito dai diversi trattamenti dovrebbe consentire di trarre delle conclusioni sulla patogenicità degli isolati fungini A e B. Si tenga presente che:

- più un ceppo è virulento, meno efficacemente la pianta dovrebbe reagire, e quindi meno perossido dovrebbe produrre
- il riferimento è con il ceppo sicuramente virulento: se dunque con l'elicitore B il perossido prodotto è addirittura inferiore, allora il ceppo...



Note per l'esercitatore

L'esercitazione può essere in teoria fatta con cellule di qualunque specie, purchè si disponga di idrolisati di parete fungina di corrispondenti patogeni virulenti e avirulenti. La preparazione degli idrolisati non è particolarmente complessa, e si può far riferimento alla metodica classica in Ayers AR, Ebel J, Valent B, Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol 57: 760-765; i preparati sono stabili per anni. In alternativa, vi è la possibilità di usare soluzioni di oligolatturonidi, o altre sostanze in grado di indurre lo scoppio ossidativo. Una risorsa molto semplice (che può essere spacciata allo studente per idrolisato di micelio...) è una soluzione di solfato di rame: il Cu⁺⁺, a concentrazioni tra 10⁻⁴ e 10⁻³ M, induce rapidamente un significativo innalzamento della produzione di superossido. Senza ingannare lo studente, si può in questo caso semplicemente cambiare nome alla esercitazione, puntando sulla determinazione dell'effetto dei metalli pesanti e a una sorta di *saggio biologico* per essi sulla base dell'intensità del conseguente burst.



Verifiche per lo studente

RISULTATI (Da consegnare alla fine dell'esperimento)

Cognome e nome

Diluzione della soluzione 3% per ottenere una soluzione 1 mM

nmol H ₂ O ₂	5	10	15	20	25	se ne deduce un ε pari a
A ₅₁₅						M ⁻¹ cm ⁻¹

Aumento dell'assorbanza a 515 nm:

Abs	T = 0	10	20	30	40	50	60 min
❶	0.000						
❷	0.000						
❸	0.000						
❹	0.000						

Attività di produzione del perossido in pmol sec ⁻¹ g ⁻¹ di cellule:	❶	❷	❸	❹
	(100%)	%	%	%

Valutazioni:

Il ceppo A: è un un patogeno

potrebbe non essere patogeno

Il ceppo B: è un un patogeno

potrebbe non essere patogeno

Estrazione, analisi e determinazione della concentrazione di gibberelline tramite saggio biologico

Nello Ceccarelli, Piero Picciarelli e Roberto Lorenzi, Università di Pisa

Difficoltà:	☞☞☞	Durata:	⌚⌚⌚⌚ + ⌚ + ⌚
Eseguibilità in una giornata:	☹ (almeno 4 giorni)	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	mortaiolo e pestello, o omogenizzatore pallone da 250 ml e da 25 ml beaker da 100 ml lastra di silice gel G per TLC 10 tubi di vetro a fondo conico imbuto buchner con filtro wathman imbuto separatore da 100 ml evaporatore rotante centrifuga da tavolo microsiringhe e pinzette PHmetro	Materiali:	semi di <i>Secchium edule</i> o di altra specie sabbia di quarzo etilacetato (EtOAc) cloroformio (CHCl ₃) acido acetico (AcOH) 1 N HCl semi di lattuga cv. Grand Rapids 20 capsule Petri diametro 5 cm soluzione stock di GA ₃ (1 ng/ml) H ₂ O distillata



Base teorica

Nelle piante gli ormoni sono presenti in concentrazioni molto basse, da qualche ng a qualche µg per kg di peso fresco. In genere le concentrazioni nelle parti vegetative - foglie, fusti - sono molto più basse di quelle nei semi. L'analisi di quantità così ridotte di sostanze pone problemi analitici di notevole complessità.

Le sostanze ormonali devono essere estratte dai tessuti con un solvente adatto e la miscela complessa di sostanze così ottenuta viene separata attraverso una procedura di analisi che prevede partizioni di solventi a pH diversi e vari tipi di cromatografie. La struttura delle singole sostanze ormonali viene quindi identificata mediante metodi chimico-fisici, come la spettrometria di massa. Oltre che dalla concentrazione molto bassa il lavoro di analisi è ulteriormente complicato dalla presenza, nelle singole classi ormonali, di diverse strutture. Il massimo livello di complessità si ritrova tra le gibberelline di cui si conoscono oltre cento strutture.

Se poi si vuole determinare la quantità, o la concentrazione, di un ormone in un tessuto, è necessario disporre di un adatto standard interno con il quale calcolare il recupero. Uno standard interno è costituito da un composto con caratteristiche chimiche il più possibile simili a quelle della sostanza che si vuole analizzare, idealmente la stessa molecola "marcata" con un isotopo non radioattivo (²H, ¹³C). Lo standard interno viene aggiunto all'estratto del tessuto da analizzare in quantità nota; il rapporto tra quantità iniziale e quantità finale di standard interno, al termine dell'analisi, viene quindi utilizzato nel calcolo dell'efficienza di recupero. Tutto questo fa sì che l'analisi anche di un singolo gruppo ormonale sia un'operazione lunga, che richiede competenza specifica e anche una strumentazione costosa.

Metodi di determinazione parzialmente alternativi all'analisi chimico-fisica sono i metodi immunologici e i saggi biologici. I primi possono essere molto specifici e rapidi ma devono essere accuratamente controllati e vengono utilizzati in pratica soltanto per alcune strutture ormonali. I saggi biologici hanno avuto un ruolo determinante nella scoperta e nei primi studi sugli ormoni e sono insostituibili per gli studi sull'attività biologica. Non permettono una determinazione definitiva -hanno cioè una specificità limitata- ma sono facili da effettuare, hanno una buona sensibilità, e permettono una quantificazione approssimata della concentrazione ormonale. Un saggio biologico è costituito dalla misura di un effetto fisiologico, quanto più specifico, di un ormone. Gli effetti fisiologici utilizzati sono tra i più caratteristici di quell'ormone e vanno dallo stimolo dell'allungamento dello stelo di una plantula alla induzione della sintesi di un enzima (es. α-amilasi).

Oggetto dell'esercitazione è la determinazione tramite saggio biologico della concentrazione di gibberelline in semi di *Secchium edule* o di altra specie.



Protocollo sperimentale

A) ESTRAZIONE DI GIBBERELLINE DA SEMI

- Pesare 5 g di semi e trasferirli in un mortaio di ceramica, aggiungere 25 ml di H₂O e della sabbia silicea, quindi, col pestello, ridurre in poltiglia fine.
- Centrifugare l'omogenato a 4000 rpm per 10 minuti e prelevare il surnatante.
- Aggiustare il pH a 3 con HCl 1 N.
- Trasferire in imbuto separatore da 100 ml e sottoporre l'estratto a 3 partizioni con acetato di etile utilizzando pari volumi.

- Trasferire l'estratto in acetato di etile in un pallone di vetro con apertura a cono ed evaporare sotto vuoto con l'evaporatore rotante a 30°C fino a ca. 500 µl.
- Applicare l'estratto ad una lastra di vetro rivestita di silice gel G per la cromatografia su strato sottile (TLC) e sviluppare per 15 cm utilizzando come solvente di trascinarsi la miscela: EtOAc/CHCl₃/AcOH nella proporzione 15/5/1.
- Asciugare la lastra e dividere orizzontalmente i 15 cm di silice percorsi dal solvente in 10 strisce di uguale altezza (R_f); raschiare la silice di ciascuna striscia singolarmente, trasferirla in tubi di vetro a fondo conico. Eluire la silice con 2 ml di EtOAc satura di H₂O.
- Centrifugare e ridurre l'EtOAc a piccolo volume (ca 1 ml).
- Trasferire l'estratto in EtOAc nelle capsule Petri per il saggio della lattuga e lasciare evaporare il solvente sotto cappa.

B) SAGGIO DELL'IPOCOTILE DI LATTUGA

L'allungamento dello stelo è uno degli effetti biologici più pronunciati delle gibberelline. Questo effetto si manifesta attraverso lo stimolo della divisione e dell'accrescimento cellulare. La presenza delle gibberelline in un estratto vegetale può essere messa in evidenza utilizzando l'allungamento indotto da queste sostanze sull'ipocotile di lattuga. Come prima cosa deve essere preparata una curva di taratura misurando l'allungamento dell'ipocotile di lattuga in soluzioni contenenti quantità note di gibberelline. Successivamente si misura l'allungamento dell'ipocotile di lattuga in presenza della soluzione sconosciuta (l'estratto vegetale) e si mette a confronto con la curva di taratura. La stima della concentrazione di sostanze endogene attraverso la comparazione della risposta biologica ottenuta nell'estratto vegetale con quella ottenuta con quantità note di quella sostanza è chiamato biosaggio. Procedura:

- Imbibire i semi di lattuga per qualche ora in una beuta. Metterli a germinare in una capsula Petri su carta da filtro imbibita di acqua distillata a 25 °C. Avvolgere la capsula con stagnola.
- Utilizzando delle microsiringhe, collocare nelle capsule Petri da biosaggio diverse quantità di GA₃ (10-50-100 ng).
- Mettere le capsule Petri sotto cappa assieme a quelle contenenti l'estratto vegetale da saggiare e lasciare evaporare il solvente.
- Dopo 24 ore, collocare in ogni capsula un filtro di carta e aggiungere 1 ml di H₂O distillata. Preparare 2 capsule soltanto con 1 ml di H₂O distillata (controllo). Collocare nelle capsule 10 semi germinanti di lattuga, scegliendo quelli più omogenei.
- Mantenere il test a ca. 25°C sotto illuminazione per tre giorni dopodichè misurare la lunghezza dell'ipocotile delle plantule di ogni capsula.



Verifiche per lo studente

- Riportare i dati relativi alle diverse quantità di GA₃ in tabella e costruire la curva dose-risposta.
- Utilizzando la curva dose-risposta della GA₃ stimare la quantità di gibberelline presenti nell'estratto saggiato (come GA₃ equivalenti).
- Calcolare la concentrazione di gibberelline nei semi.

DOMANDE:

1. Perché il pH dell'estratto è stato aggiustato a 3 prima della partizione con EtOAc?
2. Nella lastra TLC le GA più polari si localizzano più in alto o più vicino all'origine rispetto alle meno polari?
3. Quali devono essere le caratteristiche di un biosaggio?
4. Quando è indispensabile un biosaggio?
5. Quali sono i limiti quantitativi della determinazione tramite curva dose-risposta utilizzando uno standard?
6. Una risposta positiva del biosaggio ad una gibberellina indica che quella molecola è attiva *per sé*?

Determinazione della presenza di zuccheri riducenti in semi di orzo integri o disembrionati, trattati o meno con gibberelline

Nicoletta LaRocca e Nicoletta Rascio, Università di Padova

Difficoltà:		Durata:	
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 3
Strumentazione:	mortaiolo e pestello, o omogenizzatore centrifuga da tavolo pipettrici (P1000) bagno a 100°C	Materiali:	uva, zuccheri riducenti e non semi di orzo disembrionati e non, imbibiti e incubati \pm acido gibberellico 10^{-6} M per 12 h a 30°C in capsule petri reattivo di Nelson Provette di vetro



Base teorica

Il sistema in cui l'azione delle gibberelline è stata chiarita più in dettaglio è quello della mobilizzazione delle riserve nel seme durante la germinazione, sistema che può essere utilizzato come saggio biologico per questi ormoni. Le gibberelline sintetizzate dal coleoptile e dallo scutello dell'embrione diffondono fino alle cellule dello strato dell'aleurone, dove stimolano la produzione di α -amilasi e altre idrolasi, che frammentano l'amido contenuto nell'endosperma amilaceo. L'imbibizione del seme vitale ne avvia la germinazione, e il metabolismo dell'amido porta al rilascio di zuccheri. In assenza dell'embrione, però, le cellule dell'aleurone non ricevono alcun segnale...



Protocollo sperimentale

- Effettuare una diluizione dei diversi zuccheri, riducenti e non, a partire dalle soluzioni madri (20 mg/ml) in modo da preparare 5 provette di vetro temprato contenenti rispettivamente soluzioni a 1 mg/ml:
1. GLUCOSIO 2. GLUCOSIO 1-P 3. FRUTTOSIO 4. SACCAROSIO 5. AMIDO
- Estrarre gli zuccheri contenuti nell'uva come segue: tagliare a cubetti due acini utilizzando una lametta, macinarli in un mortaio, prelevare 2 ml del succo ottenuto e distribuirli equamente in due tubi eppendorf; centrifugare 3 min a massima velocità (14000 rpm), prelevare il surnatante e porlo in un nuovo tubo eppendorf. Allestire una sesto provetta di vetro temprato ponendo al suo interno 1 ml dell'estratto appena ottenuto.
- Preparare altre 4 provette prelevando 1 ml dalla soluzione di incubazione dei diversi campioni in cui valutare la presenza di zuccheri riducenti prodotti in seguito ad attività dell'enzima α -amilasi, rispettivamente:
mezzi semi disembrionati incubati in acqua;
mezzi semi disembrionati incubati in una soluzione di acido gibberellico 10^{-6} M;
mezzi semi con embrione incubati in acqua;
mezzi semi con embrione incubati in soluzione di acido gibberellico 10^{-6} M
- Aggiungere a ciascuna delle 10 provette 1 ml di soluzione di Nelson. Mescolarle gentilmente e chiuderle con un foglio di alluminio. Incubare le provette in bagno bollente per 15 min, quindi estrarle e porle in un bagno a ghiaccio. Rilevare quindi in quali di queste è avvenuta una variazione di colore.



Note per l'esercitatore

Per ottenere il reattivo di Nelson si preparino le due seguenti soluzioni:

Sol. A: 12.5 g Na_2CO_3 + 12.5 g tarttrato di Na K + 10 g NaHCO_3 + 100 g Na_2SO_4 , portata a 500 ml con H_2O

Sol. B: 4.78 g CuSO_4 , una goccia di H_2SO_4 , 50 ml di acqua distillata.

Conservare le soluzioni separatamente e mescolare 25 ml di sol. A con 1 ml di sol. B al momento dell'uso.



Verifiche per lo studente

Il viraggio di colore da blu, tipico del solfato di rame (CuSO_4), a rosso-arancio, dovuto alla produzione di ossido di rame (Cu_2O), è indicatore della presenza di zuccheri riducenti. Il rame passa infatti da rameico, Cu^{++} , a rameoso, Cu^+ . Lo studente commenti i risultati in relazione alla presenza o meno dell'embrione e delle gibberelline esogene.

Determinazione della concentrazione di citochinine mediante test di espansione dei cotiledoni di cetriolo (*Cucumis sativa* L.)

Valeria Scoccianti, Università *Carlo Bo* di Urbino

Difficoltà:		Durata:	 +  + 
Eseguibilità in una giornata:	☉ (da 2 a 7 giorni)	Eseguibilità per gruppi:	da  a  
Strumentazione:	Bilancia analitica Pipettatrici (P20 e P200) e pipette Incubatore a 26°C	Materiali:	Semi di cetriolo Soluzione di kinetina Capsule petri Provette per diluire la sol. di ormone



Base teorica

Per rilevare l'attività di composti ad attività citochinica presenti in estratti di tessuti o per dimostrare l'attività citochinino-simile di molecole neosintetizzate, si ricorre a dosaggi biologici ad elevata sensibilità. Uno dei test maggiormente impiegati è quello di crescita di cotiledoni isolati. Questo test si basa sul fatto che le citochinine stimolano specificamente la crescita per distensione dei cotiledoni isolati da vari semi (ravanello, zucca, cetriolo, ecc.) nel primo periodo di germinazione. Né le auxine, né le gibberelline interferiscono in modo significativo con questo test. In questa esercitazione verificheremo l'effetto di diverse concentrazioni di kinetina sulla crescita dei cotiledoni di cetriolo.



Protocollo sperimentale

- Mettere a germinare semi di cetriolo in capsule Petri su carta da filtro imbibita con acqua distillata per 5 giorni, al buio e alla temperatura di 26°C.
- Prelevare i cotiledoni, separarli, pesarli a gruppi di 10 e metterli in capsule Petri di 5 cm di diametro numerate contenenti ciascuna 9 ml di acqua distillata (controllo) o di soluzioni di kinetina a diversa concentrazione (da 10⁻⁶ a 10⁻³ M). I cotiledoni vanno fatti galleggiare con la faccia interna rivolta verso il basso. Per ogni concentrazione fare almeno tre ripetizioni (3 capsule Petri).
- Incubare al buio per 24 ore.
- Prelevare i cotiledoni da ciascuna capsula, asciugarli e ripesarli.



Note per l'esercitatore

Per rendere più complessa l'esperienza si può includere l'esame dell'effetto di una soluzione incognita di citochinine, di cui gli studenti debbano alla fine ricavare la concentrazione per interpolazione dei risultati ottenuti con concentrazioni note di kinetina.



Verifiche per lo studente

Calcolare la variazione di peso ed esprimere questa differenza in percentuale rispetto al T₀ (tempo zero) utilizzando la formula:

$$\frac{\text{peso finale} - \text{peso iniziale}}{\text{peso iniziale}} \times 100$$

Per ogni concentrazione saggiata calcolare la media delle variazioni percentuali in peso rispetto al T₀ e quindi la variazione percentuale rispetto al controllo:

$$\frac{\text{Media della variazione percentuale in peso rispetto al T}_0}{\text{Media della variazione percentuale del C rispetto al T}_0} \times 100$$

Micropropagazione di espianti vegetali e colture axeniche

Giuseppe Forlani, Università di Ferrara

Difficoltà:	☞	Durata:	⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Cappa a flusso laminare Becco di bunsen (o fornellini) Pipettatrici (P20, P200 e P1000) Bagno termostatico	Materiali:	Semi, pinzette e bisturi Capsule petri, puntali e provette sterili Alcool, candeggina, acqua sterile Soluzioni sterili di auxine e citochinine Terreno MS, saccarosio, peptone



Base teorica

Coltura *in vitro* di cellule vegetali

Il grande successo della ricerca scientifica che tra la fine dell'Ottocento e la prima metà del Novecento giunse alla delucidazione degli aspetti fondamentali della biologia e del metabolismo cellulare, nonché alla comprensione dei meccanismi molecolari della ereditarietà, ebbe tra i maggiori determinanti la possibilità di disporre di efficaci tecniche per la coltura *in vitro* di microorganismi. Popolazioni costituite da milioni di individui geneticamente identici in grado di crescere in terreni a composizione chimica definita ad una velocità di duplicazione di pochi minuti fornirono infatti un materiale sperimentale omogeneo, che poteva essere sottoposto a variazioni ambientali controllate di cui verificare l'effetto sulla fisiologia della cellula. Inoltre la selezione effettuata mediante l'imposizione di condizioni non permissive su miliardi di cellule indipendenti permise di isolare mutanti anche molto rari, tra cui dei letali condizionali che in natura sarebbero stati eliminati, la cui caratterizzazione facilitò l'identificazione della corrispondente funzione non patologica. Per molti decenni un simile approccio non fu possibile per gli eucarioti superiori. La coltura di cellule e di tessuti animali e vegetali, che avrebbe esteso anche a questi organismi i vantaggi sperimentati per i procarioti, era preclusa da due insiemi di elementi. Da una parte la lentezza di duplicazione delle cellule (da uno a parecchi giorni) a paragone delle poche ore necessarie per quelle batteriche o fungine, faceva sì che se la coltura fosse stata contaminata anche da un solo batterio o da una sola spora, nel giro di pochi giorni la popolazione eucariotica sarebbe stata completamente soppiantata da quella microbica. D'altro lato le cellule eucariotiche sembravano essere particolarmente recalcitranti a riprendere una attiva divisione cellulare. Quelle vegetali, una volta isolate da un espianto opportunamente sterilizzato in superficie, nella migliore delle ipotesi andavano incontro ad un accrescimento volumetrico, ma senza dividersi. La scoperta delle auxine nei primi decenni del Novecento accese le speranze di ottenere colture vegetali *in vitro*. Ma se fu relativamente facile ottenere colture di radici che, poste in un terreno nutritivo in presenza di auxina, si dividevano continuando ad accrescersi apicalmente, per molto tempo non si riuscì ad indurre lo stesso fenomeno con espianti di altri tessuti e, soprattutto, senza mai ottenere la crescita di cellule indifferenziate che avrebbe consentito gli stessi vantaggi sperimentali offerti dalle colture di microorganismi.

Auxine, citochinine e rigenerazione a pianta

Il quadro mutò radicalmente con la scoperta delle citochinine. Se le auxine controllano la crescita per distensione, queste inducono la ripresa della divisione cellulare, e una adeguata combinazione dei due ormoni può determinare lo sdifferenziamento di un espianto ottenuto dai più svariati tessuti della pianta, inducendo lo sviluppo di aggregati di cellule indifferenziate detti calli. Il trasferimento dei calli in un terreno di coltura liquido, mantenuto in continua agitazione per consentire una opportuna ossigenazione delle cellule, porta spesso ad una loro frammentazione in aggregati di poche decine o centinaia di cellule. Pur con le dovute limitazioni, relative soprattutto ai tempi di accrescimento (una cellula vegetale *in vitro* mostra in genere un tempo di duplicazione compreso tra le 36 e le 48 h), questi risultati misero a disposizione dei ricercatori sistemi sperimentali simili a quelli delle colture microbiche. Nel giro di pochi anni, però, ci si rese conto che le tecniche di coltura axenica di espianti vegetali potevano offrire possibilità ancora maggiori. Al contrario di quelle animali, le cellule vegetali conservano molto spesso la totipotenza, cioè la capacità di dare origine ad un intero individuo. Sottoponendo calli in coltura ad una adeguata stimolazione ormonale (in cui il rapporto tra auxine e citochinine deve essere ottimizzato di volta in volta), si può dunque ottenere la rigenerazione di plantule. Se il processo avviene in un unico passaggio mediante la transizione attraverso stadi simili agli stadi di sviluppo dell'embrione, esso prende il nome di embriogenesi somatica. Una possibile alternativa è data dall'induzione preliminare a partire da un callo indifferenziato di apici meristemati; questi sono poi indotti a radicare mediante trasferimento in un terreno di coltura in cui sia presente una diversa combinazione di ormoni; si parla in tal caso di organogenesi.

Queste metodiche consentono risultati eccezionali. Almeno in linea teorica, è possibile infatti espiantare dei tessuti da una pianta, indurre la moltiplicazione *in vitro* di milioni di cellule geneticamente identiche, e da queste rigenerare

migliaia di piante adulte, cloni perfetti dell'individuo di partenza. In alternativa si può selezionare in vitro una cellula che rechi una mutazione vantaggiosa (ad esempio la resistenza ad un patogeno), imporre delle condizioni selettive che consentano la sopravvivenza delle sole cellule che recano questa mutazione, e da questa ottenere piante che presentino la medesima caratteristica. Lo stesso può dirsi per cellule trasformate geneticamente mediante le tecniche del DNA ricombinante, da cui rigenerare piante transgeniche con migliori proprietà nutrizionali o colturali.

Micropropagazione e plantule axeniche

Anche senza considerare queste ricadute tecnologicamente più avanzate, la coltura e la manipolazione in vitro di specie vegetali, anche per la relativa facilità tecnica e il basso costo della strumentazione necessaria, sono entrate già da alcuni decenni nella filiera di alcune produzioni agro-industriali, specie nei settori orticolo, vivaistico e delle piante ornamentali. L'uso degli ormoni per la radicazione di talee è ormai entrato nella prassi comune. Molte specie vengono riprodotte per talea a partire da piantine cresciute in vitro in condizioni axeniche. La propagazione *in vitro* consente di disporre di piante sicuramente esenti da virosi, patologie che potrebbero altrimenti devastare intere coltivazioni. Non da ultimo queste metodologie, prive di controindicazioni poiché non implicano la manipolazione del genoma della pianta, consentono la riproduzione somatica (= non sessuale) di specie che hanno cicli vitali molto lunghi, o permettono di clonare su larga scala individui particolarmente produttivi, senza la necessità di dover selezionare la progenie per isolare i pochi individui che hanno ereditato il carattere.



Protocollo sperimentale

A) STERILIZZAZIONE SUPERFICIALE DI SEMI DI MAIS E DI GIRASOLE E GERMINAZIONE IN CONDIZIONI AXENICHE

I semi si prestano particolarmente all'avvio di colture axeniche. Protetti come sono da una cuticola resistente e formati da tessuti disidratati in una condizione di vita latente, sopportano in genere molto bene i trattamenti necessari ad eliminare la presenza di cellule batteriche e di spore fungine dalla superficie esterna, la cui permanenza finirebbe per portare all'inquinamento della coltura. Questi trattamenti prevedono in genere l'incubazione con etanolo e/o ipoclorito, a concentrazioni e tempi variabili in funzione dello spessore dei rivestimenti esterni, con l'aggiunta di un surfactante che faciliti la penetrazione delle miscele sterilizzanti. Gli agenti sterilizzanti devono essere poi rimossi, per evitare di danneggiare i tessuti della plantula, una volta germinata. Dal momento che il seme contiene tutti gli elementi in grado di sostenere lo sviluppo iniziale dell'embrione, la sua germinazione può essere fatta avvenire in presenza di sola acqua e agar. Questo può però mascherare la presenza di contaminanti microbici, che si svilupperebbero in modo evidente solo quando l'apparato radicale della pianta cominciasse ad essudare fotosintati. Per evidenziare subito la presenza di funghi o batteri si può aggiungere a acqua e agar un idrolisato di proteine (peptone), ottenendo dell'acqua peptonata in cui la crescita microbica procede rapidamente, divenendo visibile nel giro di pochi giorni.

Si inizi con il preparare le piastre necessarie alla germinazione. Dopo aver prelevato il terreno nel bagno termostatico a 60°C (usare della carta per maneggiare le bottiglie, in modo da non scottarsi), si mescoli bene e si trasferiscano aliquote opportune nelle piastre in cui siano già state fatte le eventuali aggiunte. Per evitare contaminazioni, aprire sia le piastre che la bottiglia con il terreno per il minor tempo possibile. Anche le pipette sterili vanno aperte quando tutto è già pronto, evitando di toccare con le mani la parte che va a contatto con il mezzo di coltura. Lo stesso vale per i puntali con cui trasferire ancor prima le opportune aliquote di peptone dalle eppendorfs alle piastre. Preparare 2 repliche per tipo, per un totale di 4 piastre.

componente	Concentrazione sol. stock	Concentr. finale	Volume da mettere	Piastre A	Piastre B
peptone (tappo nero)	50 mg ml ⁻¹	1 g l ⁻¹ µl	—	✓
Acqua e agar, ad un volume finale di 10 ml			 ml ml

Intanto che il terreno nelle piastre (che devono essere immediatamente richiuse!) solidifica raffreddandosi, si proceda alla sterilizzazione superficiale dei semi. Questi vanno trasferiti nella vaschetta sterile e ricoperti con alcool denaturato; dopo 5 min di trattamento, durante i quali i semi vengono rimescolati periodicamente, eliminare l'alcool facendolo cadere nel contenitore dei rifiuti acquosi. Per evitare che vi cadano anche i semi, tratteneteli con la pinzetta, opportunamente *flambata* (= sterilizzata alla fiamma) e raffreddata brevemente all'aria (ATTENZIONE A NON INCENDIARE L'ALCOOL...).

Rimpiazzare l'alcool con la miscela sterilizzante (5% ipoclorito, 0.04% Teepol, un surfactante), lasciando agire per 10 min. Eliminare la miscela, e sciacquare i semi per 2 volte con acqua sterile. Trasferire i semi così sterilizzati a 2 a 2 nelle piastre, servendosi delle pinzette; far affondare leggermente il seme nell'agar, premendo delicatamente con le pinzette. Sigillare le piastre con il parafilm.

B) DETERMINAZIONE DELL'EFFETTO DI DIVERSE COMBINAZIONI DI AUXINE E CITOCHININE SULLA RIPRESA DELLA PROLIFERAZIONE DA PARTE DI CELLULE DI ESPIANTI DI SPINACIO

Diversi rapporti reciproci tra i due ormoni vegetali della crescita possono portare alla proliferazione indifferenziata, con la formazione di calli, o all'organogenesi, con la produzione di radici avventizie o di fittoni. In assenza dello stimolo esogeno, al contrario, i tessuti già differenziati non riprendono la divisione cellulare. Per verificare questi aspetti, si prepari una serie di piastre secondo lo schema sotto riportato. Dal momento che le cellule che riprendono la proliferazione sono in genere fotosinteticamente inattive, è necessario utilizzare un vero terreno di coltura, chiamato MS (Murashige and Skoog, 1962):

Usando gli accorgimenti ricordati in precedenza si trasferiscano aliquote opportune nelle piastre in cui siano già state fatte le eventuali aggiunte. Per ogni tipologia, preparare 1 replica, per un totale di 4 piastre.

piastra	2,4 D (auxina, tappo rosso)			6-BAP (citochinina, tappo blu)			Terreno
	soluz. stock	conc. finale	μ l	soluz. stock	conc. finale	μ l	
C	0.1 mg ml ⁻¹	---		0.02 mg ml ⁻¹	---		q.b. a 10 ml
D	0.1 mg ml ⁻¹	2 mg l ⁻¹		0.02 mg ml ⁻¹	0.02 mg l ⁻¹		
E	0.1 mg ml ⁻¹	2 mg l ⁻¹		0.02 mg ml ⁻¹	0.2 mg l ⁻¹		
F	0.1 mg ml ⁻¹	2 mg l ⁻¹		0.02 mg ml ⁻¹	0.5 mg l ⁻¹		

Intanto che il terreno nelle piastre solidifica raffreddandosi, si proceda alla sterilizzazione superficiale degli espianti. Le foglie vengono poste nella stessa vaschetta precedentemente usata per i semi. Ricoprire con la miscela sterilizzante, lasciando agire per 10 min. Eliminata la miscela, sciacquare gli espianti per 2 volte con acqua sterile. Si trasferiscano quindi uno ad uno gli espianti nella piastra sterile da 10 cm di diametro; aiutandosi con bisturi e pinzette, opportunamente flambate alla fiamma, tagliare gli strati esterni molto probabilmente danneggiati dalla procedura di sterilizzazione; trasferire quadratini di circa 1-2 cm così ottenuti a 3 a 3 nelle piastre, servendosi delle pinzette; far affondare leggermente l'espianto nell'agar, premendo delicatamente con le pinzette. Sigillare le piastre con il parafilm.

Portare a casa le 8 capsule petri in tal modo ottenute.



Verifiche per lo studente

A) STERILIZZAZIONE E GERMINAZIONE IN CONDIZIONI AXENICHE

A casa. Incubare le piastre in un luogo luminoso e caldo, ma non alla luce diretta del sole e non vicino ad una fonte di calore. Esaminarle quotidianamente valutando:

- la germinazione dei semi, con l'emersione del germoglio e/o della radichetta
- la comparsa di eventuali contaminazioni batteriche o fungine sull'agar vicino al seme o a ridosso della radichetta

B) DETERMINAZIONE DELL'EFFETTO DI DIVERSE COMBINAZIONI DI AUXINE E CITOCHININE SULLA RIPRESA DELLA PROLIFERAZIONE DA PARTE DI CELLULE DI ESPIANTI DI SPINACIO

A casa. Incubare le piastre in un luogo caldo, ma non vicino ad una fonte di calore, scartando quelle in cui compaiono contaminazioni (attenzione a non confondere muffe con radici avventizie, e viceversa). Sulla base dei risultati concludere se:

	quiescenza cellulare	proliferazione cellulare indifferenziata	produzione di radici avventizie	produzione di germogli avventizi
l'assenza di ormoni stimola				
la prevalenza di auxine stimola				
la prevalenza di citochinine stimola				
la presenza di entrambe stimola				

Dosaggio dell'attività β -glicuronidasica in piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Maria Cristina Bonza, Università di Milano

Difficoltà:	☞☞☞	Durata:	⌚⌚⌚
Eseguibilità in una giornata:	☺	Eseguibilità per gruppi:	da 1 a 4
Strumentazione:	Bilancia analitica Fluorimetro Pipettatrici (P20 e P200) e pipette Spettrofotometro VIS	Materiali:	Piante transgeniche di <i>Arabidopsis</i> Tampone di estrazione, sol. di stop Reattivo di Folin Ciocalteu, BSA



Base teorica

Agrobacterium tumefaciens e *A. rhizogenes*, batteri gram-negativi che vivono nel suolo, sono gli agenti causali rispettivamente della malattia “crown gall” e “hairy roots” in piante dicotiledoni infettate. Il “crown gall” è caratterizzato dalla formazione di masse tumorali (galla del colletto) che si sviluppano al sito di infezione. In “hairy roots” invece si ha abbondante proliferazione di radici che si sviluppano nelle aree infette (foglie o fusti o radici). Ambedue i tessuti indotti dall'infezione con *Agrobacterium* sono tessuti vegetali tumorali cioè capaci di proliferare *in vitro* in modo illimitato e autonomamente, senza cioè l'aggiunta di fitoormoni necessari per la crescita in vitro di cellule vegetali non infette. In coltura senza ormoni, cellule “crown gall” formano masse di tessuto amorfo (calli), cellule “hair roots” si differenziano in tessuto radicale. Ambedue i tessuti producono e secernono una classe di composti (derivati di aminoacidi) detti “opine”. L'induzione della crescita tumorale dipende dall'integrazione ed espressione nel genoma della cellula ospite di un particolare segmento di DNA (T-DNA o R-DNA per *tumefaciens* e *rhizogenes*) contenuto in un plasmide (Plasmide Ti o Ri) portato dai ceppi virulenti di *Agrobacterium* (Zambrysky et al., Cell 56, 193, 1989). Vari elementi genetici sono necessari per l'infezione e l'induzione di tumorigenicità:

- i geni *chvA* e *chvB*, localizzati sul cromosoma di *Agrobacterium*, che mediano l'attacco alla pianta;
- i geni *vir*, localizzati sul plasmide Ti o Ri, mediano la mobilitazione del segmento T o R-DNA;
- il frammento plasmidico T-DNA (o R-DNA) caratterizzato da due sequenze identiche di 24 paia di basi ciascuna ai due estremi e da elementi genetici all'interno che mediano funzioni necessarie per la sintesi endogena e il metabolismo di auxine e citochinine necessarie per l'acquisizione della tumorigenicità.

Nel complesso gli agrobatteri virulenti realizzano un processo di trasformazione genetica in quanto sono capaci di inserire un frammento del loro DNA nella cellula ospite. Come tali possono essere utilizzati, con opportune modifiche, come vettori per manipolazioni genetiche nelle piante suscettibili.

SAGGIO DELL'ATTIVITÀ DI GENI “REPORTER” IN PIANTE TRANSGENICHE

Il controllo dell'attività di un gene si esercita a vari livelli: controllo della trascrizione, della traduzione, dell'attività del prodotto. Di particolare rilievo è il controllo della trascrizione operato da sequenze promotrici (generalmente poste a monte della sequenza codificante) che assicurano il livello di trascrizione, la tessuto-specificità della espressione o la dipendenza della trascrizione da stimoli esterni (luce-buio-temperatura, ecc.). È possibile saggiare le proprietà di sequenze promotrici costruendo un gene chimerico portante ad esempio:

- 1- una sequenza che codifica per un particolare enzima di facile dosaggio, suscettibile di visualizzazione istochimica e non presente nei tessuti vegetali (gene “reporter”);
- 2- una sequenza promotrice putativa agganciata a monte della sequenza nucleotidica che codifica per la funzione “reporter”.

Il costrutto è quindi inserito nel segmento T-DNA in posizione adiacente al gene Kan R (gene che codifica per una proteina che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina; ciò è utile perchè permette di selezionare subito le cellule effettivamente trasformate) e integrato nel genoma della pianta mediante infezione con *Agrobacterium*. Di conseguenza la trascrizione del gene “reporter” e quindi la comparsa dell'attività enzimatica da esso codificata nei tessuti della pianta transgenica dipenderanno dal tipo di promotore utilizzato. In sintesi il sistema permette la valutazione della capacità promotrice e della tessuto-specificità di vari putativi promotori nelle piante. Se si utilizzano invece promotori “forti”, come per esempio quelli virali, che consentono trascrizione elevata e costitutiva, si può ottenere in pianta una super produzione di proteina eterologa.

L'obiettivo dell'esercitazione è duplice:

- 1- dosare l'attività del gene “reporter” β -glicuronidasi (GUS) in tessuti fogliari di piante transgeniche. A questo scopo si utilizzano piante di *Arabidopsis thaliana* transgeniche per inserzione del gene GUS sotto controllo del promotore 35S, una sequenza di DNA promotrice della trascrizione di un mRNA 35S del virus del mosaico del cavolfiore. Questo promotore dà trascrizione elevata e costitutiva cioè promuove la trascrizione del gene a cui è legato con alta efficienza ed in quasi tutte le cellule.

- 2- Visualizzare per via istochimica la localizzazione dell'attività GUS in piante transgeniche di *A. thaliana* in cui l'espressione del gene è sotto controllo del promotore S35 o di un promotore tessuto specifico. Come materiale di controllo si utilizzano piante di *Arabidopsis* non geneticamente trasformate.

Il gene "reporter" utilizzato in questa esercitazione è il gene di *E. coli* che codifica per l'enzima β -glicuronidasi (GUS). L'enzima catalizza l'idrolisi di legami β -glicuronidici, è molto stabile e praticamente assente nella maggior parte delle piante. Un conveniente substrato per il saggio dell'attività GUS è il 4-metilumbelliferil- β -D-glicuronide (MUG): la reazione catalizzata è $MUG \leftrightarrow$ acido glicuronico + 4-metilumbelliferone (MU). MU è fortemente fluorescente a pH alcalino quando eccitato con luce di 350 nm e con emissione massima a 450 nm. Di conseguenza è possibile valutare la conversione di MUG (non fluorescente) a MU valutando la fluorescenza di MU alla lunghezza d'onda di emissione utilizzando uno spettrofluorimetro.

La visualizzazione istochimica della presenza di attività GUS in piante transgeniche è possibile utilizzando come substrato per l'enzima il composto 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glicuronide (X-Gluc). Incubando sezioni di tessuto con X-Gluc, il substrato penetra nelle cellule e in presenza di GUS libera 5-bromo-4-cloro-3-indolo che è insolubile e forma un precipitato di colore blu intenso (blu-indigo). Di conseguenza l'osservazione al microscopio di cellule contenenti il precipitato blu è sintomo dell'espressione in quelle del gene GUS.



Protocollo sperimentale

A) PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO ENZIMATICO

L'estratto è preparato da foglie di *A. thaliana* transgeniche (cioè portanti il gene che codifica per l'enzima β -D-glicuronidasi) omogenizzate in mortaio con tampone di estrazione (TE, tampone sodio-fosfato 50 mM pH 7,0, contenente β -mercaptoetanol 10 mM, Na_2EDTA 10 mM, sodiolarilsarcosina 0,1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v)) in presenza di un agente abrasivo (sabbia). N.B.: è essenziale che ogni studente prenda nota sia del peso delle foglie utilizzate, sia del volume di TE usato per l'omogenizzazione. L'omogenato verrà quindi centrifugato per 1 min a 8000 rpm; si otterrà un sovrantante, contenente le proteine solubili, fra cui la β -D-glicuronidasi, e un precipitato. Il sovrantante costituisce il nostro estratto.

B) DOSAGGIO DELLE PROTEINE NELL'ESTRATTO

Utilizzeremo un metodo colorimetrico (modificazione del metodo di Lowry) che sfrutta la reazione dei gruppi fenolici dei residui tirosinici con il reattivo di Folin e Ciocalteu. Quando tale reattivo, che consiste in una soluzione di sali di sodio degli acidi tungstici, molibdenici e fosforici, reagisce con i gruppi fenolici della tirosina in presenza di ioni rameici produce una colorazione blu/porpora che presenta un massimo di assorbimento a 660 nm. La concentrazione di proteine nei campioni in esame viene determinata confrontando l'assorbanza dei campioni con quella di campioni contenenti concentrazioni note di una proteina standard (comunemente l'albumina di siero bovino, BSA). Il dosaggio prevede due fasi successive. In una prima fase i campioni vengono fatti reagire con il rame in ambiente alcalino. Successivamente si aggiunge il reattivo di Folin Ciocalteu che viene ridotto dal complesso rame-proteine passando dal colore giallo a quello blu. Allestire due serie di campioni contenenti quantità scalari di BSA o di estratto enzimatico in un volume totale di 1 ml, come indicato nella tabella sotto riportata

Campione	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA (μ g)	0	10	15	25	40	60	100	0	0
BSA (μ l di una sol. 1 mg/ml)									
E (μ l)	---	---	---	---	---	---	---	X	2X
H ₂ O (μ l fino a 1 ml)									

Aggiungere a ciascun campione 3 ml di reagente A e agitare bene. Incubare 15 min a temperatura ambiente. Aggiungere 0.3 ml di reagente B e agitare subito (campione per campione) molto bene. Incubare 45 min a temperatura ambiente. Leggere l'assorbanza a 660 nm.

Reagente A: Na_2CO_3 2%, NaOH 0.2%, Na-tartrato 0.16%, SDS 1%, $CuSO_4(5H_2O)$ 4%

Reagente B: Folin Ciocalteu diluito 1:1 con H₂O

Allestire una curva di taratura riportando in grafico su carta millimetrata in ordinate i valori di assorbanza e in ascisse le quantità di BSA presenti nella miscela di reazione. Determinare graficamente la quantità di proteine presente nei campioni di estratto enzimatico. Calcolare 1) la concentrazione di proteine dell'E (mg/ml) e 2) le proteine estratte per grammo di foglia.

C) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA β -GLICURONIDASICA (GUS)

L'attività enzimatica sarà espressa come moli di reagente consumato o, nel nostro caso, moli di prodotto (MU) formato per minuto per mg di proteine. Si ricorda tuttavia che è presupposto fondamentale che la misura dell'attività enzimatica sia eseguita determinando la velocità iniziale (v_i) della reazione. L'esperimento avrà quindi lo scopo di verificare se l'attività enzimatica misurata soddisfa la condizione della v_i e la relazione fra v_i e concentrazione di enzima nel saggio. L'obiettivo è misurare la produzione del prodotto della reazione (MU) nel tempo in una miscela di reazione contenente il substrato (MUG) e l'estratto enzimatico (E). Si noti tuttavia che verrà usato un metodo discontinuo di valutazione della quantità di MU che si forma nel tempo. Ciò perchè la reazione procede a pH 7, mentre la quantità di MU verrà valutata mediante misura fluorimetrica a pH 10 in quanto è solo a questo pH alcalino che MU fluoresce. Si dovranno allestire quindi una miscela di reazione e una serie di provette contenenti una soluzione alcalina (provette stop) in cui aggiungere a tempi diversi aliquote della miscela di reazione.

Composizione della miscela di reazione (volume finale 1 ml):

Substrato MUG 2 mM	500 μ l (calcolare la concentrazione finale)
TE	480 μ l *
E	20 μ l *

* I volumi di E (e di conseguenza di TE) sono passibili di variazioni a seconda dell'attività osservata nel I° dosaggio.

Composizione della soluzione di stop:

Na_2CO_3 0,2 M	1,9 ml per provetta
--------------------------------	---------------------

1° saggio:

aggiungere alla miscela di reazione l'estratto E, agitare e contemporaneamente far partire il cronometro. Prelevare un'aliquota di 100 μ l della miscela di reazione a tempi progressivi (1 - 2 - 3 - 5 - 10 min) e immerterla nella provetta stop. Si noti che nella provetta stop la reazione si arresta a causa del pH alcalino. Procedere alla misura della fluorescenza del MU nelle provette stop. Misura fluorimetrica. La calibrazione dello strumento è compiuta precedentemente e corrisponde a: MU 50 nM = 500 unità di fluorescenza. Utilizzare sempre lo stesso fluorimetro e la stessa cuvetta, dopo aver provveduto ad azzerare lo strumento contro la soluzione di stop. Si noti che il fluorimetro dà misure lineari di fluorescenza nell'intervallo 0 \Rightarrow 5000 unità di fluorescenza. Qualora il valore misurato ecceda 4000, si dovrà procedere a diluire i campioni.

2° saggio:

ripetere il saggio variando (raddoppiando o dimezzando) la quantità di E presente nella miscela di reazione.

Entrambi i saggi vanno ripetuti almeno due volte.



Verifiche per lo studente

ELABORAZIONE DEI DATI

1 - Riportare in tabella i valori di fluorescenza (F) misurati: la variazione di fluorescenza (ΔF), che è proporzionale alla concentrazione di MU nella cuvetta di lettura, nel tempo è una misura della velocità di reazione. N.B.: la lettura al 1° minuto è comprensiva del "bianco" (MU presente nella soluzione di MUG, fluorescenza endogena del campione, eventuale differenza di azzeramento fra la vostra cuvetta e quella usata per azzerare lo strumento), per cui non potete determinare la velocità di reazione durante il 1° minuto.

E μ l

min	I° campione			II° campione		
	F	ΔF dal min 1	$\Delta F/\text{min}$	F	ΔF dal min 1	$\Delta F/\text{min}$
1		---	---		---	---
2						
3						
5						
10						
media $\Delta F/\text{min}$	////	////		////	////	
dev. standard	////	////		////	////	

Compilare una tabella analoga per la seconda quantità di estratto analizzato.

In linea generale ci si può attendere che la velocità di reazione diminuisca nel tempo in quanto si riduce progressivamente la concentrazione del substrato e la reazione procede verso l'equilibrio (velocità netta uguale a zero). Tuttavia, fintanto che la quantità di substrato trasformato è relativamente piccola rispetto alla quantità di substrato iniziale (per cui la concentrazione di substrato non varia significativamente nel tempo) e la concentrazione di prodotto formato è bassa (per cui la velocità della reazione inversa è trascurabile) la reazione può procedere linearmente, cioè a velocità costante (purchè non ci sia inattivazione dell'enzima durante l'incubazione) e la velocità misurata rappresenta una misura della velocità iniziale di reazione.

Per determinare se e come la velocità varia nel tempo, potete (e dovete) operare in due modi:

a) Determinare (campione per campione) la variazione di fluorescenza (ΔF) dal min 1 e la variazione di fluorescenza per minuto [(F2-F1)/(t2-t1), (F3-F2)/(t3-t2) ecc.]. In caso di rallentamento della velocità di reazione si osserverà un decremento progressivo dei valori di $\Delta F/\text{min}$. Se la velocità di reazione è costante ci si attendono valori uguali per ogni misura di $\Delta F/\text{min}$ e gli eventuali scostamenti dovuti all'errore sperimentale saranno sia positivi che negativi. In quest'ultimo caso, il valore medio dei $\Delta F/\text{min}$ ($\Sigma \Delta F/\text{min}$ / numero delle misure) è una misura della velocità iniziale della reazione in esame e la deviazione standard (S) è una stima dell'errore associato alla misura.

b) Riportare in grafico su carta millimetrata i valori di F misurati ed in ascissa i tempi corrispondenti. In caso di rallentamento della velocità di reazione la pendenza della curva descritta dai punti sperimentali diminuisce nel tempo. Se la velocità di reazione è costante, i punti sperimentali definiscono una retta la cui pendenza è una misura della velocità iniziale di reazione: gli eventuali scostamenti dei dati sperimentali dovuti all'errore sperimentale saranno sia positivi che negativi rispetto alla pendenza della retta che meglio interpola i dati sperimentali. Per determinare i parametri pendenza (b) e termine noto (a) della retta ($y = bx + a$) che

meglio interpola i vostri dati potete usare l'analisi di regressione lineare col computer o con la calcolatrice. Notate che in entrambe i casi, l'errore sperimentale dei nostri saggi è tutto a carico di y, assumendo che non vi sia errore associato ai tempi di prelievo.

La pendenza della retta ($\Delta F/\text{min}$) è una misura della velocità iniziale di reazione: se l'errore associato alle vostre misure non è troppo alto questa misura coincide, o quasi con il valore medio di $\Delta F/\text{min}$ calcolato precedentemente. Per ogni quantità di estratto utilizzata, mediate tutti i valori di $\Delta F/\text{min}$ ottenuti (coi due metodi, da ognuno dei campioni fatti).

A questo punto procedete a convertire le velocità di reazione misurate come $\Delta F/\text{min}$ in moli di MU prodotte per minuto per mg di proteine, come indicato nella tabella seguente. Nel fare questo dovete tener conto passo per passo di tutte le diluizioni che avete operato, dall'estratto iniziale fino ad ottenere il campione di cui avete misurato la fluorescenza.

	... μl E / campione	... μl E / campione
$\Delta F/\text{min}$ nel campione di lettura		
$\Delta[\text{MU}]/\Delta t$ nel campione di lettura (nM / min)		
MU/min prodotto nel camp.di misura* (moli/(min x camp))		
MU/min prodotto per ml di E** (moli / (min x mlE))		
MU/min prodotto per mg proteine (moli / (min x mg prot))		

* tenete conto del fatto che il volume totale del campione di misura era di 1 ml e che per leggere F avete diluito 100 μl di miscela di reazione con 1.9 ml di miscela di stop

** tenete conto del fatto che prima di usarlo avete diluito l'estratto E.

Il confronto fra i risultati ottenuti utilizzando diverse quantità di E vi permette di stabilire che relazione c'è fra la velocità di reazione e la concentrazione di enzima.

c) I dati raccolti vi permettono anche di calcolare quanto substrato è stato consumato nella miscela di reazione e quindi la concentrazione finale del substrato e del prodotto ad esempio dopo 10 min di incubazione.



Protocollo sperimentale (alternativo o complementare)

ESPERIMENTO IN VIVO

Rivelazione di attività β -glicuronidasi in piante transgeniche

Qualitativamente, la presenza del transgene può essere visualizzata istochimicamente. Semi sterilizzati di piante transgeniche che esprimono il gene della GUS sotto controllo del promotore 35S o sotto il controllo del promotore ATHB-8 sono stati posti su un terreno agarizzato e lasciati germinare in posizione verticale in camera di crescita (20-24°C). Dopo 5-10 giorni i germinelli sono lunghi 1-1.5 cm e sono pronti per essere trasferiti in 1-1.5 ml di staining solution composta come segue:

- 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glicuronide)
- 100 mM Sodio fosfato pH 7.0
- 10 mM EDTA
- 0.5 mM Potassio ferrocianuro
- 0.5 mM Potassio ferricianuro

In presenza di GUS l'XGluc libera 5-bromo-4-cloro-3-indolo che è insolubile e forma un precipitato di colore blu intenso (blu-indigo). Di conseguenza l'osservazione al microscopio di cellule contenenti il precipitato blu è sintomo dell'espressione del gene GUS.

La colorazione di 35S::GUS è visibile in meno di 1 h, quella di ATHB-8::GUS in un paio d'ore. Per assicurare l'assorbimento del substrato in tutta la plantula, l'osservazione al microscopio verrà fatta dopo 20-24 ore di incubazione in presenza del substrato stesso.