



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE

ELABORATO DI LAUREA

Espressione transiente di YFP in *Jatropha curcas* (L.)

TUTOR: PROF. BARBARA BALDAN
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CO-TUTOR: DOTT. STEFANO BISOGNO
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

LAUREANDO: GIOVANNI NIERO

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

1. INTRODUZIONE

La produzione di organismi vegetali geneticamente modificati è utile principalmente in due ambiti: in primo luogo la ricerca pura può trarre grande quantità di informazioni da una pianta geneticamente modificata; mediante manipolazioni genetiche mirate (come il silenziamento di uno specifico gene, la variazione di espressione genica o l'aggiunta di un gene esogeno) è possibile indagare sulla regolazione e sulla funzione di geni, nonché sulle associate funzioni proteiche. In secondo luogo la ricerca applicata riesce a ottenere miglioramenti nei metodi di produzione agricola di una determinata specie vegetale (piante resistenti a insetti, piante resistenti a microorganismi e così via) e miglioramenti a livello del prodotto finale (frutti con più vitamine, alimenti nutraceutici, piante in grado di sovraesprimere metaboliti utili nell'industria alimentare, chimica e farmaceutica).

Ciò che si è cercato di ottenere in laboratorio è la trasformazione di *Jatropha curcas* (Linneo), resistente arbusto della famiglia delle *Euphorbiaceae*, con un preciso intento applicativo. *J. curcas* ha infatti attirato l'attenzione globale negli ultimi anni come un'importante fonte di biodiesel, e di olio combustibile più in generale. I semi di *J. curcas* contengono il 30 ÷ 40% di olio (fino a picchi più alti del 50 ÷ 60%) che può essere usato come carburante per motori a scoppio (l'olio ha caratteristiche simili ai combustibili fossili). La produzione di biodiesel da olio vegetale, assieme al bioetanolo, sta fornendo un apporto sempre maggiore alla richiesta di carburante a livello mondiale (Slocombe, 2009). Tuttavia la coltivazione di specie vegetali come risorsa di biodiesel tende a essere frenata a causa del fatto che queste piante sottraggono terreno e risorse utili all'agricoltura. Da questo punto di vista *J. curcas* risulta essere strategica: può essere coltivata anche in terreni poveri e con bassi tassi di precipitazioni piovose grazie alle sue straordinarie capacità di adattamento; si tratta inoltre di una pianta difficilmente attaccabile da parassiti, con una bassa sensibilità a malattie, di rapida crescita e facile attecchimento (Openshaw, 2000); infine, contrariamente a molte specie vegetali annuali usate come fonte di biodiesel, *J. curcas* è una pianta perenne, che grazie al suo profondo apparato radicale garantisce una richiesta d'acqua e di nutrienti più omogenea, favorisce il mantenimento del suolo e assicura una

maggior resa in termini di biomassa (King, 2009). L'olio dei semi di *J. curcas* (non commestibile a causa dell'elevata quantità di esteri di forbole e lectine) è usato anche nella manifattura di un grande numero di utensili, come candele, saponi, cosmetici, biopesticidi, fertilizzanti e come principio attivo per guarire alcune patologie della pelle. Un elevato sfruttamento dell'olio di *Jatropha* in tutti questi settori può comportare l'aumento della presenza nell'ambiente di quegli elementi tossici, con possibili ripercussioni negative sulla salute dell'uomo.

Quello dell'ingegneria genetica sembra essere un buon approccio per ridurre i livelli di queste sostanze tossiche, per aumentare ulteriormente la resistenza della pianta agli stress, ma anche per aumentare l'accumulo di olio o per modificarne la qualità, al fine di ottenere combustibili di migliore efficienza.

A questo proposito, lo sviluppo di sistemi di rigenerazione è un prerequisito fondamentale per le manipolazioni genetiche da effettuarsi in questa pianta; attualmente la rigenerazione di *J. curcas* può essere effettuata mediante varie tipologie di espianti, come ad esempio da foglia, da picciolo, da ipocotile e via embriogenesi somatica da espianti di foglia matura (Mazumdar, 2010).

Analizzando la situazione da un punto di vista socio-economico emerge che l'olio di *J. curcas*, e più in generale quello derivato da altre specie vegetali, non è attualmente in grado di competere con il prezzo del petrolio e del carbone; si tratta tuttavia di una situazione temporanea, destinata a subire un'inversione di tendenza: non appena le riserve di combustibili fossili diminuiranno, arrivando al di sotto di una soglia critica, il biodiesel diventerà competitivo. Nel frattempo quindi, in un'ottica di lungimiranza, le nazioni dovrebbero investire sulla conoscenza, sulla ricerca e sull'uso di questa versatile pianta, così da essere pronte non appena il biodiesel diventerà competitivo con gli attuali carburanti (Openshaw, 2000).

2. MATERIALI E METODI

2.1 PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), prevede che una regione di DNA venga copiata molte volte da una DNA polimerasi.

Si può scegliere qualsiasi regione di qualunque molecola di DNA, purchè ne siano note le sequenze ai confini. Ciò è necessario perché, per eseguire una PCR, due brevi oligonucleotidi devono ibridare con la molecola di DNA. Questi oligonucleotidi che agiscono da primer per le reazioni di sintesi del DNA, delimitano la regione che verrà amplificata. Ciascun primer deve essere complementare al suo filamento stampo perché avvenga una corretta ibridazione.

Il primo punto importante da considerare è la lunghezza dei primer: se sono troppo brevi potrebbero ibridare in siti diversi da quelli bersaglio (portando ad amplificazione aspecifica); d'altro canto se i primer sono troppo lunghi, il tempo richiesto per il corretto appaiamento potrebbe dilatarsi troppo (portando a mancata amplificazione).

Per una reazione di PCR sono necessari: il DNA stampo, i primer, la polimerasi e i dNTPs. Durante ciascun ciclo di PCR la miscela di reazione viene incubata a temperature diverse:

- la temperatura di denaturazione (solitamente 94°C) spezza i legami tra le coppie di basi e rilascia DNA a singolo filamento che agisce da stampo nel ciclo successivo di sintesi di DNA;
- la temperatura di ibridazione alla quale i primer si attaccano allo stampo (detta anche temperatura di appaiamento). La temperatura di appaiamento è fondamentale poiché influenza la specificità della reazione (l'ibridazione DNA-DNA è un fenomeno che dipende infatti dalla temperatura). Se la temperatura è troppo alta l'ibridazione non può avvenire; se la temperatura è troppo bassa, diventano stabili anche ibridi male appaiati. La temperatura di appaiamento deve essere abbastanza alta da impedire la formazione di ibridi male appaiati, ma abbastanza bassa da permettere l'ibridazione tra primer e stampo. Questa temperatura si può stimare determinando la temperatura di

fusione (o temperature of melting T_m) dell'ibrido primer-stampo (temperatura alla quale si dissocia l'ibrido appaiato correttamente).

La T_m viene calcolata mediante la formula:

$$T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

- la temperatura di estensione, alla quale avviene la sintesi di DNA, solitamente $74 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Brown, 2007).

2.2 GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi è una tecnica di laboratorio che utilizza differenze di carica elettrica (generate da un anodo e da un catodo) per separare molecole cariche presenti in una miscela. Le molecole di DNA hanno cariche negative e quindi, quando vengono poste in un campo elettrico, migrano verso il polo positivo. Le dimensioni della molecola di DNA diventano un fattore determinante nella separazione se l'elettroforesi è eseguita in un gel. Un gel di agarosio costituisce un reticolo complesso di pori attraverso i quali le molecole di DNA devono viaggiare per raggiungere l'elettrodo positivo: più piccola è la molecola di DNA e più velocemente questa potrà migrare attraverso il gel. L'elettroforesi in gel separa perciò le molecole di DNA secondo le loro dimensioni. La composizione del gel determina le dimensioni delle molecole che si possono separare. Un gel di agarosio allo 0.5% (che forma pori relativamente grandi) si usa ad esempio per molecole nell'ambito di dimensioni $1 \div 30 \text{ kb}$ e permette di distinguere chiaramente molecole di 10 e di 12 kb. All'altra estremità un gel di agarosio al 4%, con pori estremamente piccoli, viene usato per separare molecole di DNA molto piccole. Il modo più semplice per visualizzare i risultati di un esperimento di elettroforesi in gel è quello di colorare il gel con un composto che rende visibile il DNA. Il bromuro di etidio EtBr (molecola organica aromatica in grado di intercalarsi al DNA) è la sostanza maggiormente utilizzata per colorare il DNA.

Dopo colorazione con EtBr sono chiaramente visibili sotto luce UV le bande che mostrano le posizioni delle diverse classi di dimensioni dei frammenti di DNA (Brown, 2007).

L'agarosio viene sciolto per riscaldamento in un tampone TAE 1X (40mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). Una volta che l'agarosio si è completamente sciolto, si aggiunge EtBr (l'operazione va svolta sotto cappa chimica). Si versa la soluzione così ottenuta nell'apposita vaschetta munita di pettine (l'operazione va svolta sempre sotto cappa). Dopo qualche minuto il gel solidificato viene posto nella camera elettroforetica (riempita di TAE 1X). I campioni di DNA vengono caricati nei pozzetti formati dal pettine; solitamente nel primo pozzetto viene caricato un marcatore di peso molecolare contenente frammenti di DNA di lunghezza e concentrazione stabilita (il ladder servirà a determinare la lunghezza dei frammenti di DNA separati dall'elettroforesi). Gli elettrodi vengono collegati ad un generatore di corrente; terminata la separazione (effettuata solitamente a 95V per 50 minuti) le bande vengono visualizzate al trans illuminatore, mediante eccitazione a raggi UV.

2.3 AGROINFILTRAZIONE

L'agroinfiltrazione è una metodica utile a effettuare trasformazioni transienti di organismi vegetali. Gli agrobatteri da iniettare nella pianta (cresciuti over-night fino ad una $OD_{600} = 0.6 \div 0.8$) vengono centrifugati nel terreno liquido di coltura (2 min a 12800 g). Terminata la centrifugazione ed eliminato il surnatante, i batteri vengono risospesi in un mezzo adatto all'agroinfiltrazione (MS 2%). Una siringa senz'ago viene caricata con la soluzione batterica appena ottenuta; la siringa viene appoggiata sulla pagina fogliare inferiore, mentre sulla pagina fogliare superiore si esercita pressione con un dito. A questo punto, premendo lo stantuffo della siringa e opponendo una resistenza piuttosto energica con il dito sulla pagina fogliare opposta, avverrà l'agroinfiltrazione in senso stretto (infiltrazione di agrobatteri nel tessuto fogliare). Efficienze di agro infiltrazione migliori si ottengono con due accorgimenti: in primo luogo la pianta deve essere ben idratata nei giorni precedenti all'agroinfiltrazione, in modo tale da ottenere un'ottimale apertura degli stomi; in secondo luogo è possibile praticare delle lievi escoriazioni a livello dell'epidermide fogliare inferiore, in modo da favorire l'ingresso della soluzione contenente i batteri. Sono state agroinfiltrate piante di 3 mesi della varietà MXMO (Fig. 1).



Fig 1: pianta *J. curcas* della varietà MXMO di tre mesi circa

2.4 MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Le osservazioni e le foto sono state effettuate utilizzando un microscopio Leica B5000 provvisto di telecamera DFC 425 C e un pc provvisto del software LAS V3.8 per l'acquisizione delle immagini. Per l'osservazione dell'espressione della proteina YFP sono stati utilizzati i filtri di eccitazione a 450-490 nm e di emissione a 500-550 nm.

2.5 PREPARAZIONE DEL PLASMIDE pG29Y

Per ottenere il vettore pG29Y si è partiti dal plasmide pG0029 (Fig.2).

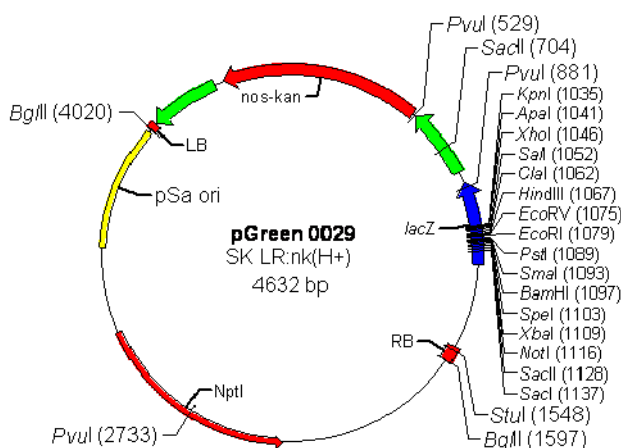


Fig. 2: plasmide pG0029 (www.pgreen.ac.uk); possiede una cassetta di policlontaggio e i geni codificanti per la resistenza alla Kanamicina

Il plasmide pG0029 ci è stato fornito all'interno di *E.coli* (www.pgreen.ac.uk). Il plasmide pG0029 è stato quindi estratto mediante kit Promega PureYield™ Plasmid Miniprep System (seguendo il protocollo fornito dal produttore) e digerito, a livello della cassetta di policlonoaggio, con gli enzimi di restrizione XhoI/NotI. Parallelamente, la sequenza codificante per il promotore costitutivo 35S, è stata amplificata mediante PCR e digerita con gli enzimi XhoI/NotI. Si è effettuata a questo punto la ligazione tra il plasmide e la sequenza nucleotidica del promotore 35S con la ligasi T₄ Promega (seguendo il protocollo fornito dal produttore). Il plasmide pG2935 è stato utilizzato per trasformare il ceppo di *E.coli* DH5 α , reso competente con metodologia CaCl₂. I batteri trasformati con questo costrutto sono stati piastrati e selezionati, tramite lo screening bianco/blu, su terreno contenente Kanamicina 50 mg/L, IPTG 0.2 mM e X-gal 40 mg/L. Il plasmide pG2935 è stato quindi estratto mediante miniprep e digerito con gli enzimi di restrizione BamHI/EcoRI. Parallelamente la sequenza codificante la YFP è stata amplificata mediante PCR e digerita con gli enzimi di restrizione BamHI/EcoRI. Si è effettuata a questo punto la ligazione tra il plasmide e la sequenza nucleotidica della YFP. Il plasmide pG29Y così ottenuto è stato utilizzato per trasformare *E.coli*. Il plasmide pG29Y all'interno di *E.coli* è stato amplificato, purificato tramite miniprep e utilizzato per co-trasformare con pSoup (necessario per la replicazione in trans del plasmide pGreen) il ceppo GV3101 di *A.tumefaciens* reso competente con CaCl₂.

2.6 DOSAGGIO LIPIDICO

Attraverso la tecnica del dosaggio lipidico è possibile ottenere una stima del contenuto in trigliceridi (TAG) di un espianto vegetale; in laboratorio questa procedura è stata applicata per diverse tipologie di tessuto: seme, endosperma, cotiledoni e foglia. Il protocollo da seguire si suddivide in 4 fasi (adattato da Conkey, 1988):

1) Estrazione dei trigliceridi:

- raccogliere il campione in eppendorf da 1.5 mL (circa 5 mg di tessuto per i semi, 50 ÷ 200 mg per i tessuti meno ricchi di lipidi);
- aggiungere 100 μ L di isopropanolo e omogeneizzare i tessuti usando un pestello (eventualmente aiutarsi con azoto liquido);
- portare a 1 mL con isopropanolo e continuare l'estrazione in agitazione per 15 min;
- centrifugare a 12800 g per 5 min.

2) Purificazione dei trigliceridi:

- prelevare 800 μ L di supernatante e aggiungerlo in una falcon da 15 mL contenente 0.8 g di alumina e 1.8 mL di isopropanolo;
- mantenere in agitazione per almeno 5 min;
- sedimentare l'alumina tramite centrifugazione a 1300 g per 5 min.

3) Colorazione:

- prelevare 800 μ L del supernatante e trasferirli in una falcon pulita da 15 mL;
- aggiungere 200 μ L di KOH 1 M e tenere a 60 °C per 5 min.;
- dopo aver raffreddato il campione a temperatura ambiente, aggiungere 200 μ L di una soluzione di sodio metaperiodato 0.12 M in acido acetico 2M e mescolare bene;
- dopo 10 min. aggiungere 1.2 mL di una soluzione di ammonio acetato 0.7 M e acetilacetone 0.125 % (v/v) in isopropanolo, mescolare e tenere a 60 °C per almeno 30 min.

4) Quantificazione dei trigliceridi:

La soluzione ottenuta dalla colorazione va misurata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 410 nm. In caso i campioni debbano essere diluiti, l'aggiunta del solo isopropanolo potrebbe dare origine a dei precipitati: per questo motivo è necessario preparare una soluzione di diluizione ammonio acetato 0.3 M, KOH 0.08 M, 8% della soluzione di metaperiodato di sodio in acido acetico e 0.125% (v/v) di acetilacetone.

2.7 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Tre dischi fogliari trasformati con pG29Y vengono posti in una eppendorf da 1.5 mL; il materiale viene pestato servendosi di un motor-pestle con l'aiuto di azoto liquido. Si continua la pestatura aggiungendo 300 μ L di tampone di lisi, fino ad ottenere un omogeneizzato. Il tampone di lisi è composto da Tris 0.1 M, NaCl 0.2 M, Triton X-100 0.2% e EDTA 1 mM a cui vengono aggiunti gli inibitori di proteasi Leupeptina (1 μ l) e PMFS (0.5 mM). La soluzione ottenuta viene centrifugata per 10 min a 12800 g. Al termine della centrifugazione si recupera il surnatante per sottoporlo alla quantificazione proteica.

2.8 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La concentrazione proteica del campione viene determinata secondo il metodo di Bradford. Si allestisce una retta di taratura con diluizioni crescenti di standard proteico BSA, albumina di siero bovino (Tab. 1):

	BSA 1 mg/mL (μL)	H₂O (μL)	[BSA]_{fin} (mg/mL)
1	4	36	0.1
2	10	30	0.25
3	20	20	0.5
4	30	10	0.75
5	40	0	1

Tab. 1: preparazione e concentrazioni finali della BSA utilizzata per la retta di taratura

Una volta allestita la retta standard si prosegue con la preparazione dei campioni per i quali si vuole conoscere il quantitativo proteico:

- Preparare diverse diluizioni in acqua di campioni in un volume totale di 40 μ L, direttamente in cuvetta;
- preparare il blank trasferendo in una cuvetta 40 μ L di acqua;
- aggiungere a tutte le cuvette 1 mL di colorante Sigma-Aldrich Bradford Reagent;
- tappare le cuvette con del parafilm e mescolare le soluzioni per inversione;
- effettuare le letture allo spettrofotometro a 595 nm.

2.9 SDS-PAGE

L'elettroforesi delle proteine viene effettuata in gel di agarosio o poliacrilammide (PAGE), con pori di una determinata grandezza. La separazione delle molecole dipende dal setaccio molecolare (dimensione e forma) e dalla mobilità elettroforetica (carica elettrica). La mobilità elettroforetica delle molecole più piccole risulterà maggiore rispetto a quella delle molecole di dimensioni superiori, dotate della stessa densità di carica. Il pH del gel è sufficientemente elevato (di solito circa 9) in modo che, quando viene applicata corrente, quasi tutte le proteine presentano carica negativa netta e si muovono verso l'anodo; le molecole

di dimensioni e carica analoghe si muovono come una banda attraverso il gel. In un tipo di elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) si usa il detergente sodio dodecil solfato (SDS) per denaturare le proteine. Le molecole anfifiliche come l' SDS interferiscono con le interazioni idrofobiche che di norma stabilizzano le proteine e in presenza di SDS queste ultime assumono un aspetto allungato, simile a un bastoncino; inoltre la gran parte di esse si lega a tale composto in un rapporto pari a circa 1.4 g di SDS per grammo di proteina. La considerevole carica negativa impartita dall' SDS maschera la carica intrinseca delle molecole proteiche con il risultato che le proteine trattate hanno forma e rapporti carica-massa simili. Perciò l' SDS-PAGE separa le proteine mediante la capacità di setaccio molecolare del gel, vale a dire in base alla massa molecolare.

Dal momento che l' SDS disgrega le interazioni non covalenti tra i polipeptidi, l' SDS-PAGE fornisce le masse molecolari delle subunità delle proteine composte da più unità. È possibile stabilire se le subunità sono unite tra loro da ponti disolfuro preparando campioni per l' SDS-PAGE in presenza o in assenza di un' agente riducente come il mercaptoetanolo, che rompe questi legami crociati (Voet, 2007).

2.10 WESTERN BLOT E IMMUNOBLOT

La tecnica dell' immunoblot prevede di marcare con anticorpi specifici una proteina in particolare tra tutte quelle separate mediante SDS-PAGE e trasferite su una apposita membrana mediante Western Blot.

Per eseguire l' immunoblot è necessario trasferire le proteine dal gel a un supporto di nitrocellulosa mediante elettroforesi (15V per 30 min). La membrana viene poi colorata con Rosso Ponceau, per 10 minuti in agitazione, al fine di visualizzare le bande proteiche. L' eccesso di colorante viene infine eliminato con ripetuti lavaggi in H₂O distillata. Una volta asciugata la membrana il protocollo da seguire è il seguente:

- la membrana di nitrocellulosa viene immersa per la saturazione in tampone PBS 1X a cui viene aggiunto il 5 % di latte parzialmente scremato. La saturazione viene protratta per 40 minuti in agitazione;
- incubazione over-night a 4°C con anticorpi primari anti YFP 1:2000, diluiti in PBS 1X;

- effettuare due lavaggi di 10 minuti ciascuno in lenta agitazione, con 0.1% Tween in PBS 1X;
- effettuare un ulteriore lavaggio solo in PBS 1X per altri 10 minuti, sempre in agitazione;
- incubare per 60 minuti in forte agitazione a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio, coniugato alla fosfatasi alcalina, diluito 1:5000 in latte 1% in PBS;
- effettuare due lavaggi di 10 minuti ciascuno e in lenta agitazione, con 0.1% Tween in PBS 1X;
- effettuare un ulteriore lavaggio solo in PBS 1X sempre per 10 minuti in agitazione;
- per sviluppare il blot si scioglie una compressa BCIP/NTB (Sigma) in 10 mL di acqua distillata. Versare la soluzione così ottenuta, fino alla completa immersione del blot;
- fermare la reazione con tre lavaggi di acqua distillata.

3. RISULTATI E COMMENTI

Il plasmide pG29Y, ottenuto attraverso i metodi di digestione, amplificazione e ligazione precedentemente descritti, può essere così rappresentato (Fig. 3):

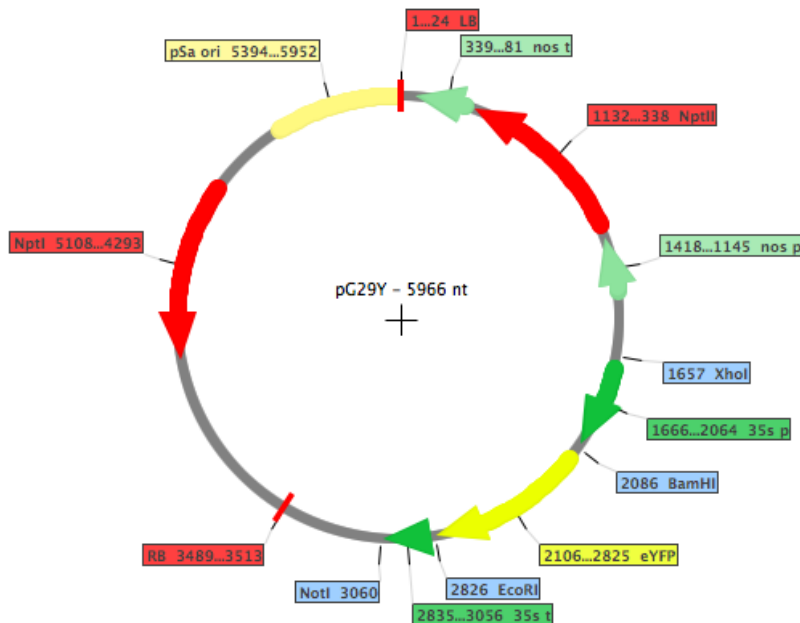


Fig 3: plasmide pG29Y con YFP a valle del promotore 35S

Si osservino le sequenze del promotore 35S e della YFP, poste all'interno della cassetta di policlونaggio; la rappresentazione grafica evidenzia inoltre come il gene della YFP sia stato posto a valle del promotore costitutivo 35S.

Per verificare l'effettiva correttezza del plasmide sono stati effettuati dei test mediante digestioni diagnostiche. I risultati delle digestioni del plasmide pG29Y sono riportate di seguito (Fig. 4).

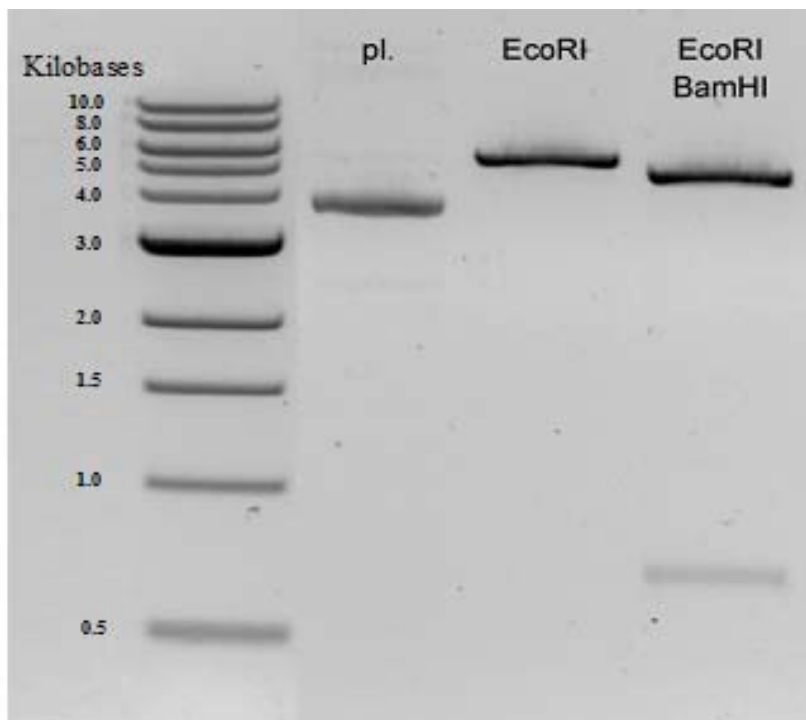


Fig. 4: digestione diagnostica di pG29Y

Nel primo pozzetto è stato caricato un marcatore di peso molecolare di DNA. Si tratta di una soluzione contenente molecole di DNA di diverse lunghezze note, grazie alla quale sarà possibile capire qual è la lunghezza del DNA ottenuto dalle digestioni.

Nel secondo pozzetto è stato caricato il DNA plasmidico (pl). Il plasmide, lungo circa 6000 bp, si posiziona in corrispondenza della banda da 4000 bp; questo fenomeno si osserva perché il plasmide in conformazione circolare superavvolta è in grado di muoversi meglio tra le maglie del gel rispetto a un frammento lineare delle stesse dimensioni.

Nel terzo pozzetto è stato caricato il DNA plasmidico digerito con EcoRI. Da questa digestione si è ottenuta la linearizzazione del plasmide. Il gel dimostra la buona riuscita di questa digestione con la banda relativa attorno alle 6000 bp.

Nel quarto pozzetto è stato caricato il prodotto ottenuto dalla doppia digestione con EcoRI e BamHI. Ciò che abbiamo ottenuto è il backbone del plasmide (banda poco sotto ai 5000 bp) e il gene della YFP isolato (banda attorno ai 800 bp).

Una volta appurato che il plasmide ottenuto era effettivamente il pG29Y si è effettuata l'agroinfiltrazione in foglia di *J. curcas*. Le aree agroinfiltrate sono evidenziate e delimitate dalle circonferenze di colore nero (Fig. 5).



Fig. 5: *J. curcas* agroinfiltrata; le zone agroinfiltrate sono delimitate ed evidenziate dalle circonferenze di colore nero

A tre giorni dall'agroinfiltrazione il tessuto fogliare è stato osservato al microscopio a fluorescenza. Le foto effettuate al microscopio a fluorescenza (Fig. 6) sono di difficile interpretazione a causa della presenza di un vacuolo molto sviluppato; tuttavia possiamo ipotizzare con buona approssimazione che la YFP, posta sotto il promotore costitutivo 35S, venga espressa a livello citosolico.

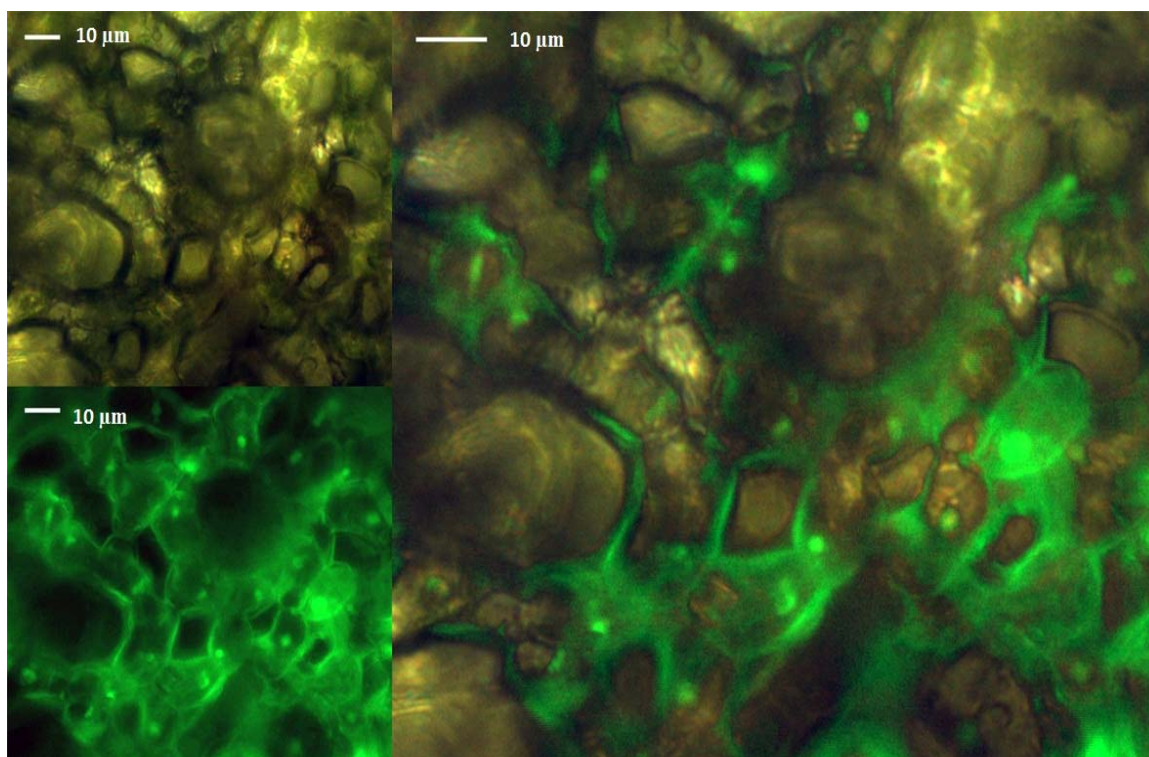


Fig 6: foglia di *J. curcas* agroinfiltrata al microscopio a fluorescenza

Il dosaggio lipidico, metodo elettivo per la quantificazione di trigliceridi, è stato effettuato su diverse tipologie di tessuto vegetale (Tab. 2):

Tipologia di tessuto	TAG (m/m)	Δ
seme wt	44.820%	$\pm 4.960\%$
endosperma wt	28.120%	$\pm 2.290\%$
cotiledoni wt	17.410%	$\pm 0.770\%$
disco fogliare wt	0.388%	$\pm 0.043\%$
disco fogliare trasformato	0.202%	$\pm 0.041\%$

Tab. 2: risultati dei dosaggi lipidici effettuati su diversi tessuti

Si osservi l'elevato contenuto lipidico, apprezzabile già nella pianta wt, in particolare a livello del seme e dell'endosperma. Ciò testimonia le potenzialità di *J. curcas* come fonte di energia alternativa, potenzialità che possono essere ulteriormente aumentate grazie all'ingegneria genetica.

Infine è da annotare che il dosaggio lipidico effettuato su semi, endosperma e cotiledoni risulta più affidabile rispetto ai dosaggi su foglia: la principale

difficoltà in quest'ultimo caso consiste nella presenza di clorofilla, il cui spettro di assorbimento è parzialmente sovrapposto allo spettro di assorbimento misurato durante la quantificazione lipidica.

Alle analisi sull'espressione lipidica hanno fatto seguito le analisi sul contenuto proteico, sia da un punto di vista quantitativo che da un punto di vista qualitativo. La quantificazione proteica necessita dell'allestimento di una retta standard: i punti della retta (Tab. 3) sono stati ottenuti leggendo allo spettrofotometro l'assorbanza delle varie diluizioni di standard proteico, con lunghezza d'onda del raggio incidente impostata a 595 nm.

[BSA] (mg/mL)	A
0.000	0.000
0.100	0.077
0.250	0.166
0.500	0.405
0.750	0.603
1.000	0.770

Tab. 3: punti della retta standard

I punti così ottenuti vengono utilizzati per allestire una retta di regressione lineare. In Fig. 7 viene mostrata la retta media ottenuta da tre letture indipendenti.

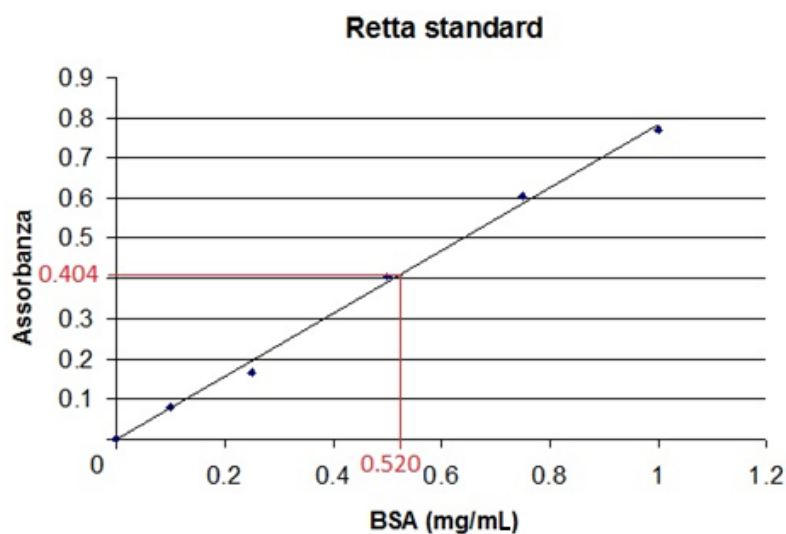


Fig. 7: retta di regressione lineare per la quantificazione proteica

L'assorbanza del campione di foglia agroinfiltrata con pG29Y misurata allo spettrofotometro viene ora interpolata con la retta di regressione (Fig. 7), ottenendo la stima del contenuto proteico (Tab. 4):

A del campione di foglia agroinfiltrata con pG29Y	Stima del contenuto proteico mg/mL
0.404	$2 \times 0.519718 = 1.039436$

Tab. 4: stima del contenuto proteico mg/ml in foglia agroinfiltrata con pG29Y

Il dato ottenuto dall'interpolazione va moltiplicato per 2: il campione di foglia è stato diluito in acqua (20 μ L di campione e 20 μ L d'acqua) per evitare che lo spettrofotometro rilevasse un valore di assorbanza fuori scala.

Dal punto di vista qualitativo non è stato possibile rilevare la YFP tramite immunoblot per problemi legati all'efficienza dell'agroinfiltrazione e alla necessaria ottimizzazione della metodica di laboratorio.

I risultati ottenuti in laboratorio possono essere riassunti sottolineando l'ottenimento del plasmide pG29Y, l'effettiva espressione transiente di YFP nella foglia di *J. curcas* e la quantificazione del contenuto lipidico in diversi tessuti della stessa pianta.

Rimangono alcuni problemi da risolvere: la precisa localizzazione della proteina YFP e la quantificazione dei trigliceridi nelle foglie di pianta trasformate. Nel primo caso sarà opportuno modificare le modalità di osservazione al microscopio a fluorescenza. La foglia è composta da più strati di cellule che emettono fluorescenza su piani diversi rendendo difficile l'osservazione; una soluzione potrebbe essere la produzione di protoplasti da mesofillo di foglie agroinfiltrate. La possibilità di avere cellule singole e la mancanza di parete dovrebbe permettere una più precisa localizzazione del segnale senza l'interferenza data da emissioni aspecifiche o dal rumore di fondo. Per la quantificazione lipidica sarà necessario mettere a punto la metodica tenendo conto della presenza di clorofilla o usare un metodo alternativo per la determinazione dei trigliceridi.

4. BIBLIOGRAFIA

Brown A (2007). *Bioteconologie molecolari principi e tecniche*. Edizioni Zanichelli, Cap 9.

Conkey JH, Feirer RP (1988). Determination of triglycerides in plant tissues. *Ipc Technical paper series*, 316: 1 – 5.

King AJ, He W, Cuevas JA, Freudenberger M, Ramiaramananana D, Graham IA (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2897 – 2905.

Mazumdar P, Basu A, Paul A, Mahanta C, Sahoo L (2010). Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of the novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. *South African Journal of Botany*, 76: 337 – 344.

Openshaw K (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass & Bioenergy*, 19: 1 – 15.

Slocombe SP, Cornah J, Pinfield-Wells H, Soady K, Zhang QY, Gilday A, Dyer JM, Graham IA (2009). Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 694 – 703.

Voet D, Voet J, Pratt C (2007). *Fondamenti di biochimica*. Edizioni Zanichelli, Cap 5.

altre fonti:

www.pgreen.ac.uk