

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



Espressione della proteina P32 del virus LSDV per testare anticorpi monoclonali, sieri di animali infetti e valutare le proprietà antigeniche ed immunologiche della proteina

Relatore: Prof.ssa Elisabetta Bergantino
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Correlatore: Dr.ssa Giulia Pezzoni
Istituto ZooProfilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna-Reparto Virus Vescicolari e Produzioni Biotecnologiche

Controrelatore: Prof.ssa Laura Cendron
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Laureanda: Martina Sudetti

Anno Accademico 2022/2023

*The movement you need
is on your shoulder*

Sommario	
Riassunto.....	6
Introduzione	8
Lumpy Skin Disease.....	8
1. Patologia clinica	8
2. Epidemiologia	10
Lumpy Skin Disease Virus.....	11
1. Generalità	11
2. Replicazione	14
3. Trasmissione virale.....	16
Risposta immunitaria.....	17
1. Risposta cellulo-mediata	17
2. Risposta umorale	18
Prevenzione e controllo	21
Materiali e metodi	24
1. Studio della proteina e dei frammenti proteici da esprimere	24
2. Clonaggio	29
a. Clonaggio con metodo Golden Gate	29
b. Clonaggio con metodo Gibson.....	30
c. Clonaggio con enzimi di restrizione.....	32
3. Amplificazione	33
a. Amplificazione del DNA plasmidico e virale per il Clonaggio Golden Gate.....	34
b. Amplificazione del DNA plasmidico e virale per il Clonaggio Gibson.....	35
c. Amplificazione dei frammenti per il Clonaggio con enzimi di restrizione.....	39
4. Purificazione da gel di agarosio	40
5. Quantificazione del DNA.....	41
6. Clonaggio Golden Gate.....	41
7. Clonaggio Gibson plasmide-inserito	42
8. Clonaggio con enzimi di restrizione	43
a. Digestione dei frammenti e del plasmide	43
b. Ligazione dei frammenti e del plasmide	44
9. Trasformazione dei batteri	45
10. Colony PCR.....	46

11.	Miniprep e midiprep	51
12.	Sequenziamento.....	52
13.	Preparazione dei glicerinati batterici.....	54
14.	Espressione delle proteine	54
a.	Trasformazione dei batteri BL21 (DE3)	54
b.	Time Course di espressione.....	55
c.	Estrazione delle proteine dai batteri	56
15.	SDS-PAGE.....	56
16.	Purificazione delle proteine.....	58
17.	Quantificazione con metodo BCA	60
18.	Western Blot.....	61
19.	Collezione di sieri.....	62
20.	Antigene virale	65
21.	Pannello di anticorpi monoclonali.....	66
22.	Saggi ELISA.....	67
a.	Saggio ELISA Trapping indiretta ed ELISA indiretta con i sieri	68
b.	Saggio ELISA indiretta con gli AcM.....	69
	Ricette.....	69
1.	Terreno LB Luria-Bertani per la crescita di batteri.....	69
2.	Preparazione dell'antibiotico ampicillina.....	70
3.	Preparazione dell'IPTG	70
4.	Preparazione delle piastre di crescita	70
5.	Lysis Buffer.....	70
6.	Buffer B Urea 8M.....	71
7.	PBS (1X) + Tween (0.02%)	71
8.	Gel agarosio 1/2% e TBE 1X (Tris Borato di EDTA)	72
9.	MOPS SDS Running Buffer 1X.....	72
	Risultati.....	72
1.	Studio della proteina P32/frammenti proteici da esprimere.....	72
a.	Visualizzazione 3D.....	72
2.	Clonaggio dei geni di interesse	73
3.	Espressione della proteina e dei frammenti proteici di LSDV.....	75
4.	Purificazione della proteina P32/frammenti proteici ricombinanti di LSDV.....	76

5. Western Blotting della proteina P32/frammenti proteici ricombinanti di LSDV.....	77
a. Western Blotting con anticorpo anti-istidine.....	77
b. Western Blotting con gli AcM da testare	78
c. Western Blotting con sieri	81
6. Saggi ELISA	81
a. Saggi ELISA indiretta con i sieri	81
b. Saggi ELISA indiretta con AcM	82
c. Saggi ELISA sierologici tipo Trapping con P32 con i sieri	82
7. Studio di antigenicità e idrofobicità della proteina	83
Discussione e Conclusioni	86
Bibliografia	88
Indice figure	92
Indice tabelle	95
Ringraziamenti	98

Riassunto

La Lumpy Skin Disease (LSD) è una malattia virale bovina emergente che colpisce i bovini; è inclusa nella lista delle malattie notificabili dall'organizzazione mondiale della sanità animale (WOAH - World Organization of Animal Health) per la sua rapida diffusione, il carattere transfrontaliero e la sua importanza dal punto di vista economico e zootecnico.

Il virus della LSD (LSDV) è un virus a doppio filamento lineare di DNA, lungo circa 150 kbp, appartenente al genere Capripoxvirus della famiglia delle Poxviridae. Il LSDV presenta un virione a forma di mattone o ovoidale, lungo 220-450 nm e largo 140-260 nm. Esistono in particolare due tipologie di particelle virali: i virus maturi intracellulari (IMV) dotati di un singolo rivestimento lipidico esterno e i virus extracellulari (EEV) dotati invece di una doppia membrana. Il genoma di LSDV contiene più di 156 regioni codificanti: 41 di esse codificano per proteine strutturali, che molto spesso rappresentano il target della risposta immunitaria dell'ospite, e le restanti codificano per proteine non strutturali coinvolte invece in processi di replicazione ed interazione con la cellula bersaglio.

La conoscenza delle proprietà antigeniche delle proteine che costituiscono il virione è fondamentale per favorire lo sviluppo di test sierologici per il controllo della malattia.

La proteina strutturale P32 dell'envelope virale, codificata nel genoma di LSDV dal gene ortologo ORF074, è considerata tra quelle maggiormente immunogene nella famiglia delle *Poxviridae*.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'immunogenicità e le proprietà antigeniche della proteina strutturale P32 di LSDV attraverso l'uso di un pannello di 14 anticorpi monoclonali (AcM), prodotti e caratterizzati verso LSDV, e con sieri bovini ottenuti da un'infezione sperimentale.

Lo studio ha previsto l'espressione in *E. Coli* della porzione extra-virione della proteina P32 e di alcune sue sub-unità.

Gli AcM riconoscono almeno quattro diversi domini della P32 virale; tutti hanno riconosciuto la porzione extra-virione della P32 ricombinante in Western Blotting (WB) ed in ELISA indiretta, ma non hanno riconosciuto nessuna delle sue sub-unità, ad eccezione dell'AcM 2C10, che ha reagito in WB, ed il cui epitopo è riprodotto efficientemente dal sub-frammento compreso nel range 118-276aa. Probabilmente gli epitopi riconosciuti dagli altri AcM sono parzialmente lineari, oppure nascosti e sono riprodotti e accessibili solo sull'intera porzione extra-virione della P32.

I sieri sperimentali, testati in ELISA indiretta verso la proteina ricombinante, mostrano siero-conversione a 14 giorni post infezione coerentemente con i risultati ottenuti in ELISA con l'antigene virale e l'insorgenza della risposta immunitaria post-infezione, confermandone l'immunogenicità. Anche tutte le sub-porzioni della proteina P32 vengono riconosciute in WB da un pool di sieri positivi.

Dallo studio effettuato, risulta che la proteina ricombinante P32 ha riprodotto le caratteristiche antigeniche della proteina virale nativa, e può essere un candidato ideale per sostituire il virus nello sviluppo di saggi sierologici.

Inoltre, questa tipologia di studio potrebbe dare informazioni utili per lo sviluppo di futuri vaccini biotecnologici.

Introduzione

Lumpy Skin Disease

La *Lumpy Skin Disease* (LSD), o malattia nodulare della pelle, è una malattia infettiva che colpisce prevalentemente bovini e bufali d'acqua domestici, nonostante ci siano delle segnalazioni in altre specie di ruminanti selvatici come giraffe, tori e cammelli. L'agente eziologico della malattia è un virus appartenente ai Capripoxvirus della famiglia Poxviridae, genere che comprende, oltre a LSDV, anche altre due specie virali quali Sheeppox Virus e Goatpox Virus, rispettivamente il vaiolo delle pecore e delle capre [1]. LSDV viene trasmesso principalmente tramite artropodi ematofagi, mentre la trasmissione per contatto diretto o prodotto animale è considerata trascurabile, ma non improbabile [2].

La LSD è una malattia virale emergente, endemica nella maggior parte dei Paesi africani, che per molto tempo è rimasta isolata nel solo continente Africano. Nel 2012 sono stati registrati i primi casi di LSD in Paesi del Medio Oriente come Turchia, Iran e Giordania e dal 2015 sono stati individuati focolai di LSD anche nel territorio europeo, in Grecia e nei Balcani. La recente diffusione della LSD nelle regioni attualmente indenni indica l'importanza nel comprendere sia i limiti che le possibili vie di distribuzione della patologia. È inserita dall'WOAH (World Organization of Animal Health) nella lista delle malattie da notificare per il suo elevato impatto socioeconomico e zootecnico e la sua rapida diffusione in regioni *disease-free*. L'impatto economico della LSD è devastante a causa dell'elevato tasso di morbilità: la malattia porta ad una seria diminuzione di latte prodotto (la stima si aggira attorno al 10 fino all'85%), a causa di febbre alta e mastite. Altre conseguenze includono il decremento della crescita nei bovini da carne, l'infertilità temporanea o permanente, aborti ed elevati costi legati alla vaccinazione. L'insieme di questi fattori può portare a massicce perdite finanziarie nell'industria della carne, del latte ed a tutte quelle associate al bestiame ed ai suoi sottoprodotti [3] [1].

La distribuzione dei Capripoxvirus sembra essere in espansione a causa del limitato accesso a vaccini efficaci nei Paesi del terzo mondo ed alla povertà all'interno delle comunità agricole. Questo quadro è una delle conseguenze dirette della pandemia da Covid-19 che ha avuto effetti negativi a livello economico, oltre che dell'aumento di commercio, sia legale che no, di animali vivi, di prodotti di origine animale ed al cambiamento climatico [1].

1. Patologia clinica

Le caratteristiche cliniche della malattia comprendono:

- Febbre (40°C - 41.5°C)
- Secrezioni nasale
- Lacrimazione
- Ipsalivazione
- Ingrossamento dei linfonodi

- Mancanza di appetito
- Notevole riduzione della produzione di latte
- Diminuzione del peso corporeo
- Morte [3].

Inoltre, la malattia porta spesso alla comparsa di noduli cutanei che risultano compatti e leggermente in rilievo, con un diametro compreso tra i 2 ed i 7 cm (Fig. 1). La maggior concentrazione di noduli, che si manifestano poco dopo l'inizio della febbre, si ritrova in prossimità di collo, gambe, coda e schiena. Tramite autopsia i noduli sono stati osservati anche a livello del tratto gastrointestinale e dei polmoni, ed allo stesso modo potrebbero essere colpiti altri tessuti come l'interno delle labbra, trachea, laringe, mammella, capezzoli, utero, vagina e testicoli [4]. Il numero di ferite cutanee varia da animale ad animale, andando da lievi a noduli multipli che coprono l'intero corpo di animali infetti gravemente. È stata osservata inoltre la comparsa di lesioni ulcerative nella cornea di entrambi o di un solo occhio che possono portare a visione limitata o, in alcuni casi estremi, alla cecità [5].

Il periodo di incubazione della malattia in condizioni naturali è compreso tra le 2 e le 5 settimane, ma in condizioni sperimentali varia da 7 a 14 giorni. L'LSD assume tre forme: acuta, subacuta e cronica. La malattia inizia solitamente con febbre bifasica che può durare fino a dieci giorni e talvolta essere associata a lacrimazione, mancanza di latte, anoressia e secrezioni salivari. Le manifestazioni cliniche, in caso di forma lieve di infezione, compaiono sottoforma di uno o due grumi di noduli entro 2-3 giorni dall'insorgenza della febbre. Successivamente le lesioni cutanee si diffondono verso testa, collo, arti, genitali, cavità nasali e orali e nel sito di inoculazione. Dopo 1-2 giorni i noduli si rompono dando origine a ferite dolorose e facilmente infettabili [6].

Dopo 2-3 settimane dall'infezione primaria le lesioni dei noduli diventano ulcerose e necrotiche. Dopo un mese, l'animale infetto è completamente guarito dalle ulcerazioni fino a tornare ad avere uno spessore ed una pigmentazione cutanea nella norma.

Il trattamento degli animali infetti da LSD varia molto da caso a caso, ma solitamente è necessario disinfettare con cura le lesioni manifestate a livello cutaneo e gli strumenti riutilizzabili nei locali, oltre che adottare l'uso di sulfanilamide per trattare le infezioni batteriche secondarie. Fondamentale è l'uso di dispositivi di sicurezza individuali da parte dei veterinari che visitano l'ambiente e manipolano gli animali infetti. Una terapia efficace ad oggi ancora non si conosce: sono stati utilizzati antibiotici (Enrofloxacin) per prevenire infezioni microbiche secondarie ed antiinfiammatori (Meloxicam) in caso di sintomi. Molto frequente è l'uso di vitamina AD3E, utile a supportare la capacità di alimentazione e il mantenimento produttivo [4] [6].



Figura 1: (a, g) Bovini che presentano segni clinici di Lumpy Skin Disease in India. (a, b, e, f) Presenza di noduli cutanei in tutto il corpo di una vacca indiana indigena. (c) Lesioni cutanee di un toro. (d) Opacità della cornea. (g) Grandi e gonfi noduli cutanei

2. Epidemiologia

Il virus della *Lumpy Skin Disease* è stato diagnosticato per la prima volta in Zambia nel 1929 e poi segnalato in diverse regioni di Paesi africani, ad eccezione di Libia, Algeria, Marocco e Tunisia, che rimangono gli unici Paesi africani *disease-free*. La prima epidemia di LSD in Egitto fu segnalata nel 1988 e l'anno seguente in Israele, il primo caso di LSD al di fuori del continente africano. Per molto tempo, infatti, la malattia era presente nel solo territorio africano, per poi iniziare a diffondersi in altre direzioni. Con la crescente domanda di cibo, i Paesi del Medio Oriente hanno aumentato il trasporto di animali verso i Paesi vicini, fattore che ha contribuito alla diffusione massiccia della patologia virale. La malattia, infatti, è stata identificata dal 2012 in Paesi quali Arabia Saudita, Turchia, Iran, Libano, Giordania, Iraq e Israele [1] (Fig. 2). In Turchia, per esempio, sono stati riconosciuti in modo ufficiale 236 focolai tra agosto 2013 e luglio 2014, tutti riconducibili a cause quali scarse misure sanitarie e controlli, che hanno favorito l'entrata del virus dalla Siria ed Iraq alla Turchia. Dal 2015 il virus si è diffuso in Russia, Azerbaijan, Armenia, Albania, Kosovo, Serbia e Montenegro. Nello stesso anno la malattia della *Lumpy Skin* ha raggiunto anche il territorio europeo: sono stati infatti segnalati più di 100 focolai nelle province greche della Macedonia Orientale e Tracia, della Macedonia centrale e di Voreio Aigaio, vicino al confine con la Turchia, oltre che in Bulgaria. Entro il 2022, la malattia della Lumpy Skin si è diffusa a nord e ad est della Mongolia e della Siberia orientale [7] [8].

Secondo il rapporto WOAHA, l'LSD è riemersa in Israele dopo sei anni nel 2019 a causa della diminuzione della vaccinazione preventiva animale, che precedentemente era obbligatoria. Inoltre, sono stati segnalati ulteriori focolai in Israele nel maggio del 2023. Nel 2019 sono stati riportati casi di LSD in Cina,

Bangladesh ed India [9]. Visto il suo elevato tasso di diffusione, il virus LSDV dovrebbe essere considerato ad elevato rischio nel resto dell'Europa e dell'Asia [7]. Nel 2020 sono stati segnalati i primi casi di LSD in Bhutan, Nepal e Vietnam, mentre il virus ha raggiunto Taiwan nel 2021 [10], la Thailandia nel marzo dello stesso anno [11] e l'Indonesia nel 2022 [9]. È stato riportato come la diffusione della malattia nel sud-est asiatico sia stata più rapida rispetto che in Africa e nei paesi Mediorientali: il motivo potrebbe essere dato dall'elevata umidità e temperatura tipiche del clima tropicale che costituisce un ambiente favorevole per la riproduzione di artropodi [11].

Nonostante il tasso di morbilità possa raggiungere addirittura il 45%, quello di mortalità è molto più contenuto e si aggira attorno al 10%. Per esempio, in Grecia il tasso di morbilità è del 8.7% e quello di mortalità dello 0.4%, mentre in Turchia sono rispettivamente del 12.3% e 6.4%. È bene ricordare come la gravità della malattia sia spesso dipesa da fattori quali l'età, la razza dell'animale, lo stato immunitario ed eventuali complicazioni secondarie [1].

Tra i fattori di rischio che concorrono alla diffusione della LSD si ricordano climi umidi e caldi, condizioni che supportano particolarmente l'abbondanza della popolazione di vettori, così come le stagioni piovose e l'introduzione di nuovi animali nel gregge. La dimensione del gregge, la distanza dai laghi, la migrazione del gregge a lunga distanza, il trasporto di animali infetti in aree incontaminate e cibi/acque contaminate in comune sono considerati anch'essi fattori di rischio. È necessario adottare delle misure di controllo e prevenzione per cercare di controllare la diffusione della patologia presa in esame [1].

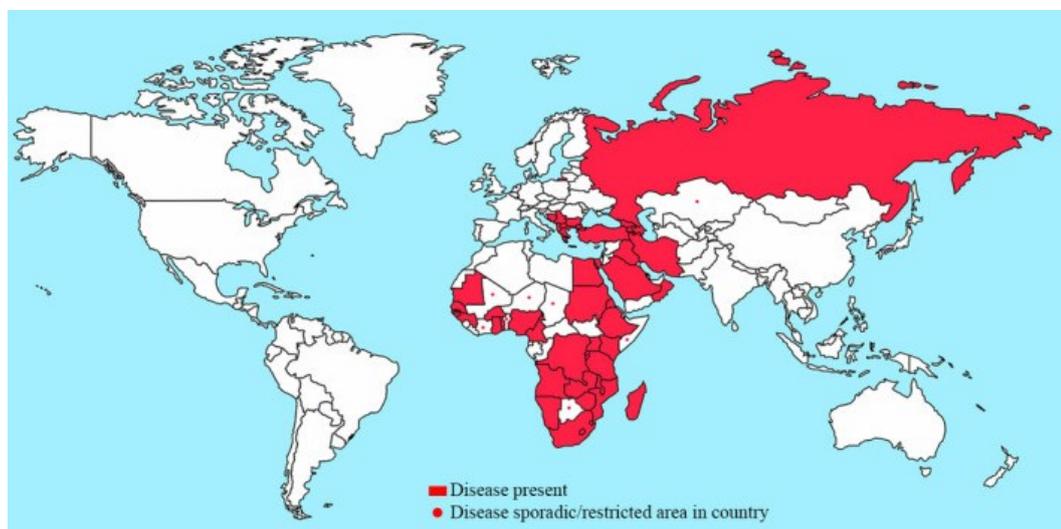


Figura 2: Situazione globale sulla diffusione della Lumpy Skin Disease. La patologia, inizialmente circoscritta al solo continente africano, ad oggi la si ritrova in diversi Paesi del Medio Oriente, oltre che in Russia ed in alcuni territori Europei

Lumpy Skin Disease Virus

1. Generalità

Il virus che causa la malattia della LSD appartiene alla famiglia Poxviridae che può essere suddivisa in due sottofamiglie: Chordopoxvirus, responsabile dell'infezione di vertebrati, ed Entomopoxvirus, che infetta gli ospiti invertebrati. In particolare, la sottofamiglia Chordopoxvirus comprende a sua volta 10 generi, tra cui i Capripoxvirus. Quest'ultimo genere raccoglie virus di tre specie: il vaiolo ovino Sheeppox virus (SPPV), il vaiolo caprino Goatpox virus (GTPV) e il *Lumpy Skin Disease* virus (LSDV) infettante i bovini [3]. Il vaiolo ovino (SP) e caprino (GP) sono malattie infettive endemiche comuni in Africa settentrionale e centrale, in Medio Oriente e nella maggior parte del continente asiatico. In India l'epidemia di SP è stata riscontrata per la prima volta a Bombay nel 1931-1932, mentre il primo focolaio di GP è stato identificato nel 1936. Nel continente africano l'Etiopia è il Paese in cui sono stati registrati 663 focolai di GP e SP tra il 2013 e il 2019, mentre in Nigeria Settentrionale il tasso di incidenza è del 53% nelle pecore e 50% nelle capre [12]. Tra tutti i Poxvirus, il modello di riferimento ed il maggiormente studiato è il Vaccinia Virus (VV), il cui ospite principale è l'uomo.

LSDV è un virus a doppio filamento lineare di DNA a forma di mattone/ovoidale lungo 220-450 nm e largo 140-260 nm. Il genoma di LSDV, comprendente 151 kbp, è costituito da una regione centrale codificante, che contiene circa 150 geni, fiancheggiata da sequenze terminali ripetute (ITR), identiche ed invertite, di 2.4 kbp. Le regioni ITR sono chiuse in modo covalente [13] (Fig. 3). I geni essenziali per la replicazione, struttura e assemblaggio del virus si trovano prevalentemente nella regione centrale (ORF da 024 a 123), mentre quelli responsabili di virulenza e gamma dell'ospite si ritrovano nelle regioni variabili terminali (ORF da 01 a 023 e da 124 a 156) [14].

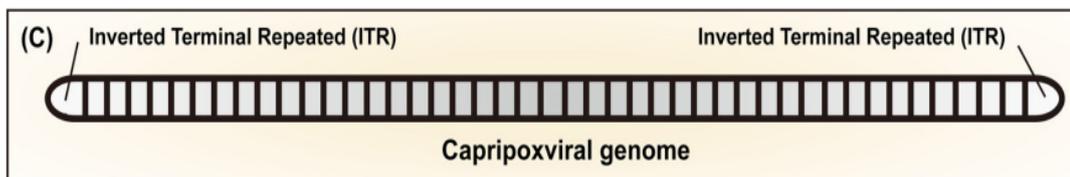


Figura 3: Immagine schematica del genoma di LSDV. LSDV, così come tutti i virus appartenenti al genere Capripoxvirus, è dotato di un doppio filamento lineare di DNA. La regione centrale del genoma contiene circa 150 geni fondamentali per replicazione ed assemblaggio virale. Le regioni fiancheggianti invertite e ripetute contengono geni importanti per la virulenza

Dal confronto con il resto dei Chordopoxvirus emerge che LSDV è dotato di 146 geni conservati codificanti per proteine aventi un ruolo nella replicazione del DNA, trascrizione e sintesi di mRNA, metabolismo nucleotidico, struttura del virione, assemblaggio delle proteine, evasione della risposta immunitaria ed interazione con l'ospite [15]. La morfologia, la struttura, la biochimica e l'antigenicità dei Poxvirus dei mammiferi, in ciascun genere, sono simili tra loro [15]. Inoltre, il genoma virale di LSDV condivide il 97% di identità nelle sequenze nucleotidiche con il genoma di SPPV e GTPV, virus appartenenti al genere Capripox [3].

Il virus, che si replica nel citoplasma della cellula ospite, è stabile a temperatura ambiente per molto tempo. In particolare, lo si può ritrovare a livello delle croste essiccate fino a 35 giorni, persiste fino a 33 giorni nei noduli necrotici e almeno 18 nelle pelli essiccate all'aria. Nonostante la luce solare, così come i detergenti lipidici,

abbiano la capacità di distruggere rapidamente il virus, esso può persistere per mesi in ambiente bui come le stalle. Addirittura, LSDV è così stabile da poter essere recuperato dopo anni a partire da noduli cutanei conservati a -80°C . L'inattivazione virale può essere portata avanti avvalendosi dell'utilizzo di temperature alte, come 55°C per 2h e 65°C per 30 minuti, e pH fortemente acidi: per esempio, il virus può essere inattivato con l'etere (20%), fenolo (2%) per 15 minuti, ma è sensibile ad altri detergenti quali la formalina (1%) ed i Sali quaternari di ammonio (0.5%) [1] [3]. Non esistono invece studi che indichino la perdita di infettività di LSDV nei diversi ambienti [16].

Le cellule infettate da Capripoxvirus producono due tipi di virioni antigenicamente distinti: virioni maturi (MV) e virioni con *envelope* (EV) (Fig. 4). Dal momento in cui il Poxvirus maggiormente studiato è il Vaccinia Virus, si descrivono in seguito il ciclo di vita e l'interazione virale con la cellula ospite a partire da questo modello. I virioni maturi si trovano esclusivamente all'interno del citoplasma della cellula ospite, vengono liberati in seguito alla lisi cellulare e sono dotati di una sola membrana esterna lipidica. I virioni *envelope* non sono altro che dei virus avvolti da una doppia membrana liberati tramite esocitosi durante la quale la membrana esterna virale si è fusa con quella della cellula ospite [13] [17]. Il core virale avvolto dalla/e membrana/e è costituito da proteine strutturali virali e contiene il doppio filamento di DNA compatto e gli enzimi necessari ad avviare la replicazione [18]. Inoltre, entrambi i virioni contengono due corpi laterali ricchi di proteine che sembrano essere importanti nel rendere l'ambiente intracellulare ottimale [19]. È importante ricordare come i virioni maturi siano più stabili rispetto a quelli *envelope*: si pensa infatti che il loro ruolo principale abbia a che fare con la trasmissione tra le cellule ospite [13] [17].

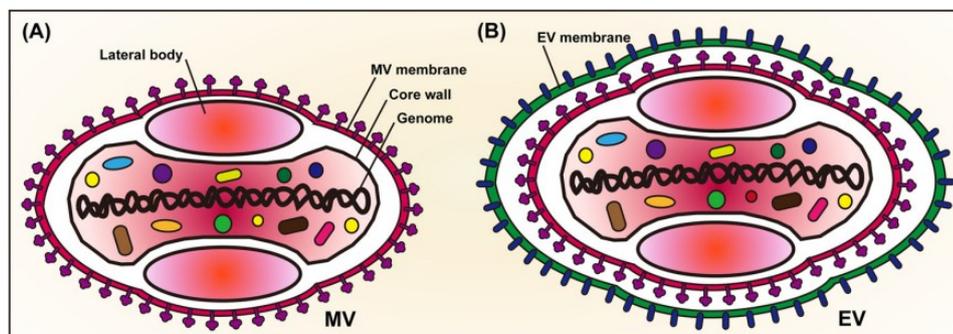


Figura 4: Immagine schematica dei due virioni di LSDV. A sinistra IMV, il virione maturo intracellulare dotato di una sola membrana esterna e liberato tramite lisi cellulare. A destra EV, il virione envelope extracellulare dotato di una doppia membrana esterna e liberato tramite esocitosi

IMV ed EEV interagiscono con recettori diversi della cellula ospite, coerentemente con le proteine differenti espresse sulla loro superficie. È stata dimostrata la capacità delle proteine di superficie A27L ed H3L di IMV (di VV) di legare l'eparan solfato e di D8L di interagire con il condroitin solfato [20]. Lo studio dell'ingresso di EV è complesso a causa della scarsa quantità di EEV prodotta dalla maggioranza dei ceppi di Vaccinia Virus: ci sono solo prove indirette che dimostrano l'interazione delle proteine di membrana (A33R, A34R, A56R e B5R) con l'ospite [18].

2. Replicazione

Come riportato precedentemente, due sono i virioni di LSDV: il virione maturo intracellulare (IMV) ed il virione envelope extracellulare (EEV). Di seguito si descrive il ciclo di replicazione di Vaccinia Virus, prototipo e virus maggiormente studiato dei Poxvirus.

La replicazione inizia con il contatto tra i virioni di VV e la cellula ospite. Dopo il legame di IMV con GAG sono state segnalate due diverse opzioni di ingresso: la fusione della membrana virale con quella plasmatica o l'endocitosi dell'IMV, seguita dalla successiva fusione del virus con la membrana vescicolare per la liberazione del core virale. Il percorso di entrata dipende dal tipo di cellula ospite e dal tipo di ceppo virale [18]. La fusione di membrana è mediata dal complesso di fusione di ingresso (EFC) costituito da nove proteine [21]. Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che, dopo il legame con la superficie dell'ospite, la membrana esterna di EEV viene interrotta all'esterno della cellula: in questo modo la membrana esposta di IMV può fondersi con quella plasmatica garantendo l'ingresso del core virale nel citoplasma [18] (Fig. 5).

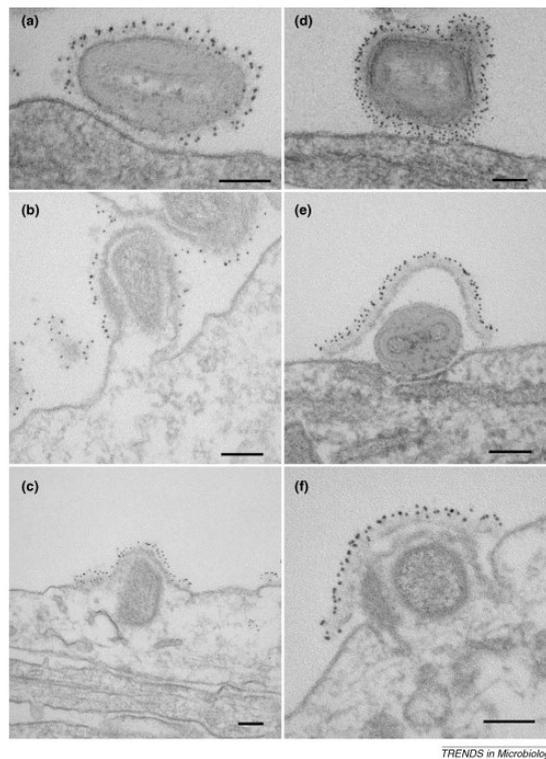


Figura 5: Descrizione del processo di fusione di IMV ed EEV di Vaccinia Virus. (a-c) Micrografie elettroniche che descrivono l'ingresso di IMV tramite fusione con la membrana plasmatica dell'ospite. (a) Particelle di IMV legate alla cellula bersaglio tramite l'interazione delle proteine virali di superficie con GAG. (b) Fusione della membrana di IMV con quella plasmatica. (c) Rilascio del core virale nel citoplasma. (d-f) Micrografie elettroniche che descrivono l'ingresso di EEV. (d) Particelle di EEV legate alla cellula bersaglio. (e) Interruzione della membrana esterna di EEV che consente il contatto di IMV con l'ospite. (f) Fusione della membrana IMV e rilascio del core virale nel citoplasma

All'ingresso dei virioni i corpi laterali si “smontano” contrariamente al core virale che, trasportato sui microtubi verso la profondità della cellula, raggiunge una posizione perinucleare in cui verranno formate in seguito le “fabbriche virali”, domini citoplasmatici che corrispondono ai siti di assemblaggio virale e replicazione del DNA [19] [21]. Il core virale rimane integro nella fase iniziale dell'infezione e rappresenta un sito di trascrizione, capping e poliadenilazione dei primi mRNA. La parete del core è semipermeabile per garantire l'entrata di ribonucleotidi trifosfati (rNTP) e l'uscita dei messaggeri nascenti [19]. Gli mRNA così prodotti si raggruppano nel citoplasma in cui sono tradotti nelle proteine necessarie per l'uncoating (come la proteina D5), il rilascio del DNA virale e per la sua replicazione [19] [20]. Successivamente alla dissoluzione del core virale il genoma viene depositato nel citoplasma per poi associarsi immediatamente alle membrane del reticolo endoplasmatico ed alle proteine virali prodotte in precedenza [19] (Fig. 6). La replicazione del DNA può ora verificarsi nelle fabbriche di replicazione (o paddock) [19].

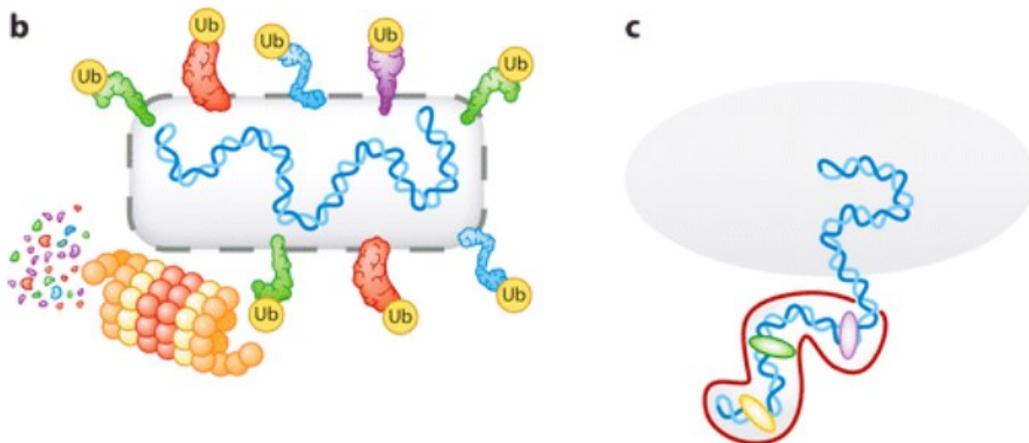


Figura 6: (b) Le proteine presenti sulla parete del core virali vengono ubiquitinate e degradate dal proteasoma. (c) Il genoma virale, rilasciato nel citoplasma, si associa rapidamente alle membrane del reticolo endoplasmatico ed alle proteine virali

Le prime strutture visibili, composte da lipidi e proteine virali, sono a forma di mezzaluna e costituite da due strati distinti: uno liscio interno ed uno esterno costituito da trimeri della proteina D13 [21]. Le mezzelune crescono fino al virione immaturo IV ovale/sferico, contenente i componenti del core virale ed il genoma a doppio filamento incapsulato grazie al contributo di alcune proteine virali come A32 ed A13 [18]. La maturazione di IV in IMV richiede la scissione proteolitica di alcune proteine del capsido e la condensazione del core [21] [22].

Come ricordato in precedenza, la maggior parte di IMV viene rilasciata mediante lisi cellulare, ma una frazione viene trasportata verso i siti di avvolgimento per la produzione degli EV [18] [22]. In particolare, vengono trasportati lontano dalla fabbrica virale verso siti per essere avvolti da una doppia membrana cellulare, derivata da endosomi o dal Trans Golgi Network (TGN), al fine di formare i virus envelope intracellulari (IEV). IEV vengono trasportati sui microtubuli verso la

periferia cellulare in cui la membrana esterna si fonde con quella plasmatica esponendo la particella virale sulla superficie. Si distinguono ora due tipi di EV: CEV, la particella virale che rimane in contatto con la cellula ospite, che controllando la polimerizzazione di actina può essere guidata verso una cellula non infetta vicina all'ospite, e EEV, particella virale che viene rilasciata ed allontanata per favorire la diffusione a lungo raggio [22] [18] (Fig. 7). Oltre ad essere importanti per la diffusione virale, CEV ed EEV eludono il sistema immunitario dell'ospite a causa della presenza di una doppia membrana [18].

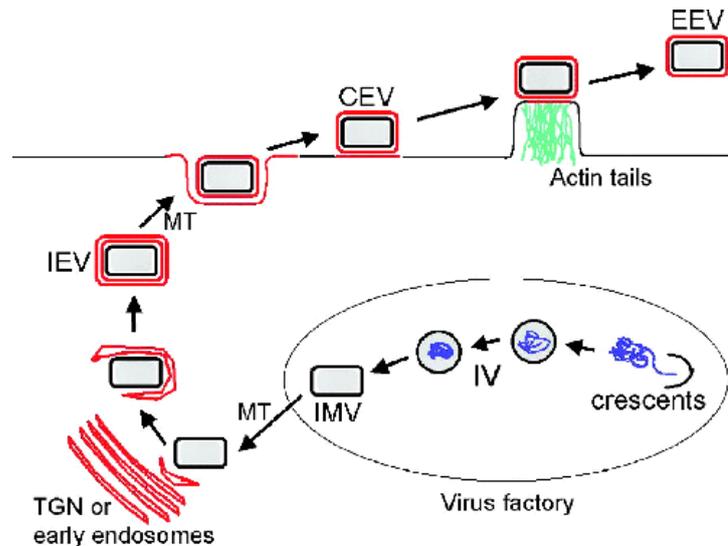


Figura 7: Ciclo di vita di *Vaccinia Virus*, modello per la famiglia *Poxviridae*. Nel citoplasma della cellula ospite il genoma virale si replica al fine di ottenere virioni immaturi intracellulari che, processati, diventano maturi. Buona parte di IMV viene rilasciata dall'ospite tramite lisi, mentre una piccola frazione viene processata al fine di ottenere virioni intracellulari envelope (IEV). Questi, correttamente fusi con la membrana plasmatica, vengono a loro volta distinti in: CEV, virioni che rimangono adesi alla membrana cellulare, e EEV, virioni rilasciati per la diffusione a lungo raggio

3. Trasmissione virale

Il virus della *Lumpy Skin Disease* viene principalmente trasmesso in modo indiretto tramite artropodi, in particolare gli insetti succhiatori di sangue, ma si possono ricordare anche la via di trasmissione tramite cibo ed acque contaminate o, negli stadi più avanzati, la trasmissione diretta per contatto con saliva, sperma, sangue, lesioni della pelle e secrezioni nasali infette. In generale, è stato dimostrato che il contatto diretto è una via inefficace di trasmissione per LSDV dal momento in cui non è stata rilevata una correlazione positiva tra la densità del bestiame ed il tasso di infezione. Tuttavia, le prove sperimentali a riguardo sono ancora scarse. È interessante però notare come il contatto diretto con goccioline ed aerosol contaminati sia un'importante via di diffusione dei virus del genere *Capripoxvirus*, ad esclusione del virus della *Lumpy Skin Disease* [1] [23].

I vettori di trasmissione primari sono gli artropodi; infatti, è stata dimostrata una correlazione positiva tra il tasso di infezione da LSDV e le stagioni con temperature alte, ottimali per l'attività degli insetti, contrariamente alle stagioni secche o fredde [1]. Il virus, insieme ad antigeni virali, è stato ritrovato nella saliva ed in diversi organi di zecche come *Rhipicephalus* and *Amblyomma* species: il loro ruolo nella trasmissione è stato dimostrato dal punto di vista molecolare. È stato invece riportato come *Aedes aegypti* sia l'unica zanzara in grado di trasmettere il virus al bestiame suscettibile, allo stesso modo di ditteri come *Culicoides nubeculosus*, *Culex quinquefasciatus* Say e *Anopheles stephensi* Liston. Inoltre, il virus è stato ritrovato anche in *Culicoides punctatus* che potrebbe quindi giocare un ruolo chiave nella trasmissione. Il vettore considerato modello nella trasmissione del LSDV è la mosca *Stomoxys calcitrans* [1] [23] [16].

La maggior parte degli insetti emofili può volare fino ad un massimo di 100 m, se non assistiti dai movimenti dell'aria: ecco che la direzione e la forza dei venti potrebbero contribuire alla diffusione del virus facendo volare gli insetti su lunghe distanze [1]. Per esempio, *S. Calcitrans*, un artropode succhiasangue, può viaggiare fino a 255 km con il vento [11].

Un requisito importante affinché un artropode funga da vettore è la sua presenza in numero elevato in un focolaio: per esempio, un numero molto alto di zanzare era stato rilevato nelle zone umide della regione della Tracia, in cui sono stati identificati i primi focolai europei nel 2015. Quanto una trasmissione virale sia efficace dipende anche dal tempo in cui il virus permane sulla superficie dell'apparato boccale, delle ghiandole salivari e nelle lesioni cutanee che sono una fonte attrattiva di nutrienti per le mosche. Inoltre, il virus è presente anche in regioni cutanee apparentemente sane di bovini infetti [1].

Risposta immunitaria

Il prototipo dei Poxvirus è il Vaccinia virus, virus del vaiolo che è stato ampiamente studiato e che ha fornito fondamentali informazioni riguardo la replicazione virale e l'interazione del virus con la cellula ospite [17]. La composizione proteica del virione maturo di Vaccinia Virus è stata analizzata avvalendosi dell'uso di varie tecniche come l'analisi di Immunoblot e il sequenziamento delle proteine. Fino ad oggi sono state individuate 22 proteine di membrana, di cui due enzimi e 20 proteine integrali con almeno un dominio transmembrana, 47 proteine "core" con funzione enzimatica nella sintesi del mRNA e proteine strutturali [24].

Le informazioni dettagliate sulla risposta immunitaria innata ed adattiva degli animali infetti da LSDV sono scarse, ponendo difficoltà nello sviluppo di metodi per contenere e contrastare la malattia [25]. Studi condotti nel 2019 hanno dimostrato l'induzione sia della risposta umorale che cellulo-mediata da parte dei vaccini contro Capripoxvirus. Analizzando i sieri dei bovini sotto esame vaccinati nel 2016 e rivaccinati nel 2017, viene rilevato un importante aumento del titolo anticorpale dal ventunesimo giorno post vaccinazione al quarantaduesimo. Inoltre, gli anticorpi rimangono rilevabili per circa sette mesi [26].

1. Risposta cellulo-mediata

Il ruolo dell'immunità cellulo-mediata (CMI) nella Lumpy Skin Disease è ancora poco conosciuto. La molecola chiave della risposta CMI è l'IFN- γ , una citochina prodotta da linfociti T Helper CD4+, linfociti T citotossici CD8+ e linfociti NK. Tra i ruoli dell'IFN- γ importante è la promozione dello scambio di classe tra le varie sottoclassi di Ig prodotte dalla plasmacellula e l'attivazione dei macrofagi. Tuttavia, il ruolo della risposta CMI nel proteggere gli animali dalla LSD, la sua cinetica ed il ruolo delle cellule T CD4+ e CD8+ sono ancora incompresi [26]. L'immunità contro CaPV è generalmente cellulo-mediata: la maggior parte dei virus, ad eccezione dei virioni extracellulari, rimane all'interno delle cellule. Diffondendosi direttamente da cellula a cellula il virus sfugge dagli anticorpi circolanti. Inoltre, una buona risposta umorale non può verificarsi in assenza dei linfociti T CD4+ [27].

2. Risposta umorale

Diversi studi hanno osservato la risposta immunologica e clinica di vitelli inoculati con LSDV con due diversi metodi: inoculazione tramite ago o inoculazione con artropodi (*Stomoxys calcitrans* e *Aedes aegypti*) risultati positivi al virus. Entrambe le vie hanno portato allo sviluppo clinico di una malattia simile a quella osservata sul campo, ma con alcune differenze tra loro come il periodo di incubazione o la diversa cinetica della risposta immunitaria. I risultati mostrano un breve picco di IFN di tipo I, associato all'insorgenza dei noduli cutanei: LSDV è in grado di inibirne la produzione durante il decorso della malattia, ma non nella fase iniziale. Con l'inoculazione tramite ago è stata dimostrata la produzione di IFN- γ da parte di linfociti CD4+ e CD8+ in diversi archi temporali post iniezione, mentre inoculando con artropodi è stata registrata una risposta CMI nei soli vitelli clinici [25].

La risposta umorale indotta post inoculazione per via endovenosa/intradermica è robusta e rapida: da 17 a 21 giorni dall'inoculazione gli animali clinici hanno prodotto anticorpi neutralizzanti al 100% LSDV. Gli anticorpi di 4 su 10 vitelli non clinici non hanno invece mostrato nessuna attività neutralizzante rilevabile [25].

Una delle proteine maggiormente immunogene della famiglia delle Poxviridae e del genere Capripox è la cosiddetta P32 che presenta un peso molecolare che varia dai 32 ai 35 kDa ed è presente sulla membrana di tutti i virioni maturi [14]. Essa interagisce con le stesse componenti molecolari superficiali con le quali entra in contatto la proteina A27. È codificata dall'ORF074 di LSDV, omologa al gene H3L di VV, ed il ruolo della proteina nel ciclo virale non è ancora del tutto noto. Diversi studi hanno dimostrato la capacità di H3L di VV di interagire con l'eparan solfato ed all'UDP glucosio del recettore della cellula ospite, indicando un ruolo nell'adsorbimento del virione intracellulare maturo sulla superficie delle cellule bersaglio. Oltre a questo, la proteina H3L sembra partecipare nella morfogenesi del virione: una carenza di H3L porta ad una grave interruzione dell'assemblaggio di IMV nelle cellule ospite. Tuttavia, attualmente non ci sono le informazioni sufficienti riguardo motivi, siti di legame ed attività enzimatiche a livello cellulare della proteina H3L [28] [14].

Oltre a P32, esistono altre proteine che potrebbero essere il target della risposta immunitaria umorale come A27, una molecola di adesione espressa superficialmente al virione maturo intracellulare (IMV) il cui ruolo è quello di

interagire con l'eparan solfato presente sulla superficie della cellula bersaglio. In particolare, A27 è una proteina omo-trimerica legata alla membrana virale grazie all'interazione del suo dominio a cerniera leucina C-terminale con la proteina transmembrana A17. Il sito di legame con l'eparan solfato è invece presente all'N-terminale. Alcuni anticorpi monoclonali murini anti-A27 prodotti hanno dimostrato di riconoscere come epitopo una regione vicina al sito di legame GAG, mentre altri l'estremità C-terminale. I primi MAbs sono risultati neutralizzanti, quindi potrebbero ricoprire un ruolo nell'evitare l'adesione cellulare con A27, contrariamente ai secondi [24].

D8 è una proteina di membrana di 32 kDa interagente con il condroitin solfato (CS) con il dominio N-terminale. Il dominio in questione è dotato di una fessura centrale carica positivamente che si è rivelata essere un sito di legame con glicosamminoglicani. Gli anticorpi monoclonali ottenuti hanno riconosciuto come epitopo una regione adiacente quella di legame con CS contribuendo ad eliminare/ridurre il legame di D8 con la superficie cellulare bersaglio. Ciò è esemplificato da una ridotta virulenza in modelli animali dei ceppi virali deleti di D8 [24].

L1 è una proteina miristoilata costituita da un fascio di α -eliche ripiegato contro una coppia di β -foglietti a due filamenti. Interessante è il residuo Asp35 all'estremità della proteina in cui si trovano anelli congiungenti le α -eliche ed i β -foglietti. L1 svolge un ruolo fondamentale nell'ingresso del virus: si associa al complesso multiproteico di ingresso EFC. Gli anticorpi monoclonali prodotti riconoscono e legano il loro antigene all'estremità della proteina, nelle prossimità del residuo Asp35 e degli anelli di congiunzione. La conseguenza del dato legame porta a bloccare l'ingresso virale indicando l'importanza della proteina nella penetrazione [24].

Diagnosi

La diagnosi di infezione da LSDV è più complessa rispetto al resto delle malattie esotiche dal momento in cui i segni possono essere confusi con altre patologie come l'afte epizootica (FMD), la puntura di insetto, la demodicosi e l'ipersensibilità [3]. Una diagnosi superficiale può essere fatta basandosi sulla rilevazione di noduli cutanei a livello di varie parti del corpo dell'animale colpito. Per avere una conferma è utile associare il rintracciamento di segni clinici a vari approcci di laboratorio sia diretti che indiretti: tra gli approcci diretti, che mirano a mettere in evidenza la presenza del virus, l'utilizzo di microscopia elettronica potrebbe essere già sufficiente all'identificazione del virus in campioni animali.

I campioni di biopsia cutanea possono essere raccolti per avere una conferma della malattia: trasportati in terreno con 20-50% di glicerolo in tampone fosfato, possono essere controllati mediante microscopia elettronica per identificare l'agente eziologico [3]. Tuttavia, attualmente la tecnica diagnostica che permette l'identificazione del virus in modo rapido, efficiente e processivo è la PCR convenzionale o la real-time PCR che si eseguono a partire da campioni quali saliva, omogenato di lesione nodulare, secrezioni, sperma e sangue. I geni bersaglio per la diagnosi sono solitamente quelli codificanti per proteine strutturali come P32 o GPCR [29]. Heine et al. (1999) hanno scoperto che il gene P32 di SPPV e LSDV ha una somiglianza di sequenza dell'acido nucleico superiore al 98% [30]; inoltre,

l'antigene P32 è ritenuto importante per la patogenicità e nella diagnosi di CaPV [31]. GPCR, o recettore accoppiato alla proteina G, sembrerebbe essere importante per la virulenza: gli effetti patogeni includono lisi cellulare e down-regolazione delle citochine [32]. Per la caratterizzazione genetica e l'analisi filogenetica vengono spesso utilizzati i geni GPCR, RPO30 e P32 [31].

Si ricordano altre tecniche diagnostiche alternative quali l'isolamento del virus. I Capripoxvirus hanno la capacità di crescere in diverse linee cellulari del corpo di bovini, ovini e caprini (cellule di rene, di polmoni, muscolari o del derma), portando ad effetti citopatici rilevabili a due giorni dall'infezione, da confermare poi con PCR specifica. Come raccomandato dall'WOAH è consigliato l'uso di cellule primarie di testicolo di agnello o cellule di rene di agnello. Un'altra tecnica per l'isolamento virale utilizza uova embrionate di pollo (ECE). LSDV è infatti in grado di indurre lesioni linee alla membrana corio allantoidea (CAM) delle ECE, confermate come specifiche di LSD tramite PCR ad un giorno dall'infezione o immunofluorescenza dopo due giorni [29].

Tra le tecniche diagnostiche indirette ci sono quelle sierologiche: quella maggiormente utilizzata è il test di neutralizzazione virale in grado di rilevare la presenza di anticorpi neutralizzanti nei campioni di sangue/siero in esame [29]. Il test valuta la capacità degli anticorpi presenti nei sieri di animali infetti di neutralizzare l'entrata del virus nelle cellule. Per il test sono usate linee cellulari permissive alla crescita del virus, i sieri sono testati in diluizione e il virus viene utilizzato in quantità prefissata. In base alla diluizione limite alla quale il siero è in grado di neutralizzare il virus, e quindi impedire la visualizzazione di un effetto citopatologico sulle cellule, è possibile stabilire un titolo di anticorpi presenti e quindi di neutralizzazione [29].

Per le analisi sierologiche è utilizzata anche la tecnica ELISA, più semplice e meno laboriosa della siero-neutralizzazione virale. Attualmente le tecniche ELISA sviluppate possono essere suddivise per la tipologia di antigene utilizzato. Data la cross-reattività presente tra i virus del genere Capripox, e l'elevata omologia antigenica e genomica, è possibile utilizzare come antigeni SPPV o GTPV indifferentemente. Sono stati descritti ELISA basati su virus completi inattivi: Babiuk et al. (2009) hanno sviluppato un'ELISA indiretto, utilizzando il ceppo Nigeriano Sheeppox isolato e inattivato con il calore, con sensibilità e specificità che vanno dall'87 al 95% con sieri di GoatPox e Sheeppox, percentuali che si abbassano quando vengono usati sieri LSDV [29] [33] [34]. Un secondo tipo di saggio ELISA è quello basato su proteine/peptidi virali ricombinanti: per esempio, Carn et al. (1994) hanno espresso la proteina P32 dei Capripox Virus e sviluppato un ELISA indiretto con sieri LSDV con sensibilità che si aggira attorno all'84% [29]. L'ELISA P32 sviluppato da Venkatesan et al. (2018), basata sulla proteina P32 di Goatpoxvirus, ha dimostrato una sensibilità del 98% e una specificità del 99% comparati al IVN [29]. Nel 2018 è stato sviluppato un saggio ELISA indiretto basato sulla proteina ricombinante P32 di Goatpox Virus, espressa in E. Coli BL21 CodonPlus (DE3), privata delle regioni transmembrana idrofobiche. Il metodo diagnostico così sviluppato è valido nell'individuare anticorpi contro Goatpox Virus e Sheeppox Virus a partire da sieri infetti, mentre l'antigene ricombinante non è stato testato per la reattività contro LSDV [33].

Prevenzione e controllo

Attualmente non esistono trattamenti specifici ed efficaci contro la Lumpy Skin Disease. La vaccinazione è uno dei metodi migliori per controllare la diffusione della malattia nelle regioni endemiche: ad oggi il più usato è un vaccino vivo attenuato, somministrato per via sub cutanea, basato sul ceppo di Neethling sudafricano di LSDV prodotto da *Onderstepoort Biological Products* [3].

Il ceppo Neethling di LSDV è stato isolato fin dai primi focolai di LSD in Sud Africa ed in quanto ceppo più rappresentativo di LSDV è stato ampiamente utilizzato per la produzione di un vaccino vivo attenuato. Il ceppo Neethling è stato attenuato tramite 61 passaggi seriali in cellule di rene di agnello (LK), seguiti da 20 passaggi in membrana CAM di uova di pollo embrionate e tre passaggi in cellule LK. L'efficacia del vaccino è stata dimostrata tra il 2016 ed il 2017 quando la sua somministrazione ha eliminato con successo i focolai di LSD in Europa sudorientale. Un'indagine condotta in un'azienda lattiero-casearia greca ha dimostrato che solo nel 12% dei casi (26 su 215 animali immunizzati) le vacche riceventi il vaccino hanno sviluppato gonfiore nella zona di iniezione, mentre nel 9% dei casi è stata osservata la comparsa di noduli cutanei a livello di collo, scapola e zona lombare con un diametro inferiore a 0.5 cm. Tutti i noduli apparsi nel giro di 12 giorni guarivano o si convertivano in croste secche facilmente rimovibili [5] [35]. Nel 2016 la Croazia ha vaccinato in modo preventivo l'intera popolazione di bovini con due vaccini omologhi (Lumpvax e OBP Neethling): questo ha impedito l'ingresso del virus nel Paese [36].

Il vaccino, che deve essere mantenuto a temperature comprese tra 4 e 8°C, è consigliato per i vitelli di sei mesi se nati da madri vaccinate per continuare con un booster una volta all'anno. Vitelli nati da madri non vaccinate dovrebbero essere vaccinati a qualsiasi età. È consigliata la vaccinazione degli animali in primavera [37].

Oltre al Neethling, esistono altri ceppi utilizzati per la produzione di vaccini verso LSDV in Etiopia, Israele ed Egitto quali i ceppi KSGP. I ceppi in questione sono di vaiolo keniota di pecora e capra, che in seguito si scoprì appartenere invece a LSDV [38]. Nonostante il virus sia stato isolato da pecore, analisi filogenetiche di sequenze parziali condotte successivamente hanno dimostrato come KSGP O-240 sia un virus della malattia nodulare della pelle, quindi LSDV [39]. Il genoma di KSGP, infatti, condivide il 99.9% di omologia con il ceppo Neethling NI-2490 LSDV [39]. In questo caso per l'attenuazione dei vaccini basati sui ceppi KSGP i passaggi variano tra i cinque ed i trenta, molto più basso rispetto al caso del Neethling [5]. Nonostante i ceppi KSGP siano ampiamente sfruttati contro SPPV e GTPV, alcuni studi hanno palesato la possibilità di sviluppo di segni clinici nei bovini vaccinati in questo modo [38]. Inoltre, è stata osservata una protezione incompleta durante un'epidemia di LSD in Egitto [27]. Gli effetti avversi sono causati con molta probabilità dal più basso numero di passaggi di attenuazione [38]. Altri vaccini omologhi sono LumpyVax e Herbivac LS, usati in Sud Africa o il Vaccin LSD Neethling O vivant usato in Marocco [15].

I vaccini omologhi non sono gli unici in grado di indurre una protezione immunitaria duratura: sfruttando il principio della cross-reattività a livello

antigenico esistente tra i virus del genere CaPV, si possono somministrare vaccini eterologhi contenenti ceppi di GTPV/SPPV contro LSDV che, infatti, condivide più del 97% di omologia di sequenza dell'acido nucleico con i due virus dello stesso genere. Nel 2015 in Etiopia sono state valutate la sicurezza, l'efficacia e l'immunogenicità del vaccino basato sul ceppo Gorgan GTPV contro l'LSD in bovini: il ceppo sviluppato dal *Jordan Biological Center* è stata un'arma sfruttata in Medio Oriente per prevenire la diffusione di GTPV nel 2010. Lo studio ha dimostrato una buona protezione e sierconversione contro i segni clinici del virus LSD nei bovini presi in considerazione; inoltre, non sono stati rilevati effetti avversi negli animali vaccinati. Dall'altra parte è stata riscontrata una forte reazione immunitaria a livello del sito di iniezione: uno studio iraniano ha poi confermato un'elevata produzione di IFN- γ e IL-4 negli animali ricevuti il vaccino contro GTPV [1] [5] [15].

Un'alternativa ai vaccini attenuati sono i vaccini inattivati che risultano essere più sicuri. Il virus è inattivato attraverso l'uso di sostanze quali paraformaldeide o BEI (bi-ethylimine bromure) quindi, non in grado di replicarsi né di essere trasmesso ad animali sani, sono impossibili fenomeni di reversione alla virulenza e ricombinazioni genomiche. Inoltre, il vaccino inattivato è molto più stabile rispetto a quello attenuato dal momento in cui il microorganismo non ha bisogno di mantenersi in condizioni di temperatura ideali. Tuttavia, per stabilire una buona protezione potrebbero servire due iniziali somministrazioni seguite da richiami periodici, cosa che aumenterebbe il costo e le risorse per una possibile campagna vaccinale [5]. Inoltre, i vaccini inattivi non sono in grado di indurre immunità cellulo-mediata, motivo per il quale non sono così efficaci come quelli attenuati.

Per un efficace controllo e prevenzione della malattia, la vaccinazione a lungo termine dovrebbe essere resa obbligatoria vista la capacità del LSDV di sopravvivere nell'ambiente per lungo tempo [3]. Oltre al vaccino, altri metodi di controllo sono:

- Limitazione del movimento: il movimento di animali infetti dovrebbe essere vietato per evitare la diffusione della malattia. Inoltre, animali con lesioni riconducibili alla malattia devono essere messi in quarantena per prevenire la diffusione del virus [1] [3].
- Controllo del vettore: fare uso di insetticidi e trappole per insetti in modo regolare è già considerato essere un buon metodo di controllo [3]. Altre misure generali sono la pulizia degli ambienti di riproduzione dei vettori come fonti di acqua stagnante, letami e liquame [16].
- Abbattimento degli animali suscettibili che sono esposti all'infezione o di tutti quegli animali che mostrano segni clinici riconducibili alla malattia LSD [3]. In molti Paesi con risorse limitate questa pratica potrebbe essere sconsigliata; inoltre, l'uccisione potrebbe non essere consentita dalla legge per motivi religiosi e tradizionali. La legislazione europea prevede, nel caso di diagnosi di focolai di LSD in uno stato membro, l'abbattimento dei bovini colpiti e di quelli a contatto, oltre che l'istituzione di zone di sorveglianza dai 3 ai 10 km attorno l'allevamento infetto. In UE nessun vaccino è in commercio e la vaccinazione è prevista solo in caso di emergenza come misura per limitare la diffusione dell'infezione.

- Distruzione delle carcasse e disinfezione dell'ambiente ogni qual volta che un animale risulta positivo in quanto si tratta di virus in grado di resistere per mesi nella sostanza organica presente nei resti degli animali [7].

Materiali e metodi

1. Studio della proteina e dei frammenti proteici da esprimere

La valutazione preliminare delle proteine da esprimere è stata fatta in silico: il gene codificante la proteina P32 di LSDV è stato ricercato nel database Gene Bank con l'Accession Number AAN02799.1 [40] [41]. La sequenza nucleotidica (969 nt) è stata tradotta utilizzando il programma Expasy (Swiss Institute of Bioinformatics). Il programma di predizione delle strutture secondarie delle proteine PredictProtein [42] è stato utilizzato per prevedere la struttura secondaria e le caratteristiche antigeniche di P32 e per decidere la strategia per la mappatura antigenica della proteina stessa.

Il successivo studio di epitope mapping si concentra sulla regione extravirione di 276 aa di P32; l'intera sequenza amminoacidica di interesse (Fig. 8) è stata inizialmente suddivisa in due subunità da 158 aa ciascuna con un overlap di 40 aa: P32A, che inizia all'N-terminale della regione extravirione e conclude con la regione di overlap, ed P32B, che parte dalla regione di overlap e conclude con il C-terminale (Fig. 9) (Tab. 1).

MADIPLYVIPIVGREISDVVPELKSDNDIFYKKVDTVKDFKNSDVNFFFKDKKDISLSYKFLIWEKVEKSSGGVEN
FTEYFSGLCNALCTKEAKSSIVKHFSLWKSADADIKNSENKFI~~VVIEDDNTLKDLITIHNIIE~~MQEKNIDIFQLR
ETFHNSNSRILFNQENNNFMYSYTGGYDFLSAYVIRLSSAIKIINEIKNKGISTLSFEMYKLEKELKLNQRVL
NDSSKYILHNTKYLKSKRANEMKNGIWNRVGKWMHRFPDFSYIYISHP

Figura 8: Sequenza amminoacidica della regione extravirione di P32. Sottolineata la regione di overlap tra P32A e P32B

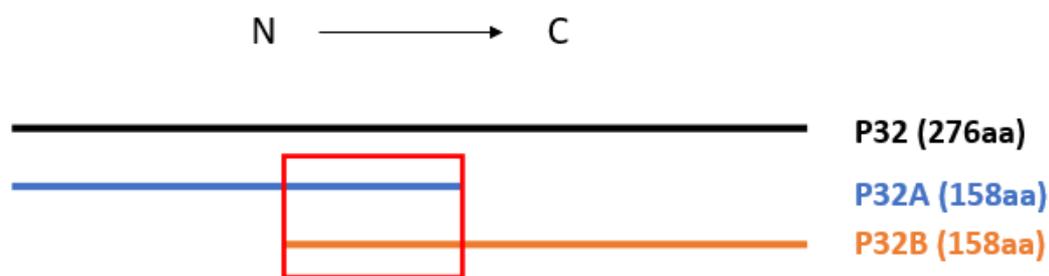


Figura 9: Prima strategia di espressione di sub-frammenti per la mappatura antigenica della proteina P32 di LSDV

Successivamente, con una strategia diversa, sono state ottenute ulteriori sei subunità di P32, denominate da P32B1 a P32B6; la porzione C-terminale della regione proteica extracellulare è stata tenuta fissa, allungando l'N-terminale di circa 20-50 aminoacidi a volta (Fig. 10).

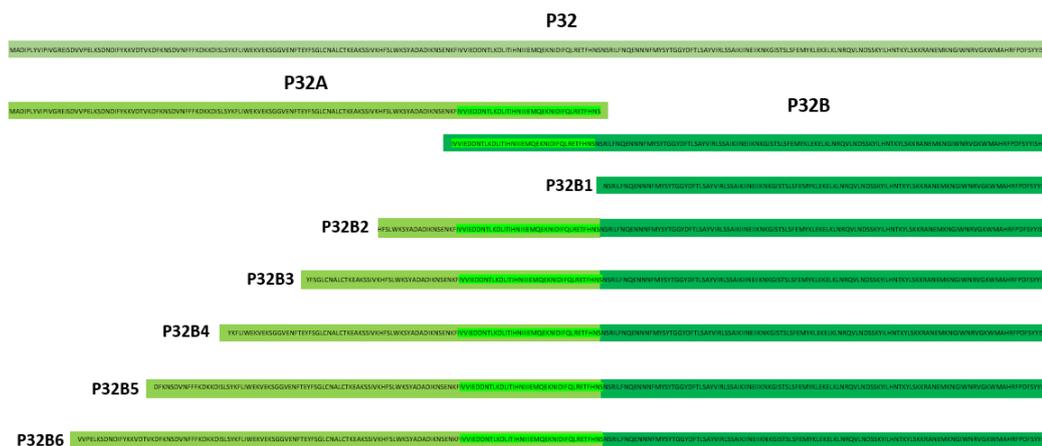


Figura 10: Seconda strategia di espressione di sub-frammenti proteici per la mappatura antigenica della proteina P32 di LSDV

Tabella 1: Sequenza amminoacidica e rispettivo peso molecolare dei sub-frammenti della P32 espressi

Nome frammento proteico	Peso molecolare	Sequenza amminoacidica
P32A	19.49 kDa	MADIPLYVIPIVGREISDVVPELKSDNDIFY KKVDTVKDFKNSDVNFFFKDKKDISLSYK FLIWEKVEKSGGVENFTEYFSGLCNALCT KEAKSSIVKHFSLWKSADADIKNSENKF IVVIEDDNTLKD LITIHNIIE MQEKNIDIFQ LRETFHNS
P32B	20 kDa	IVVIEDDNTLKD LITIHNIIE MQEKNIDIFQ LRETFHNSNSRILFNQENNNFMYSYGGY DFTLSAYVIRLSSAIKIINEIKNKGISTSLSF EMYKLEKELKLN RQVLNDSSKYILHNTK YLSKKRANEMKNGIWN RVGK WMAHRFP DFSYYISHP
P32B1	15.11 kDa	NSRILFNQENNNFMYSYGGYDFTLSAYV IRLSSAIKIINEIKNKGISTSLSFEMYKLEK ELKLN RQVLNDSSKYILHNTKYLSKKRAN EMKNGIWN RVGK WMAHRFPDFSYYISHP
P32B2	22.24 kDa	HFSLWKSADADIKNSENKFIVVIEDDNT LKD LITIHNIIE MQEKNIDIFQLRETFHNSN SRILFNQENNNFMYSYGGYDFTLSAYVI RLSSAIKIINEIKNKGISTSLSFEMYKLEKE LKN RQVLNDSSKYILHNTKYLSKKRANE MKNGIWN RVGK WMAHRFPDFSYYISHP
P32B3	24.39 kDa	YFSGLCNALCTKEAKSSIVKHFSLWKSAD ADIKNSENKFIVVIEDDNTLKD LITIHNIIE MQEKNIDIFQLRETFHNSNSRILFNQENN NFMYSYGGYDFTLSAYVIRLSSAIKIINEI

		IKNKGISTLSLFEMYKLEKELKLNQRVLN DSSKYILHNTKYLSSKCRANEMKNGIWR VGKWMHRFPDFSYISHP
P32B4	26.77 kDa	YKFLIWEKVEKSGGVENFTEYFSGLCNAL CTKEAKSSIVKHFSWWSYADADIKNSN KFIVVIEDDNTLKDLITIHNIIEMQEKNID FQLRETFHNSNSRILFNQENNNFMYSYTG GYDFTLSAYVIRLSSAIKIINEIKNKGIST LSFEMYKLEKELKLNQRVLNDSSKYILHN TKYLSSKCRANEMKNGIWRVGKWMHR FPDFSYISHP
P32B5	29.15 kDa	DFKNSDVNFFFKDKKDISLSYKFLIWEKV EKSGGVENFTEYFSGLCNALCTKEAKSSI VKHFSWWSYADADIKNSNKFIVVIEDD NTLKDLITIHNIIEMQEKNIDIFQLRETFHN SNSRILFNQENNNFMYSYTGGYDFTLSAY VIRLSSAIKIINEIKNKGISTLSLFEMYKLE KELKLNQRVLNDSSKYILHNTKYLSSKRA NEMKNGIWRVGKWMHRFPDFSYISH P
P32B6	31.47 kDa	VVPELKSNDNIFYKKVDTVKDFKNSDVN FFFKDKKDISLSYKFLIWEKVEKSGGVEN FTEYFSGLCNALCTKEAKSSIVKHFSWWS SYADADIKNSNKFIVVIEDDNTLKDLITI HNIIEMQEKNIDIFQLRETFHNSNSRILFN QENNNFMYSYTGGYDFTLSAYVIRLSSAI KIINEIKNKGISTLSLFEMYKLEKELKLN QVLNDSSKYILHNTKYLSSKCRANEMKNG IWRVGKWMHRFPDFSYISHP

Per lo studio sono stati utilizzati di due plasmidi: pET22b e pET45b. Il sistema d'espressione basato su plasmidi pET prevede il clonaggio della proteina d'interesse a valle del promotore della RNA polimerasi fagica T7. Il vettore plasmidico pET22b (Novagen) (Fig. 11) è stato ingegnerizzato da Shen et al. 2009 [43] attraverso l'inclusione di una coda composta dal dominio cisterin-proteasico (CPD) della tossina MARTX di *Vibrio cholerae*; il suo ruolo è quello di aumentare la solubilità della proteina da produrre. Il plasmide pET45b è invece privo di CPD (Fig. 13). Entrambi i vettori plasmidici portano la resistenza all'antibiotico ampicillina, lo start codon ATG, lo stop codon TGA e sei istidine: nel caso di pET22b la proteina si inserisce tra l'ATG ed il CPD (Fig. 12), mentre per pET45b tra le istidine e TGA (Fig. 14).

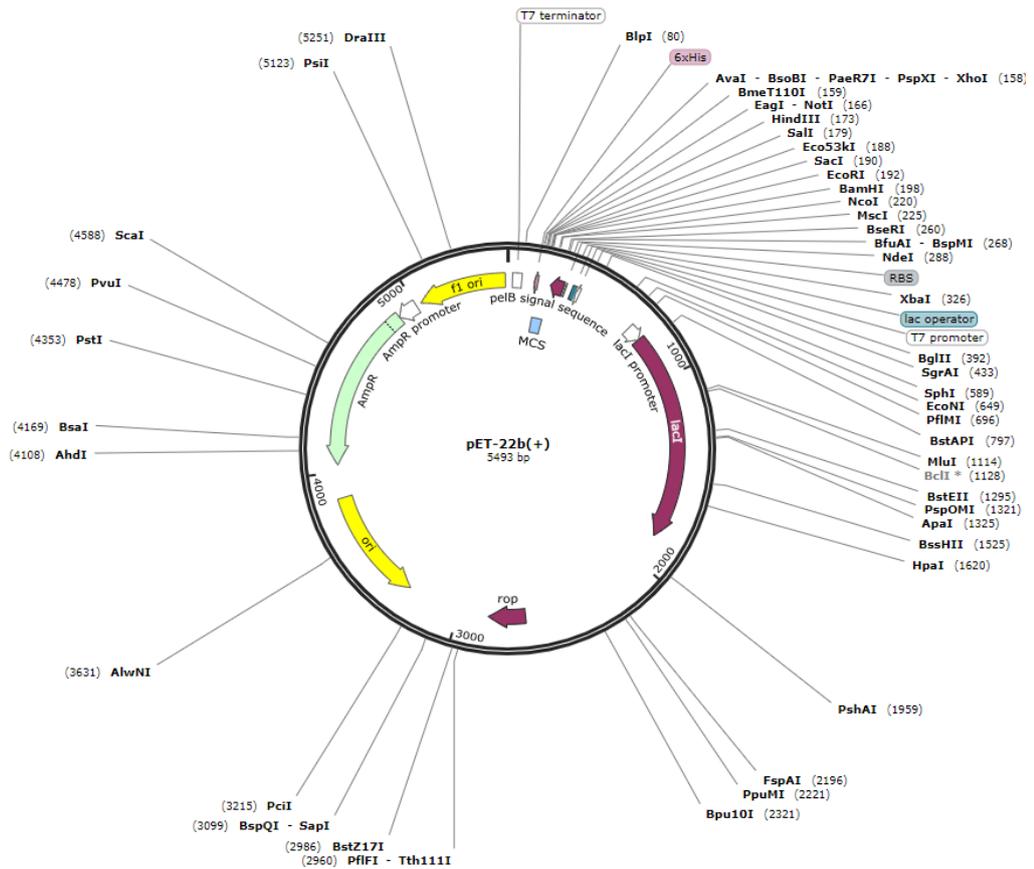


Figura 11: Mappa dei siti di restrizione di pET22b

T7F + SEQ. PLASMIDE PRE – ATG – PROTEINA – CPD – HYS - TGA – SEQ. PLASMIDE POST + T7R

Figura 12: Schema del clonaggio della sequenza nucleotidica codificante per la proteina/frammento proteico di interesse in pET22b; T7F e T7R rappresentano i primers che appaiano sul plasmide mentre HYS rappresenta la coda di sei istidine fondamentale per il passaggio di purificazione delle proteine

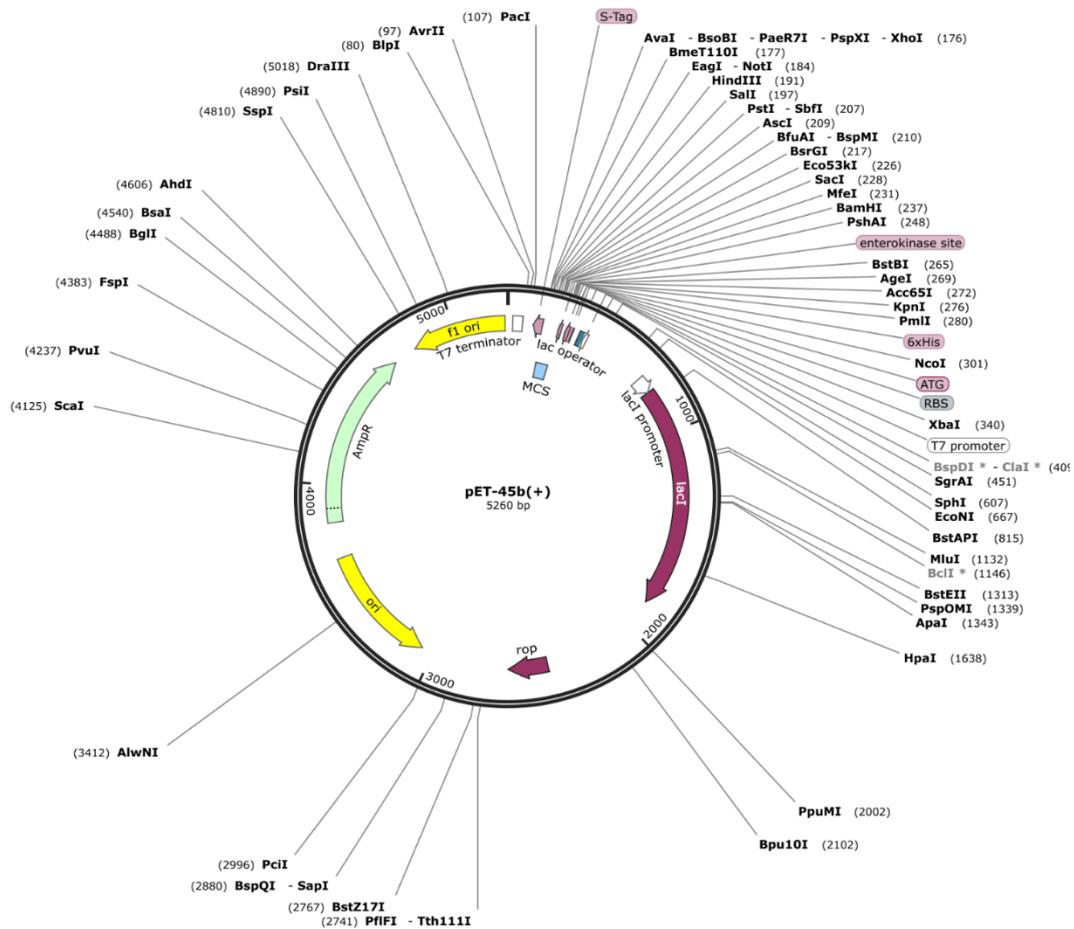


Figura 13: Mappa dei siti di restrizione di pET45b

ATG – GCA – HYS – GTG GGT ACC – PROTEINA – TAG

Figura 14: Schema del clonaggio della sequenza nucleotidica codificante per la proteina/frammento proteico di interesse nel plasmide pET45; GCA è il codone non eliminabile codificata per l'Alanina e GTG, GGT, e ACC quelli codificanti per Valina, Treonina e Glicina

I percorsi di clonaggio e di espressione da intraprendere sono stati diversi per ogni vettore plasmidico: nel caso di pET45b è stato scelto il clonaggio basato sugli enzimi di restrizione, mentre per pET22b il clonaggio Gibson ed il metodo Golden Gate (Tab. 2). La scelta di clonaggi diversi dipende dalla tipologia di plasmide scelto e dall'ampiezza del Multiple Cloning Site a disposizione: i metodi Golden Gate e Gibson sono stati scelti quando la gamma di enzimi di restrizione a disposizione era ristretta.

Per il clonaggio sono stati utilizzati i batteri chimicamente competenti TOP10 dell'Invitrogen (Cat. No: C404010) [44] e NEB® 5-Alpha Competent E. coli (High Efficiency). Per l'espressione sono stati utilizzati i batteri BL21 (DE3) della NEB (Cat. No: C2527) [45].

Tabella 2: Tabella riassuntiva dei plasmidi e delle tecniche utilizzate per i clonaggi effettuati nello studio

Nome frammento	Vettore plasmidico	Clonaggio	Batteri di clonaggio	Batteri di espressione
P32	pET22b	Golden Gate	TOP10CC	BL21 (DE3)
P32A	pET45b	Enzimi di restrizione	TOP10CC	BL21 (DE3)
P32B	pET45b	Enzimi di restrizione	TOP10CC	BL21 (DE3)
P32A	pET22b	Gibson	NEB® 5-Alpha	BL21 (DE3)
P32B	pET22b	Gibson	NEB® 5-Alpha	BL21 (DE3)
P32B1- P32B6	pET22b	Gibson	NEB® 5-Alpha	BL21 (DE3)

Al fine di valutare i risultati ottenuti, il profilo di idrofobicità e di antigenicità di ciascuna proteina/frammento proteico ricombinante ottenuto è stato valutato tramite il programma DNA Star, impostando la scala Kyte-Doolittle [46].

2. Clonaggio

a. Clonaggio con metodo Golden Gate

Il clonaggio Golden Gate, così come il metodo Gibson che verrà descritto più avanti, sono metodi innovativi di clonaggio genico che non richiedono come prerequisito l'utilizzo di siti di restrizione presenti nel "multiple cloning site" del plasmide e alle estremità della sequenza nucleotidica di interesse da clonare. In particolare, il metodo Golden Gate si avvale dell'utilizzo di enzimi di restrizione tipo IIS, che si differenziano dai classici principalmente per la loro capacità di tagliare al di fuori della sequenza riconosciuta, creando estremità protendenti di quattro basi. Dal momento che le estremità non fanno parte della sequenza riconosciuta dall'enzima, ma possono essere sequenze specifiche dell'inserto o del plasmide, sono utilizzate per ligare in modo specifico e "scar less" due frammenti di DNA. Il sistema prevede che sia l'inserto che il vettore plasmidico siano amplificati con primers specifici contenenti il sito di restrizione Type IIS BsaI e regioni tra loro complementari del plasmide e dell'inserto. La sequenza del gene d'interesse, così come il plasmide, amplificati con i primers specifici descritti in precedenza, durante il processo di digestione/ligazione perdono la sequenza del sito di restrizione presentando alle estremità regioni complementari tra loro.

Il metodo Golden Gate è stato utilizzato per il clonaggio di P32 in pET22b, il cui MCS è illustrato in Figura 15, con i primer elencati in Tabella 3.

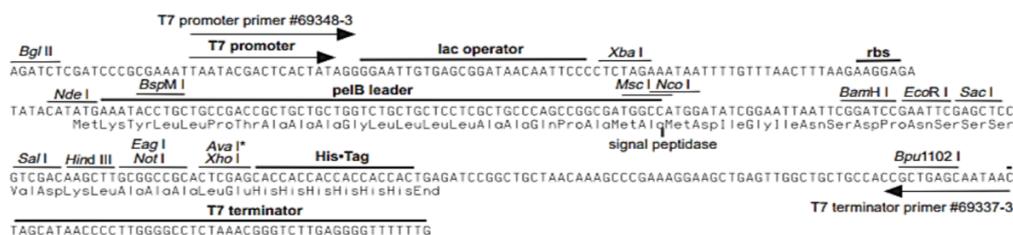


Figura 15: Multiple Cloning Site (MCS) del plasmide pET22b

Tabella 3: Elenco dei primer per l'amplificazione di P32 ed il plasmide pET22b

Nome primer	Sequenza primer	Temperatura di Melting
P32 F GG	AGCTTGCGGTCTCGTATGGCACATATTCCAT TATAT	75.3°C
P32 R GG	AGCTTGCGGTCTCCCGACTGGATGGGATAT ATAGTA	78.1°C
P22 FOR UNI	AGCTTGCGGTCTCGGTTCGACGCATTAGCGG ATGGAAAATAC	71.2°C
P22 REV UNI	AGCTTGCGGTCTCGGTTATGTATATCTCCTT CTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC	82.6°C

b. Clonaggio con metodo Gibson

Il clonaggio Gibson è un metodo molecolare che garantisce l'unione, in un unico plasmide, di fino a 15 frammenti di DNA di interesse senza l'utilizzo degli enzimi di restrizione. Il prerequisito del Gibson è la presenza di regioni complementari 15-80 bp alle estremità delle porzioni geniche adiacenti da ligare. Il metodo garantisce l'assemblaggio di frammenti che condividono delle regioni terminale omologhe tramite l'utilizzo di tre enzimi: un'esonucleasi che taglia dall'estremità 5', una DNA polimerasi che aggiunge nucleotidi ed una DNA Ligasi che lega i frammenti covalentemente tra di loro [47] (Fig. 16).

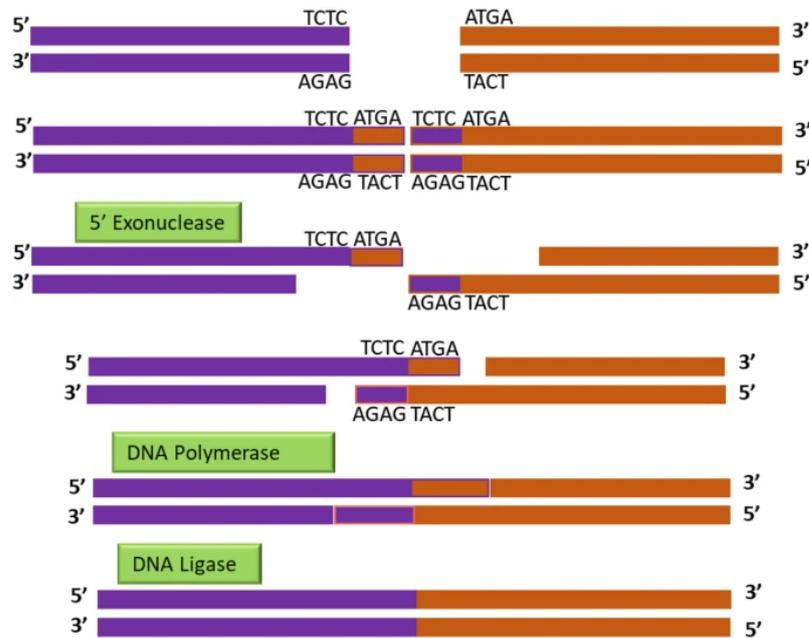


Figura 16: Rappresentazione del metodo di clonaggio Gibson. L'enzima 5' esonucleasi taglia a livello delle regioni terminale omologhe dei frammenti di interesse. La DNA polimerasi riempie i gap generati mentre una DNA ligasi termostabile completa l'annealing tra i frammenti

Per l'amplificazione di plasmide e vari inserti per il clonaggio Gibson sono stati ordinati i primer elencati in Tabella 4.

Tabella 4: Elenco dei primer per l'amplificazione dei frammenti nucleotidici destinati al clonaggio in pET22b e del plasmide stesso

Nome primer	Sequenza Primer	Frammento che lega	Temperatura di Melting
pET22 Gib A R	TATAATGGAATATCTGC CATATGTATATCTCCTTC	Tra pET22b e P32A	66.5°C
pET22 Gib A F	TGAAACTTTTCATAATA GTGTCGACGCATTAGCG GAT	Tra P32A e CPD	75.8°C
P32A Gib F	GAAGGAGATATACATAT GGCAGATATTCATTAT A	Tra pET22b e P32A	66.5°C
P32A Gib R	ATCCGCTAATGCGTCGA CACTATTATGAAAAGTT TCA	Tra P32A e CPD	75.8°C
pET22 Gib B F	ACTATATATCCCATCCA GTCGACGCATTAGCGGA T	Tra P32B e CPD	76.2°C
pET22 Gib B R	TCTTCTATAACAACAATC ATATGTATATCTCCTTC	Tra pET22b e P32B	64.1°C

P32B Gib F	GAAGGAGATATACATAT GATTGTTGTTATAGAAG A	Tra pET22b e P32B	64.1°C
P32B Gib R	ATCCGCTAATGCGTCGA CTGGATGGGATATATAG T	Tra P32B e CPD	76.2°C
pET22 Gib B1 F	ACTATATATCCCATCCA GTCGACGCATTAGC	Tra P32B1 e CPD	71.6°C
pET22 Gib B1 R	GATTGAACAATATTCTA GAATTCATATGTATATCT CCTTC	Tra pET22b e P32B1	66.9°C
P32B1 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GAATTCTAGAATATTGTT CAATC	Tra pET22b e P32B1	66.9°C
P32B1 Gib R	GCTAATGCGTCGACTGG ATGGGATATATAGT	Tra P32B1 e CPD	71.6°C
pET22 Gib B2 R	GATTTCCATAAACTAAA GTGCATATGTATATCTCC TTC	Tra pET22b e P32B2	68.2 °C
P32B2 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GCACTTTAGTTTATGGA AATC	Tra pET22b e P32B2	68.2 °C
pET22 Gib B3 R	CATAATCCAGAAAATA CATATGTATATCTCCTTC	Tra pET22b e P32B3	64.9°C
P32B3 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GTATTTTTCTGGATTATG	Tra pET22b e P32B3	64.9°C
pET22 Gib B4 R:	TCCCATATAAGGAACTT ATACATATGTATATCTCC TTC	Tra pET22b e P32B4	66.5°C
P32B4 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GTATAAGTTCCTTATATG GGA	Tra pET22b e P32B4	66.5°C
pET22 Gib B5 R	ACATCTGAATTTTTAAA ATCCATATGTATATCTCC TTC	Tra pET22b e P32B5	67.8°C
P32B5 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GGATTTTAAAAATTCAG ATGT	Tra pET22b e P32B5	67.8°C
pET22 Gib B6 R	CTTTTTAATTCTGGA ACTACCATATGTATATCTCCT TC	Tra pET22b e P32B6	67.6°C
P32B6 Gib F	GAAGGAGATATACATAT GGTAGTTCAGAATTAA AAAG	Tra pET22b e P32B6	67.6°C

*In viola la sequenza del primer che appaia con il frammento di interesse, in arancio quella che appaia con il plasmide e sottolineata quella che appaia con il CPD.

c. Clonaggio con enzimi di restrizione

Nel caso del plasmide pET45b, privo di CPD, viene scelto un metodo diverso per l'inserzione del frammento: gli enzimi di restrizione. Per l'inserimento del gene nel plasmide si utilizzando due enzimi di restrizione, KpnI (**GGTACC**) e SacI (**GAGCTC**), scelti rispetto a quelli presenti nell'MCS (*Multiple Cloning Site*) di pET45b (Fig.). Gli enzimi KpnI e SacI tagliano in modo sfalsato a livello del loro sito di restrizione (Fig. 17) lasciando le estremità non appaiate complementari a quelle di destinazione.

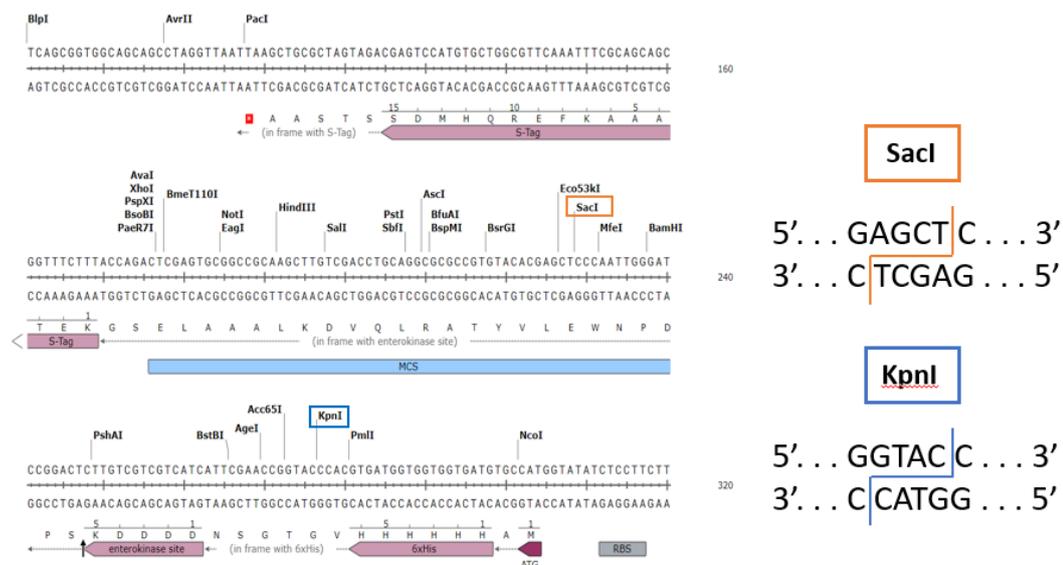


Figura 17: A sinistra l'illustrazione del Multiple Cloning Site del plasmide pET45b; in arancio l'enzima di restrizione SacI ed in blu KpnI. A destra i siti di restrizione dei rispettivi enzimi

Tabella 5: Elenco dei primer per l'amplificazione dei frammenti nucleotidici destinati al clonaggio in pET45b

Nome del primer	Sequenza del primer	Frammento che lega	Temperatura di Melting
P32A Hys F	TGGGTACC GCAGATATTCC ATTATAT	P32A	65.6°C
P32A Hys R	ACGAGTC CTA ACTATTAT GAAAAGTTTCACGT	P32A	69.1°C
P32B Hys F	TGGGTACC ATTGTTGTTAT AGAAGATGA	P32B	65.8°C
P32B Hys R	ACGAGTC CTATGGATGGG ATATATAGTAAG	P32B	67.2°C

*In azzurro il sito di restrizione in cui taglia l'enzima KpnI ed in verde quello in cui taglia SacI.

3. Amplificazione

a. Amplificazione del DNA plasmidico e virale per il Clonaggio Golden Gate

La proteina P32 è stata amplificata a partire dal DNA estratto di LSDV (Ceppo di riferimento Neethling), mentre il plasmide dalla miniprep del pET22CPD (270.7 ng/ μ L) portata alla concentrazione finale di 2ng/ μ L. I protocolli di amplificazione finali sono stati messi a punto valutando diverse variabili quali il volume e la concentrazione di template, la concentrazione dei primer Forward e Reverse e la temperatura di Annealing dei primers. Per la reazione di PCR è stato usato l'enzima ThermoScientific™ Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). Nel kit sono presenti due buffer di reazione: 5X Phusion HF Buffer e 5X Phusion GC Buffer. Il primo aumenta la fedeltà di trascrizione da parte dell'enzima mentre il secondo facilita l'amplificazione di frammenti lunghi e ricchi in G/C. Le condizioni finali di reazione e di profilo di amplificazione di plasmide e inserto sono rispettivamente riportate in Tabelle 6 e 7 e Tabelle 8 e 9. Il volume finale di ciascuna reazione è di 50 μ L.

Tabella 6: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32 (6138 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	28.5 μ L	//
5X Phusion HF Buffer	10 μ L	1X
Dntps	1 μ L	200 μ M each
P22 FOR UNI (10 μ M) Tm = 71.2°C	2.5 μ L	0.5 μ M
P22 REV UNI (10 μ M) Tm = 82.6°C	2.5 μ L	0.5 μ M
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 μ L	0.02 U/ μ L
Plasmide pET22b	5 μ L	//

Tabella 7: Profilo termico per l'amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	68°C	30''	
Estensione	72°C	6'	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

Tabella 8: Reazione di PCR per amplificare P32 (828 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	28.5 μ L	//
5X Phusion HF Buffer	10 μ L	1X
Dntps	1 μ L	200 μ M each

P32 F GG (10 μ M) T _m = 75.3°C	2.5 μ L	0.5 μ M
P32 R GG (10 μ M) T _m = 78.1°C	2.5 μ L	0.5 μ M
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 μ L	0.02 U/ μ L
DNA	5 μ L	//

Tabella 9: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	30''	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	65°C	30''	
Estensione	72°C	30''	
Estensione finale	72°C	7'	1
Mantenimento	4°C	∞	

L'avvenuta amplificazione è stata valutata su un gel agarosio all'1% per i plasmidi e al 2% per gli amplificati di PCR. Per la preparazione del gel, 2g di agarosio (o 1 gr nel caso del gel 1%) sono stati miscelati a 100 mL di TBE 1X e fatti sciogliere in microonde (Ricetta 8). All'agarosio sciolto è stato poi aggiunto l'intercalante Midori Green Advance DNA stain (Nippon Genetics Europe Cat. No. MG04) alla concentrazione indicata dalla ditta (1/1000). La soluzione è stata versata in una vaschetta di plastica allestita internamente con pettine per la formazione dei pozzetti per il caricamento del campione. Nel primo pozzetto del gel al 2% è stato caricato il DNA Molecular Weight Marker VI (Sigma-Aldrich Cat. No. 11062590001) rispettivamente addizionato con buffer di caricamento (6X) contenente dei coloranti per monitorare la corsa e del glicerolo per facilitare l'entrata nei pozzetti del campione. In alternativa al marker VI viene usato il DNA Molecular Weight Marker XIV. Nel primo pozzetto del gel a 1% è stato caricato il GeneRuler 1kb DNA Ladder ready to use (ThermoScientific™ Cat. No. SM0313), addizionato anch'esso al buffer di caricamento. Dopo il caricamento al gel è stato applicato un voltaggio di 110V utilizzando un PowerPac™ Basic power supply per elettroforesi (BioRad Cat. No. 1645050). Il gel è stato, infine, lasciato correre fino alla totale separazione delle bande e visualizzato agli UV attraverso lo strumento (Uvitec Cambridge Firereader max). Il resto del prodotto di PCR è stato purificato direttamente dalla soluzione di partenza.

b. Amplificazione del DNA plasmidico e virale per il Clonaggio Gibson

I frammenti sono stati amplificati dalla miniprep P32 (196.5 ng/ μ L), mentre il plasmide dalla miniprep pET22CPD (270.7 ng/ μ L) portata alla concentrazione finale di 2ng/ μ L. Per la reazione di PCR è stato usato l'enzima ThermoScientific™

Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). I primers per l'amplificazione del DNA plasmidico e dei frammenti di interesse sono stati disegnati, secondo protocollo Gibson, con una sovrapposizione di 20-40 basi rispetto al frammento adiacente. Le condizioni finali di reazione e di profilo di reattività per l'amplificazione del plasmide è riportata in Tabelle 10-13, per gli inserti in Tabelle 14-20. Il volume finale di ciascuna reazione è di 50µL.

Tabella 10: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32A (5941 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	28.5 µL	//
5X Phusion HF Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
pET22 GIB A R (10 µM) T _m = 75.8°C	2.5 µL	0.5 µM
pET22 GIB A F (10 µM) T _m = 66.5°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Plasmide	5 µL	//

Tabella 11: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	60°C	30''	
Estensione	72°C	5' 50''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

Tabella 12: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32B (6200 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
5X Phusion HF GC Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
pET22 GIB B R (10 µM T _m = 76.2°C)	2.5 µL	0.5 µM
pET22 GIB B F (10 µM) T _m = 64.1°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Acqua	28.5 µL	
Plasmide	5 µL	

Tabella 13: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	55°C	30''	
Estensione	72°C	3' 6''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

Il DNA plasmidico per P32A è stato amplificato seguendo il protocollo riportato in Tabella 10; il profilo di reazione è descritto in Tabella 11. Il plasmide per P32B è stato amplificato seguendo il protocollo in Tabella 12 ed il profilo di reazione della Tabella 13. Ogni mix di PCR è stata assemblata sotto cappa sterile a flusso verticale con filtri HEPA, utilizzata esclusivamente per le procedure di biologia molecolare, così da evitare cross-contaminazioni.

Tabella 14: Reazione di PCR per amplificare P32A in pET22b (507 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	31 µL	//
5X Phusion HF Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
P32A GIB R (10 Mm) Tm = 66.5°C	2.5 µL	0.5 µM
P32A GIB F (10 µM) Tm = 75.8°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Templato DNA	2.5 µL	//

Tabella 15: Reazione di PCR per amplificare P32B in pET22b (510 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
5X Phusion HF Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
P32B GIB F (10 µM) Tm = 64.1°C	2.5 µL	0.5 µM
P32B GIB R (10 µM) Tm = 76.2°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Acqua	31 µL	
Templato DNA	2.5 µL	

Tabella 16: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	60°C	30''	
Estensione	72°C	30''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

I frammenti P32A e P32B sono stati amplificati seguendo il protocollo riportato rispettivamente in Tabella 14 e 15; il profilo di reazione è descritto in Tabella 16.

Tabella 17: Protocollo di amplificazione dei plasmidi pET22 B1-B6 (6172-6177 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	28.5 µL	//
5X Phusion HF GC Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
pET22 GIB B (1-6) R (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM
pET22 GIB B1 F (10 µM) T _m = 71.6°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Plasmide	5 µL	//

*La differenza tra i sei protocolli di amplificazione è l'utilizzo del primer Reverse specifico a plasmide.

Tabella 18: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	62°C	30''	
Estensione	72°C	3'06''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

Tabella 19: Protocollo di amplificazione dei frammenti P32B1-P32B6 in pET22b (386, 566, 626, 686, 746 e 806 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	31 µL	//
5X Phusion HF Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each

P32B1 GIB R (10 Mm) Tm = 71.6°C	2.5 µL	0.5 µM
P32B (1-6) GIB F (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL
Templato DNA	2.5 µL	//

*La differenza tra i sei protocolli è l'utilizzo del primer Forward specifico a frammento.

Tabella 20: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	62°C	30''	
Estensione	72°C	20''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

*La differenza tra i sei protocolli è il tempo di estensione che arriva fino a 25'' per P32B5 e P32B6.

I plasmidi sono stati amplificati seguendo il protocollo riportato rispettivamente in Tabella 17; il profilo di reazione è descritto in Tabella 18. I frammenti P32B1-P32B6 sono stati amplificati rispettando il protocollo riportato in Tabella 10 ed il profilo termino in Tabella 20.

c. Amplificazione dei frammenti per il Clonaggio con enzimi di restrizione

I frammenti sono stati amplificati dalla miniprep P32 (196.5 ng/µL) portata alla concentrazione finale di 2ng/uL. Per la reazione di PCR è stato usato l'enzima ThermoScientific™ Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). Le condizioni finali di reazione e di profilo di reattività per l'amplificazione dell'inserito è riportata in Tabelle 21- 23. Il volume finale di ciascuna reazione è di 50µL.

Tabella 21: Volumi per l'amplificazione di P32A (490 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	31 µL	//
5X Phusion HF Buffer	10 µL	1X
Dntps	1 µL	200 µM each
P32A HYS F (10 µM) Tm = 65.6°C	2.5 µL	0.5 µM
P32A HYS R (10 µM) Tm = 69.1°C	2.5 µL	0.5 µM
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 µL	0.02 U/µL

Templato DNA	2.5 μ L	//
--------------	-------------	----

Tabella 22: Volumi per l'amplificazione di P32B (493 nt)

Reagente	Volume	Concentrazione finale
Acqua	31 μ L	//
5X Phusion HF Buffer	10 μ L	1X
Dntps	1 μ L	200 μ M each
P32B HYS F (10 μ M) Tm = 65.8°C	2.5 μ L	0.5 μ M
P32B HYS R (10 μ M) Tm = 67.2°C	2.5 μ L	0.5 μ M
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0.5 μ L	0.02 U/ μ L
Templato DNA	2.5 μ L	//

Tabella 23: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	1'	1
Denaturazione	98°C	10''	35
Annealing	60°C	25''	
Estensione	72°C	20''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

4. Purificazione da gel di agarosio

I frammenti amplificati e i plasmidi sono stati sottoposti al protocollo di purificazione da gel utilizzando il kit fornito dalla ditta Qiagen (Quick-Start Protocol MinuElute® Gel Extraction Kit). Il kit di purificazione del gel MinElute fornisce tamponi, colonne spin e provette di raccolta per la purificazione, basata su membrane di silice, di frammenti di DNA con una lunghezza compresa tra le 70 bp alle 4 kb a partire da fette di gel fino a 400 mg [48]. La membrana di silice, un sottile strato di ossido di silice che consta di una struttura di micropori della dimensione di 0.3nm, ha la capacità di consentire il passaggio attraverso i pori di piccole molecole come idrogeno e sali, trattenendo molecole più grandi come gli acidi nucleici [49].

Dopo aver pesato le Eppendorf 1.5 mL contenenti le fette di DNA, si aggiungono 3 volumi di Buffer QG per ogni volume di gel e si incuba per 10 minuti a 50°C per garantire la dissoluzione del gel. Al campione viene aggiunto un volume di isopropanolo pari al volume di gel per poi trasferire il contenuto in *MinElute spin column* dotate di membrana di silice. Si aggiungono 500 μ L di Buffer QG, si centrifuga per 1 minuto a 13000 rpm 4°C e si elimina lo scarto. Si ripete lo stesso

passaggio con 750 μ L di Buffer PE ed una centrifuga a vuoto fondamentale per eliminare l'eccesso di etanolo. La MinElute column viene posta in una Eppendorf 1.5 mL a cui aggiungere 10 μ L di Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). Il buffer EB è necessario per ricostruire l'involucro di acqua attorno all'acido nucleico ancora legato alla membrana, distaccandolo. Si incuba a RT per un minuto e si centrifuga per un altro minuto. A questo punto di DNA di interesse è eluito, concentrato e conservato a -20°C.

5. Quantificazione del DNA

Dopo aver purificato il DNA da gel si procede con la sua quantificazione che avviene avvalendosi dell'uso dello strumento NanoQuant Plate™ (Tecan). Con il NanoQuant si possono quantificare piccoli volumi di acidi nucleici la cui assorbanza viene misurata a 260 nm. Per assicurarsi della purezza del campione in esame viene eseguita un'ulteriore lettura a 280 nm per poter escludere la presenza di contaminanti proteici. Nel caso in cui gli acidi nucleici siano puri, il rapporto 260/280 deve essere compreso tra 1.8 e 1.9: rapporti minori di 1.8 potrebbero indicare la presenza di proteine o altri contaminanti, motivo per cui è raccomandato uno step di purificazione del campione additivo [50]. Dopo le misure del bianco e del campione, il software di Tecan i-control calcola rapidamente il contenuto di acidi nucleici e la purezza con il rapporto 260/280. In particolare, dopo aver misurato l'assorbanza, i-control ed Excel calcolano automaticamente la concentrazione degli acidi nucleici secondo la legge di Lambert-Beer $A = \epsilon * d * c$ (dove A = assorbanza, ϵ = coefficiente di assorbimento molare, d = cammino ottico, c = concentrazione). Le concentrazioni ottenute per ciascuna proteina/frammento proteico e ciascun plasmide amplificato è compresa nel range di 40-150 ng/ μ L.

6. Clonaggio Golden Gate

Come spiegato precedentemente, per il clonaggio con il metodo Golden Gate, il corretto disegno dei primer è fondamentale. Essi devono comprendere la sequenza del sito di restrizione riconosciuto dall'enzima BsaI e regioni complementari a quelle plasmidiche e della proteina. Nei primer non sono stati aggiunti né lo start codon né lo stop codon in quanto già presenti nel plasmide. Nella reazione di taglio/ligazione del Golden Gate Assembly, che avvengono in un unico step, sono stati utilizzati: il T4 Ligase Buffer (New England Biolabs Cat. No. B0202S); l'enzima T4 DNA Ligasi (New England Biolabs Cat. No. M0202T); l'enzima di restrizione BsaI ad alta affinità per il sito di taglio (New England Biolabs Cat. No. R3733S) e la BSA (Bovin Serum Albumin) 10X (20mg/mL) non acetilata usata 1X (New England Biolabs Cat. No. B9000S).

Il protocollo prevede l'incubazione dei reagenti da ligare in termociclatore a 37°C per 1h, 55°C per 5' e 4°C ∞ . Successivamente all'incubazione, i prodotti di ligazione devono essere conservati a -20°C. Per conoscere il volume di plasmide e frammento da utilizzare vengono presi in considerazione i calcoli in Tabella 24.

Tabella 24: Calcoli per il clonaggio Golden Gate

Rapporto tra le lunghezze: $\frac{nt\ plasmide}{nt\ frammento}$
Concentrazione del plasmide: 1 = 100ng: X μ L \rightarrow μ L di plasmide
100ng/Rapporto tra le lunghezze = ng di inserto
Ng di inserto/concentrazione inserto = μ L inserto

Tabella 25: Reazione per il clonaggio Golden Gate

Reagente	Volume (μ L)
Buffer T4	1.5
BSA 10X non acetilata	1.5
T4 Ligasi	1
BsaI	1
Plasmide pET22b (101.4 ng/ μ L)	1
Inserto P32 (39.7 ng/ μ L)	1.7
Acqua	7.3

7. Clonaggio Gibson plasmide-inserto

Il metodo di clonaggio Gibson è stato scelto perché il “multiple cloning site” del plasmide pET22b mette a disposizione pochi enzimi di restrizione. Anche per il Gibson Assembly è stato fondamentale disegnare correttamente i primer per ottenere le regioni di sovrapposizione tra il frammento genico da clonare ed il plasmide pET22b. Conoscendo la concentrazione e la lunghezza attesa di ciascun reagente, si è proceduto con il protocollo di clonaggio a partire dal *Gibson Assembly® Cloning Kit* (New England Biolabs® Inc. E5510S). Il kit, che comprende cellule competenti NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency), garantisce l’assemblaggio e trasformazione dei batteri in meno di due ore, con un’efficienza di trasformazione elevata per inserti con più di 20 kb. La Master Mix Gibson Assembly 2X include i tre enzimi necessari al clonaggio: esonucleasi, DNA polimerasi e DNA ligasi.

Il protocollo prevede l’incubazione dei reagenti da ligare in termociclatore a 50°C per 15 minuti. Successivamente all’incubazione, i prodotti di ligazione devono essere conservati a -20°C. Per conoscere il volume di plasmide e frammento da utilizzare vengono presi in considerazione i calcoli in Tabella 27. Il volume di ciascuna reazione era di 20 μ L.

Tabella 26: Concentrazione dei frammenti e plasmidi per il clonaggio Gibson

Nome frammento	Concentrazione (ng/μL)	Plasmide	Concentrazione (ng/μL)
P32A	131	pET22b	70.8
P32B	39.9	pET22b	203.5
P32B1	118.5	pET22b	29.6
P32B2	98.9	pET22b	55.8
P32B3	35	pET22b	47.7
P32B4	47	pET22b	33.1
P32B5	38.1	pET22b	57.8
P32B6	87.1	pET22b	35.2

Tabella 27: Calcoli per il clonaggio Gibson

<p>Rapporto tra le lunghezze: $\frac{nt\ plasmide}{nt\ frammento}$</p> <p>$\frac{50\ ng}{Rapporto\ tra\ le\ lunghezze}$ = ng di inserto. Il metodo Gibson richiede di triplicare i ng di frammento.</p> <p>$\frac{ng\ di\ inserto\ triplicati}{Concentrazione\ frammento}$ = μL di inserto. Se il volume è troppo basso diluire 1:10.</p> <p>$\frac{50\ ng}{Concentrazione\ plasmide}$ = μL di plasmide</p>

Tabella 28: Reazioni per il clonaggio in pET22b dei diversi frammenti della P32 attraverso il metodo Gibson. I volumi sono stati determinati in base ai calcoli sopra descritti

Nome inserto	Ng di inserto	Volume inserto	Volume Plasmide	Volume Master Mix 2X	Acqua
P32A	4.10 ng	0.94 μL	0.7 μL	10 μL	8.36 μL
P32B	4.13 ng	3.10 μL	2.46 μL	10 μL	4.44 μL
P32B1	3.10 ng	0.79 μL	1.69 μL	10 μL	7.52 μL
P32B2	4.58 ng	1.39 μL	0.89 μL	10 μL	7.72 μL
P32B3	5.07 ng	4.34 μL	1.04 μL	10 μL	4.62 μL
P32B4	5.55 ng	3.50 μL	1.51 μL	10 μL	4.99 μL
P32B5	6.04 ng	4.76 μL	0.86 μL	10 μL	4.38 μL
P32B6	6.52 ng	2.24 μL	1.42 μL	10 μL	6.34 μL

8. Clonaggio con enzimi di restrizione

a. Digestione dei frammenti e del plasmide

Il protocollo di clonaggio classico prevede il taglio dei frammenti da clonare ed il plasmide con gli stessi enzimi di restrizione al fine di formare delle estremità compatibili che si ligano nella successiva fase. Il plasmide, oltre ad esser tagliato,

necessita di un passaggio di defosforilazione per evitare che alcune sequenze parzialmente digerite si auto-lighino, evitando la presenza del plasmide self-ligato. Per digerire il plasmide e i frammenti sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione Anza™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) e per defosforilare pET45b la fosfatasi alcalina Anza™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific. Cat. No. IVGN2208), seguendo il protocollo One-Step. Il plasmide vuoto ha una concentrazione pari a 297 ng/μL che deve essere portata tra 0.2 e 1 μg/μL. Tutti i reagenti elencati in Tabelle 31 vengono messi in termociclatore il seguente profilo: 37°C per 30' seguiti da 80°C per 20'.

Tabella 29: Reazione per la digestione del plasmide pET45b (5212 nt)

Reagente	Volume
Acqua nucleasi-free	12 μL
DNA plasmidico	3 μL
Anza™ 10X Buffer o Anza 10X Red Buffer	2 μL
Anza™ Enzima di restrizione KpnI	1 μL
Anza™ Enzima di restrizione SacI	1 μL
Anza™ Fosfatasi alcalina	1 μL

Tabella 30: Reazione per la digestione di P32A in pET45b (490 nt)

Reagente	Volume
Acqua nucleasi-free	12.25 μL
P32A (0.16 μg/μL)	3.75 μL
Anza™ 10X Buffer o Anza 10X Red Buffer	2 μL
Anza™ Enzima di restrizione KpnI	1 μL
Anza™ Enzima di restrizione SacI	1 μL

Tabella 31: Reazione per la digestione di P32B in pET45b (490 nt)

Reagente	Volume
Acqua nucleasi-free	10.55 μL
P32B (0.11 μg/μL)	5.45 μL
Anza™ 10X Buffer o Anza 10X Red Buffer	2 μL
Anza™ Enzima di restrizione KpnI	1 μL
Anza™ Enzima di restrizione SacI	1 μL

b. Ligazione dei frammenti e del plasmide

La ligazione dei frammenti nel plasmide pET45b, preceduta dalla purificazione degli inserti e del plasmide, è stata effettuata successivamente al taglio mediato dagli enzimi di restrizione utilizzando l'Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). È stato calcolato il volume di ciascun

frammento per la reazione di ligazione seguendo la Tabella 32. Il volume finale della reazione è 20µL. Dopo aver mischiato i reagenti, come suggerito dal protocollo di Ligazione fornito dalla ditta, le provette vengono incubate a temperatura ambiente per 30 minuti.

Tabella 32: Calcoli per la ligazione plasmide-inserito

$\frac{\text{Rapporto tra le lunghezze: } \frac{nt \text{ plasmide}}{nt \text{ frammento}}}{50 \text{ ng}} = \text{ng di inserto in rapporto inserto-plasmide } 1:1.$ <p>La ligazione prevede un rapporto inserto-plasmide 1:3.</p> $\frac{ng \text{ di inserto}}{\text{Concentrazione frammento}} = \mu\text{L di frammento. Se il volume è troppo basso diluire } 1:10.$ $\frac{50 \text{ ng}}{\text{Concentrazione plasmide}} = \mu\text{L di plasmide}$

Tabella 33: Volumi per la ligazione di P32A e P32B in pET45b

Reagente	Volume
pET45 (33.9 ng/µL)	1.5 µL
P32A (36.9 ng/µL) / P32B (32.4 ng/µL)	0.4 µL
T4 Ligasi Buffer Master Mix	5 µL
Acqua	13.1 µL

9. Trasformazione dei batteri

La trasformazione batterica è un metodo utilizzato in biologia molecolare al fine di introdurre materiale genetico in cellule batteriche. Sia i batteri NEB 5α (*Gibson Assembly® Cloning Kit*) che i batteri “One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. Coli” (ThermoFisher Scientific Cat. No. C404010) che E. Coli BL21(DE3) (ThermoFisher Scientific) sono chimicamente competenti, quindi con lo stesso protocollo di trasformazione. Dal congelatore a -80°C dove vengono stoccati sono stati recuperati il numero necessario di criotubi contenenti 50µL di batteri chimicamente competenti. Sia i criotubi che lo stock del campione ottenuto dalla doppia ligazione precedente sono stati mantenuti in ghiaccio per tutta la durata della procedura. Sono stati aggiunti direttamente in provetta 5 µL (2 nel caso di NEB 5α) di soluzione di ligazione, scuotendo leggermente 4-5 volte. Le cellule, dopo essere state incubate in ghiaccio per 30 minuti, sono state sottoposte a shock termico alternando 30 secondi a 42°C con 2 minuti in ghiaccio. Sono stati aggiunti poi 950 µL di terreno NEB SOC Outgrowth (2% Vegetable Peptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) direttamente nelle provette per poi riporle in un incubatore a 37°C in agitazione per un’ora. Nel caso di TOP10CC, invece, devono essere aggiunti 250µL di terreno SOC prima dell’incubazione. Le cellule sono state poi piastrate in piastre Petri con

terreno LB Agar e Ampicillina 1/1000 (1 μ L/mL) [51] e lasciate a 37°C ON per permettere ai cloni batteri trasformati con il plasmide d'interesse di crescere.

10. Colony PCR

Attraverso la Colony PCR abbiamo verificato in quali cloni batterici ottenuti dopo trasformazione era presente il plasmide con incluso il gene di interesse. Si tratta di una procedura di screening che include un protocollo di PCR che si esegue sui batteri stemperati in acqua sterile. L'enzima utilizzato nella tecnica della Colony PCR è la GoTaq® DNA polymerase (Promega Cat. No. M784B) commercializzato insieme a 5X Green GoTaq® Reaction Buffer e 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer. Il 5X Green GoTaq® Reaction Buffer contiene due coloranti (blu e giallo) che si separando durante l'elettroforesi per indicare il processo di migrazione e Magnesio 7.5 mM.

In breve: le singole colonie presenti sulle piastre dopo transfezione ed incubazione overnight sono state selezionate ed evidenziate con l'aiuto di un pennarello. Attraverso l'uso di uno stuzzicadenti sterile, ciascuna colonia selezionata è stata raccolta e replicata su una piastra di LB agar con ampicillina denominata "master plate", suddivisa, attraverso il disegno con un pennarello di una griglia, in quadratini numerati che danno il nome al clone batterico (Fig. 18). Dopo aver replicato la colonia sulla master plate, lo stuzzicadenti è stato stemperato in eppendorf contenente 100 μ L di acqua MilliQ sterile; la eppendorf è numerata coerentemente al quadratino della griglia sulla master-plate. Una volta terminata la raccolta delle colonie, la master-plate è stata lasciata in incubatore overnight a 37°C per favorire la crescita delle colonie e poi riposta a 4°C per essere conservata. Da ciascuna eppendorf sono stati prelevati 5 μ L di soluzione sui quali è stata eseguita una PCR. Il volume finale di ciascuna reazione è di 25 μ L.

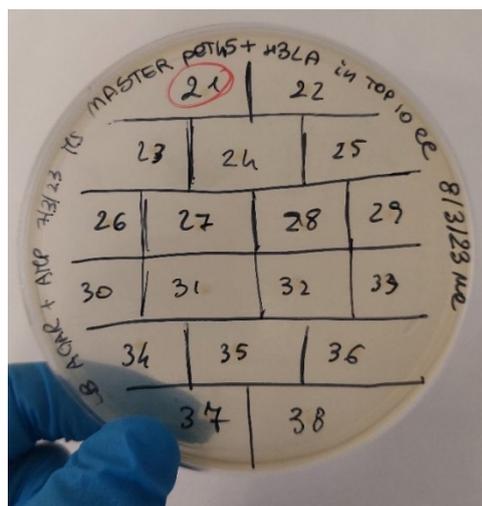


Figura 18: Suddivisione in griglie della Master plate contenente TOP10CC ricombinanti con il plasmide incorporato

Per la PCR sono stati utilizzati due diverse strategie: entrambi i primer appaiati al plasmide ed un primer reverse presente sul plasmide e uno forward presente su ciascun frammento di interesse, come mostrato in Tabella 34.

Tabella 34: Primer utilizzati per la Colony PCR

Nome del primer	Sequenza del primer	Sequenza che lega	Temperatura di Melting
T7 FOR	TTAATACGACTCACTATAGG G	pET22b	50.9°C
P22 CPD R	CACCAAACGTAGCTTTCCAT CCAG	pET22b	70.8°C
P32A 1F	GCAGATATTCCATTATATG	P32A	49.2°C
P32B 1F	ATTGTTGTTATAGAAGATGA T	P32B	49.4°C
Seq pET45 1R	AGTGATAACACTGCGGCCAA	pET45b	59°C
T7R	ACCGCTGAGCAATAACTAG	pET22b	57.1°C
P32B1 GIB F	GAAGGAGATATACATATGA ATTCTAGAATATTGTTCAAT C	P32B1	66.9°C
P32B2 GIB F	GAAGGAGATATACATATGC ACTTTAGTTTATGGAAATC	P32B2	68.2°C
P32B3 GIB F	GAAGGAGATATACATATGTA TTTTTCTGGATTATG	P32B3	64.9°C
P32B4 GIB F	GAAGGAGATATACATATGTA TAAGTTCCTTATATGGGA	P32B4	66.5°C
P32B5 GIB F	GAAGGAGATATACATATGG ATTTTAAAATTCAGATGT	P32B5	67.8°C
P32B6 GIB F	GAAGGAGATATACATATGGT AGTTCCAGAATTA AAAAG	P32B6	67.6°C
P32B1 GIB R	GCTAATGCGTCTGACTGGATG GGATATATAGT	Tra P32B1 e CPD	71.6°C

La reazione è stata eseguita come riportato nelle Tabelle seguenti.

Tabella 35: Reazione di Colony-PCR per valutare il clonaggio di P32 in pET22b (1189 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	5 µL
GoTaq GII	0.125 µL
Dntps	0.5 µL
T7F (T _m = 50.9°C)	1.25 µL
P22 CPD R (T _m = 70.8°C)	1.25 µL
Acqua	11.875 µL

Tabella 36: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	2'	1
Denaturazione	95°C	1'	35
Annealing	55°C	1'	
Estensione	72°C	1'30''	
Estensione finale	72°C	5'	1
Mantenimento	4°C	∞	

La sequenza da amplificare includeva la regione extra-virione della proteina P32 (828 nt) e la somma dei due primers utilizzati (270 + 91 = 361 nt) per un totale di 1189 nt.

Tabella 37: Reazione di Colony-PCR valutare il clonaggio di P32A in pET22b (1204 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 µL
GoTaq GII	1.5 µL
Dntps	6 µL
P32A 1F (T _m = 49.2°C)	15 µL
T7 R (T _m = 57.1°C)	15 µL
Acqua	142.5 µL

Tabella 38: Reazione di Colony CPR per valutare il clonaggio di P32B in pET22b (1207 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 µL
GoTaq GII	1.5 µL
Dntps	6 µL
P32B 1 F (T _m = 49.4°C)	15 µL
T7 R (T _m = 57.1°C)	15 µL
Acqua	142.5 µL

Tabella 39: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	2'	1
Denaturazione	95°C	1'	35
Annealing	50°C	1'	
Estensione	72°C	1' 20''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

La sequenza da amplificare includeva il CPD (645 nt), P32A ed P32B (rispettivamente 471 nt e 474 nt) e la porzione compresa tra la fine del CPD e il primer R (88 nt) per un totale rispettivamente di 1204 nt e 1207 nt.

Tabella 40: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B1 in pET22b (386 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 μ L
GoTaq GII	1.5 μ L
Dntps	6 μ L
P32B1 GIB F ($T_m = 66.9^\circ\text{C}$)	15 μ L
P32B1 GIB R ($T_m = 71.6^\circ\text{C}$)	15 μ L
Acqua	142.5 μ L

Tabella 41: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B2 in pET22b (566 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 μ L
GoTaq GII	1.5 μ L
Dntps	6 μ L
P32B1 GIB R ($T_m = 71.6^\circ\text{C}$)	15 μ L
P32B2 GIB F ($T_m = 68.2^\circ\text{C}$)	15 μ L
Acqua	142.5 μ L

Tabella 42: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B3 in pET22b (626 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 μ L
GoTaq GII	1.5 μ L
Dntps	6 μ L
P32B1 GIB R ($T_m = 71.6^\circ\text{C}$)	15 μ L
P32B3 GIB F ($T_m = 64.9^\circ\text{C}$)	15 μ L
Acqua	142.5 μ L

Tabella 43: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B4 in pET22b (686 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 μ L
GoTaq GII	1.5 μ L
Dntps	6 μ L
P32B4 GIB F ($T_m = 66.5^\circ\text{C}$)	15 μ L
P32B1 GIB R ($T_m = 71.6^\circ\text{C}$)	15 μ L
Acqua	142.5 μ L

Tabella 44: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B5 in pET22b (746 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 µL
GoTaq GII	1.5 µL
Dntps	6 µL
P32B1 GIB R (T _m = 71.6°C)	15 µL
P32B5 GIB F (T _m = 67.8°C)	15 µL
Acqua	142.5 µL

Tabella 45: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B6 in pET22b (806 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 µL
GoTaq GII	1.5 µL
Dntps	6 µL
P32B6 GIB F (T _m = 67.6 °C)	15 µL
P32B1 GIB R (T _m = 71.6°C)	15 µL
Acqua	142.5 µL

Tabella 46: Profilo termico della reazione di amplificazione

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	2	1
Denaturazione	95°C	1'	35
Annealing	62°C	1'	
Estensione	72°C	25''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

*La differenza tra i sei profili termici consta nella Temperatura di Annealing, che va da 60°C a 62°C, e nel tempo di estensione, che va da 25' a 50', in base alla lunghezza del frammento soggetto ad amplificazione.

La sequenza dei frammenti da P32B1 a P32B6 da amplificare era compresa tra 386 nt e 806 nt.

Tabella 47: Colony PCR per valutare del clonaggio di P32A in pET45b (1764 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 µL
GoTaq GII	1.5 µL
Dntps	6 µL
P32A 1F (T _m = 49.2°C)	15 µL
Seq. pET45 1 R (T _m = 59°C)	15 µL
Acqua	142.5 µL

Tabella 48: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B in pET45b (1767 nt)

Reagente	Volume
Buffer 5X Green	60 μ L
GoTaq GII	1.5 μ L
Dntps	6 μ L
P32B 1 F ($T_m = 49.4^\circ\text{C}$)	15 μ L
Seq. pET45 1R ($T_m = 59^\circ\text{C}$)	15 μ L
Acqua	142.5 μ L

Tabella 49: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening

Step	Temp.	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	2'	1
Denaturazione	95°C	1'	35
Annealing	50°C	1'	
Estensione	72°C	1' 50''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Mantenimento	4°C	∞	

La sequenza da amplificare includeva il frammento P32A e P32B (rispettivamente 474 nt e 477 nt) ed il plasmide pET45b (1290 nt) per un totale rispettivamente di 1764 nt e 1767 nt.

11. Miniprep e midiprep

La mini-preparazione di DNA plasmidico, detta anche miniprep, è una tecnica di biologia molecolare sfruttata in laboratorio per estrarre, tramite lisi alcalina, il DNA plasmidico dalle cellule batteriche. Oltre alla Mini-prep esistono la Midi (Plasmid MIDI kit (Quiagen® Cat. No. 12145)), la Maxi, la Mega e la Giga-prep, che si differenziano esclusivamente per il volume di coltura batterica di partenza e di conseguenza della quantità di plasmide che si ottiene. Il metodo classico di lisi alcalina prevede l'uso di diverse soluzioni che permettono di lisare le cellule batteriche, eliminare il DNA genomico ed ottenere il DNA plasmidico purificato da sottoporre ad ulteriori analisi.

In questo studio al posto del metodo classico di laboratorio è stato usato il kit commerciale GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific™ Cat. No. K0503) che si basa sul principio della lisi alcalina ma che per la purificazione del plasmide si avvale dell'uso di colonnine ad affinità costituite di membrane di silice.

Il protocollo è organizzato in due giorni differenti. Le colonie positive alla Colony PCR e cresciute sulla master plate sono fatte crescere over-night in terreno selettivo LB (mL) con ampicillina 1/1000 a 37°C, in quanto i plasmidi in studio portano la resistenza a tale antibiotico. Il prelievo della colonia dalla master-plate avviene

attraverso uno stuzzicadenti sterile posto successivamente in una provetta (falcon 15mL) contenente il terreno di crescita addizionato con antibiotico. La mattina seguente, la coltura batterica è sottoposta centrifugazione a 6000 rpm per 5 minuti. Il surnatante ottenuto viene eliminato, mentre il pellet batterico risospeso in 250 μ L di Resuspension Solution precedentemente posto in frigo a 4°C. Dopo aver trasferito la soluzione in eppendorf da 2 mL, sono stati aggiunti 250 μ L di Lysis Solution per lisare la parete batterica. Non si deve lasciare il buffer a contatto con il campione per più di 5' onde evitare la degradazione del materiale di interesse. Dopo l'inversione 4-6 volte della eppendorf, sono stati aggiunti 350 μ L di Neutralization Solution al campione che poi è stato nuovamente invertito 4-6 volte prima di attendere 5' di incubazione. A questo punto, la sospensione lattiginosa formatasi è stata centrifugata a 13000 rpm per altri 5'. Dopo la centrifuga, 600 μ L di surnatante ottenuto sono stati trasferiti in colonnine d'affinità incluse nel kit e caratterizzate da una membrana di ossido di silicio con alta affinità per gli acidi nucleici. Le colonnine sono state poi centrifugate a 12000 rpm per 1'; l'eluato ottenuto è stato buttato. Come da istruzione del kit, le colonnine sono state sottoposte a due centrifughe a 12000 rpm: la prima per 1 minuti dopo l'aggiunta di 500 μ L di Wash Solution, la seconda a secco per 2 minuti. Trasferita la colonnina in una provetta da 1,5 mL, a questa sono stati aggiunti 50 μ L di Elution Buffer e la colonnina è stata sottoposta ad un'ulteriore centrifuga a 12000 rpm per 2'.

Tra la miniprep e la midiprep le differenze sono: l'equilibrare le colonne con buffer QBT, l'utilizzo di una garza per filtrare il surnatante contenente il DNA plasmidico e di acqua per l'eluizione del DNA plasmidico, per l'ottenimento della MIDI.

Al termine del procedimento, il plasmide eluito è stato quantificato utilizzando il NanoQuant Infinite M200 Pro (Tecan). La concentrazione di tutte le MINI ottenute era nel range di 50-130 ng/ μ L, mentre quella delle MIDI di 100-400 ng/ μ L. Una volta appurata una buona concentrazione della soluzione preparate, le MINI sono state sequenziate con metodo Sanger, utilizzando lo strumento 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Il sequenziamento ha permesso di confermare la presenza del gene d'interesse nei cloni plasimidici e a controllare l'assenza di mutazioni.

12. Sequenziamento

Per il sequenziamento è stato utilizzato il metodo Sanger attraverso lo strumento Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Il metodo Sanger classico prevede la suddivisione del campione di DNA in quattro separate reazioni di sequenziamento che comprendono l'enzima della DNA polimerasi, il template di DNA, il primer e tutti e quattro i deossinucleotidi (dTTP, dATP, dGTP e dCTP). Ad ogni reazione viene aggiunto uno solo dei quattro dideossinucleotidi (ddTTP, ddATP, ddGTP e ddCTP) privi di OH in posizione 3' la cui concentrazione è 100 volte minore rispetto al deossinucleotide corrispondente. Nel momento in cui il monomero viene aggiunto alla catena di DNA nascente da parte della DNA polimerasi ad alta processività, l'impossibilità della formazione del legame

fosfodiesterico porta all'interruzione dell'allungamento della catena. Questo favorisce la formazione di frammenti di DNA con lunghezze diverse terminanti ciascuno con il dideossinucleotide marcato che poi vengono analizzati su gel di acrilammide. Nei moderni strumenti di sequenziamento, dotati di lettori laser o LCD, i dideossinucleotidi sono marcati con fluorofori che emettono a diversa lunghezza d'onda, a seconda della base, per questo non è più necessario amplificare il campione in quattro diverse reazioni; i differenti frammenti di DNA vengono separati per elettroforesi capillare contestualmente alla lettura della fluorescenza emessa dagli stessi.

I primers utilizzati per il sequenziamento hanno come sequenza target le regioni fiancheggiatrici o interne al gene d'interesse e quelle presenti sul plasmide.

Tabella 50: Sequenza dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32 in pET22b

Nome del primer	Sequenza	Temperatura di Melting
T7F	TTAATACGACTCACTATAGGG	50.9°C
CPD Hys F	CTGGCCGTAGACGAGGCGGGAC	65.7°C
CPD R2	GGCCCGATTACGGTTACACC	57.9°C

Tabella 51: Sequenze dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32A e P32B in pET45b

Nome del primer	Sequenza	Temperatura di Melting
P32A 1 F	GCAGATATTCCATTATATG	49.2°C
P32A 1 R	CTAACTATTATGAAAAG	37.7°C
P32B 1 F	ATTGTTGTTATAGAAGATGAT	49.4°C
P32B 1 R	CTATGGATGGGATATATAGT	49.5°C
Seq pET45 F7	ATTGACTCTCTTCCGGGCGCTA	69.9°C
Seq pET45 R7	ACTCCAACGTCAAAGGGCGA	69°C

Tabella 52: Sequenze dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32A e P32B in pET22b

Nome del primer	Sequenza	Temperatura di Melting
P32A GIB F	GAAGGAGATATACATATGGCAGATATTC CATTATA	66.5°C
P32A GIB R	ATCCGCTAATGCGTCGACACTATTATGAA AAGTTTCA	75.8°C
pET22 GIB A F	TGAAACTTTTCATAATAGTGTCGACGCAT TAGCGGAT	75.8°C
CPD Hys F	CTGGCCGTAGACGAGGCGGGAC	65.7°C
P22 CPD R	CACCAAACGTAGCTTTCATCCAG	70.8°C
T7R	ACCGCTGAGCAATAACTAG	57.1°C
T7F	TTAATACGACTCACTATAGGG	50.9°C

P32B 1 F	ATTGTTGTTATAGAAGATGAT	49.4°C
P32B 1 R	CTATGGATGGGATATATAGT	49.5°C

Tabella 53: Sequenze dei primers per il sequenziamento di P32B1-P32B6 in pET22b

Nome del primer	Sequenza	Temperatura di Melting
T7R	ACCGCTGAGCAATAACTAG	57.1°C
T7F	TTAATACGACTCACTATAGGG	50.9°C
P32B1F	ATTGTTGTTATAGAAGATGAT	49.4°C
P32B1 GIB R	GCTAATGCGTCGACTGGATGGGATATATAGT	71.6°C
P22CPD R	CACCAAACGTAGCTTTCCATCCAG	70.8°C

13. Preparazione dei glicerinati batterici

Per conservare i batteri contenenti il plasmide d'interesse, parte dalla coltura overnight può essere lasciata da parte e suddivisa in aliquote alle quali si aggiunge il glicerolo sterile al 100% per poi conservarle a -80°C. In Breve: si preparano criotubi da 2mL contenenti, in rapporto 1:1, materiale batterico e glicerolo sterile 100%. Il glicerolo ha il compito di proteggere i batteri dal gelo-scongelo. Per facilitare il prelievo del glicerolo, altamente denso, si taglia la punta del puntale con forbici sterilizzate su fiamma viva. Risospesa la soluzione per agitazione, i criotubi, lasciati in ghiaccio secco per tutta l'operazione, vengono congelati a -80°C.

14. Espressione delle proteine

a. Trasformazione dei batteri BL21 (DE3)

Il plasmide prodotto nelle fasi precedenti è stato utilizzato per l'espressione delle proteine in batteri E. Coli denominati BL21 (DE3) (ThermoFisher Scientific). Le cellule BL21 (DE3) sono ingegnerizzate per produrre la RNA polimerasi del fago T7 che presenta una processività 10 volte più elevata della convenzionale RNA Pol. La T7 RNA Pol. riconosce con estrema rapidità, efficacia ed affinità il gene 10, ovvero il primo gene trascritto durante l'infezione fagica, codificante per una proteina costituente del capsido. Nel genoma di E. Coli BL21 la RNA polimerasi T7 è sotto il controllo di un promotore inducibile (tac) che si attiva in presenza di lattosio/IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside), mentre il gene di interesse viene clonato a valle del promotore del gene 10 di T7.

La procedura di trasformazione batterica è simile a quella già descritta precedentemente nelle fasi di clonaggio, i batteri BL21 (DE3) sono infatti chimicamente competenti. Il protocollo di trasformazione ha previsto l'aggiunta di 5 μ L (1pg-100 ng) di DNA plasmidico (MIDI) direttamente nei batteri, mixando

dolcemente. Dopo aver incubato le cellule competenti in ghiaccio per 30 minuti, si procede con lo shock termico: 10'' a 42°C seguiti da 5' in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti 950 µL di terreno S.O.C. Outgrowth e lasciato i batteri ad incubare in agitazione (250 rpm) a 37°C per 1 ora. Sono state poi preparate delle diluizioni 1:10 con terreno S.O.C. Outgrowth ed addizionati 50-100 µL di ciascuna diluizione in piastre Petri. Le cellule sono lasciate in incubazione ON a 37°C.

b. Time Course di espressione

Il time Course di espressione viene eseguito per valutare come e quando le proteine di interesse sono espresse dai batteri trasformati. È stata preparata una falcon da 50mL sotto cappa sterile a flusso laminare contenente al suo interno 3mL di terreno LB e ampicillina 1/1000 (3µL). Con l'ausilio di uno stuzzicadenti sterile una singola colonia è stata prelevata, operazione che va fatta in condizioni di sterilità mantenendo il Becco Bunsen acceso. La colonia è stata, quindi, stemperata nel terreno di crescita e lasciata ON ad incubare in agitazione a 37°C.

La mattina seguente, dopo essersi accertati della torbidità della soluzione e quindi dell'avvenuta crescita batterica, si è proceduto sotto cappa sterile alla preparazione di 100 mL di terreno con ampicillina in beute da 500mL (una per ciascun clone che si vuole esprimere), per effettuare un inoculo con la coltura cresciuta tutta notte. L'uso di una beuta 500mL è utile a mantenere un rapporto volume-ossigeno ottimale di 1/5 alla crescita batterica. Il terreno nuovo è stato lasciato a temperatura ambiente o scaldato a 37°C per evitare di far subire uno shock termico ai batteri e quindi di rallentarli. Raggiunta la temperatura idonea è stato possibile procedere con l'inoculo: sono stati trasferiti 5mL di pre-inoculo overnight nelle beute che poi sono state lasciate in agitazione a 37°C per un'ora. La crescita batterica è stata monitorata ogni 30 minuti allo spettrofotometro (DU®730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer Beckman Coulter) leggendo la densità ottica alla lunghezza d'onda di 600nm. Ad ogni lettura è stato sottratto il bianco (LB). Quando l'OD ha raggiunto il valore di 0.5/0.6, che corrisponde alla densità batterica in fase esponenziale di crescita, si è proceduto con l'induzione della cultura, cioè ad indurre l'espressione della T7-RNA polimerasi da parte dei batteri. L'enzima procederà con la trascrizione del gene di interesse sul plasmide posto a valle del promotore specifico. Per l'induzione è stato utilizzato l'IPTG (250 µL) (Cat. No. 70527) alla concentrazione 1M diluito 1/1000. La coltura batterica è stata lasciata in incubazione a 37°C in agitazione per altre 3-4 ore per dare ai batteri il tempo di produrre le proteine ricombinanti d'interesse.

Prima dell'induzione e ad ogni ora successiva, è stato raccolto 1mL di cultura batterica; le provette sono state siglate da T0 a T4 corrispondenti all'ora zero l'induzione e alle ore (fino a quattro) post-induzione. Ciascun prelievo è stato processato così da verificare e monitorare le tempistiche e le concentrazioni di espressione della proteina. Ogni provetta è stata centrifugata a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C per poi eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 30µL di Buffer B Urea 8M pH 8 (Ricetta 6) allo scopo di denaturare le proteine ed estrarre dai

batteri tutto ciò che è stato prodotto. È stata condotta un'ultima centrifuga a 13000 rpm per 15 minuti per recuperare il surnatante e conservarlo a -20°C. Dopo le quattro ore dall'induzione, l'intera cultura è stata centrifugata per 15 minuti a 4000 rpm a 4°C ed il pellet è stato conservato a -80°C.

c. Estrazione delle proteine dai batteri

Sono stati utilizzati due tipi di tamponi corrispondenti a due tipologie di condizioni: native o denaturanti; questo per valutare in che condizioni la proteina fosse solubile. Il pellet batterico è stato trattato inizialmente con 5mL di Lysis Buffer freddo; la composizione di questo buffer è salina (Ricetta 5), non contiene sostanze denaturanti e riproduce le condizioni di ambiente nativo per la proteina. Il buffer è stato addizionato con inibitori delle proteasi in forma di pastiglie pronto uso (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, ThermoFisher Scientific Cat. No. A32955) per inibire la degradazione delle proteine di interesse ad opera delle proteasi presenti nei batteri.

La lisi delle cellule batteriche per ottenere la proteina in forma non denaturata è stata ottenuta meccanicamente tramite il passaggio di gelo-scongelo: il campione è stato riposto a -80°C per 20' e scongelato in bagnetto 65°C per 5'. Il pellet è stato sonicato (MSE Ultrasonic homogenizer Soniprep 150) per un totale di cinque cicli consistenti in cinque sonicazioni di 30'' a 14-16 kHz alternati da 10'' di pausa, in ghiaccio. Al termine del procedimento, il pellet è stato centrifugato a 13000 rpm per 20' a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e denominato "Nativa I"; l'intero protocollo è stato ripetuto per tre volte fino ad ottenere "Nativa III". Al termine del terzo ciclo di estrazione in condizioni native, il pellet è stato trattato con un buffer denaturante: è stato risospeso in 5mL di Buffer B Urea 8M (pH 8) (Ricetta 6). Come per l'estrazione della proteina in forma nativa, il pellet è stato sottoposto a gelo-scongelo e cinque cicli di sonicazione al termine dei quali è stato centrifugato per 20' a 13000 rpm a 4°C. Per l'estrazione dei frammenti proteici di interesse sono stati eseguiti due cicli di processamento del pellet in condizione denaturante.

15. SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è una tecnica molecolare che permette la separazione di proteine. Il metodo si basa sull'uso del detergente SDS (sodio dodecil solfato) in grado di interagire con le proteine denaturandole; quindi, la separazione su gel di poliacrilamide si basa solo sul peso molecolare di ciascuna. L'SDS-PAGE si avvale dell'uso di un gel basato su un primo *stacking gel*, in cui vengono depositati e concentrati i campioni nei rispettivi pozzetti, e un *running gel*, matrice in cui avviene la corsa e separazione proteica verso l'anodo.

A seconda dei pesi molecolari attesi sono stati utilizzati due tipi di gel diversi che richiedono l'uso di reagenti e marcatori diversi (Fig. 19 e Fig. 20), ma una procedura simile.

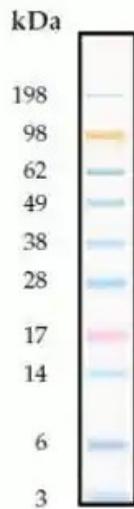


Figura 19: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard su NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel e MES SDS Running Buffer. Marcatore utilizzato con il pre-casting Novex™ al 10-20% Tricine gel

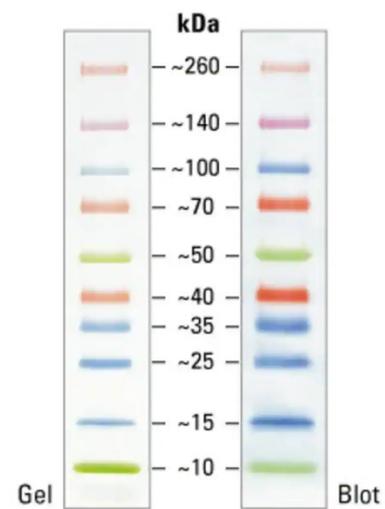


Figura 20: SDS-PAGE band profile of the Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. Marcatore utilizzato con il NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel

Tabella 54: Descrizione delle proteine/frammenti proteici ricombinanti che sono stati caricati su gel per SDS-PAGE

Nome	Peso molecolare atteso	Gel utilizzato
P32 nativa	55 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32 denaturata	55 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32A pET45	19.51 kDa	Novex™ al 10-20% Tricine gel
P32B pET45	20.02 kDa	Novex™ al 10-20% Tricine gel
P32A pET22	42.49 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B pET22	43 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B1 pET22	38.11 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B2 pET22	45.24 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B3 pET22	47.39 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B4 pET22	49.77 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
P32B5 pET22	52.15 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel

P32B6 pET22	54.47 kDa	NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel
-------------	-----------	----------------------------

Sia i campioni T0-T4 del time course che quelli derivati dall'estrazione della proteina, nella forma non denaturata e denaturata, sono stati caricati su un unico gel per valutare l'espressione della proteina e la sua solubilità. Nello studio è stato usato il gel pre-casting commerciale Novex™ al 10-20% Tricine Gel (Invitrogen™) per la separazione di proteine/frammenti proteici a basso peso molecolare. A un totale di 4 µL di campione sono stati aggiunti 5 µL di *Tricine SDS Sample Buffer 2X* (ThermoFisher Scientific) e 1 µL di *NuPAGE® Reducing Agent 10X* (ThermoFisher Scientific), incubati per 2 minuti a 85°C. Il gel di Tricina è stato riposto nell'apposito *XCell SureLock™ Mini-Cell Gel Running tank* (ThermoFisher Scientific), riempito di 1X *Tricine SDS Running Buffer* (900 mL MilliQ, 100 mL 10X *Tricine SDS Running Buffer*), ed i campioni (10 µL) caricati nei rispettivi pozzetti. Il marker che è stato utilizzato è il *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard* (Cat. No. LC5925) (Fig. 19). Per fare correre i campioni è stato applicato un voltaggio di 125V.

Nel caso di proteine/frammenti proteici a pesi molecolari maggiori di 35kDa è stato usato anche il NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific), un gel di poliacrilamide a pH neutro che garantisce la corretta separazione di campioni proteici ad ampio peso molecolare. Il protocollo ha previsto che 6 µL di campione siano uniti a 4 µL di mix (LDS Sample Buffer 4X 2.5 µL, NuPAGE® Reducing Agent 1X 1 µL, Acqua MilliQ 0.5 µL) ed incubati a 100°C per 2 minuti. Il gel è stato riposto nell'apposito apparato, riempito di 1X *MOPS SDS Running Buffer* (Ricetta 9) ed i campioni (10 µL) caricati nei rispettivi pozzetti. Il marker utilizzato in questa corsa è stato lo *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific, Cat. No 26623) (Fig. 20). Per fare correre i campioni è stato applicato un voltaggio di 150V.

Al termine della corsa il gel è stato trasferito in una vaschetta riempita di acqua MilliQ per procedere con i tre lavaggi in agitazione di durata 5 minuti l'uno. Il gel è stato colorato tramite incubazione per 20 minuti in agitazione con il colorante *Quick Coomassie® Stain* (SERVA) e lavato per tre volte.

Una volta valutati i risultati ottenuti dall'espressione in coltura da 100mL, è stata ripetuta una nuova espressione per aumentare la produzione delle proteine e averne quantità maggiori. Le stesse procedure già descritte precedentemente sono state ripetute, ma aumentando il volume di espressione ad 1L, preparando 4 beute con portata 1L contenenti 250mL ciascuna di LB e ampicillina alla concentrazione già usata precedentemente.

16. Purificazione delle proteine

In tutte le proteine espresse era presente in C-terminale al CPD una coda di 6 Istitidine al fine di poter procedere con la purificazione delle stesse secondo tecnologia IMAC (cromatografia d'affinità per metalli). Per eseguire la

purificazione è stata utilizzata la resina Ni-NTA Agarose (Acido nichel-nitrilotriacetico, Qiagen CAT. No. 30210) costituita da agarosio caricato con ioni Nichel (Ni^{2+}), che presenta alta affinità per le Istidine. La resina Ni-NTA Agarose è una matrice per cromatografie di affinità sfruttata al fine di purificare proteine ricombinanti dotate di un Tag di istidine. In particolare, il Nichel instaura legami di coordinazione con atomi in grado di cedere un doppietto di elettroni come ossigeno ed azoto; la catena laterale delle istidine è dotata di un atomo di azoto che può legare il Nichel presente nella resina. I passaggi di lavaggio ed eluizione sono fondamentali per isolare e recuperare la sola proteina di interesse.

Una volta stimata la quantità di resina da usare, tenendo in considerazione la capacità legante della resina e la quantità di proteina espressa (5-10mg per mL di resina), è stato prelevato il volume di resina desiderato e messo in contatto con il lisato batterico contenente la proteina da purificare. È stato tenuto in incubazione su basculante per due ore. L'incubazione in questione dovrebbe favorire il legame delle Istidine presenti e gli ioni Nichel della resina.

Sono state utilizzate delle Spin Column dotate di filtro (BioRad Cat. No. 7326227) che vengono equilibrate con l'utilizzo di acqua MilliQ. Conclusa l'incubazione di due ore, il campione è stato trasferito sulla colonna fino all'impaccamento della resina sul fondo per poi procedere all'eluizione e alla raccolta del Flow Through (FT). A seconda di come la proteina è stata estratta dai batteri, in buffer non denaturante o denaturante, sono stati utilizzati due diversi tipi di soluzioni per la loro purificazione. Nel caso delle proteine denaturate i passaggi di lavaggio della resina e di eluizione della proteina sono stati ottenuti con dei buffer di Urea 8M che variano di pH (il pH di 4 facilita il distacco della proteina dalla resina), mentre nel caso di proteine non denaturate con dei buffer salini (NaCl e Tris) nei quali varia la concentrazione di Imidazolo (bassa per il legame proteina-resina, alta per il distacco proteina-resina); l'imidazolo compete con le Istidine per il Nichel della resina. La proteina P32 è stata ottenuta in forma non denaturata che denaturata, mentre tutti i frammenti proteici in forma denaturata. Nel caso della purificazione non denaturante il letto della resina è stato lavato con un volume di 8 volte superiore quello del suo letto con il Wash Buffer (Ricetta 5a) lasciando eluire e raccogliendo l'eluato. Il passaggio è stato ripetuto una seconda volta. Si è proseguito aggiungendo un ugual volume di letto della resina di Elution Buffer (Ricetta 5b) lasciando eluire; il passaggio è stato ripetuto cinque volte: sono state raccolte cinque eluizioni. Nel caso della purificazione denaturante la differenza constava nei soli Buffer usati: per i due lavaggi il Buffer C pH 6.3 (Ricetta 6a) e per le cinque eluizioni il Buffer E pH 4.5 (Ricetta 6b).

Ogni campione ottenuto durante il processo di purificazione della proteina è stato poi caricato su SDS-PAGE per valutare sia l'avvenuta purificazione che come unire le varie frazioni; i campioni con la maggior quantità di proteina d'interesse sono stati poi quantificati tramite l'utilizzo dello spettrofotometro.

17. Quantificazione con metodo BCA

La quantificazione di P32 e delle sue subunità è stata inizialmente effettuata con lo spettrofotometro a UV, strumento che legge l'assorbanza della proteina a 280nm. Successivamente, la quantificazione di P32 e delle sue sub-unità è avvenuta attraverso il metodo dell'acido Bicinconinico (BCA) (Fig. 21). Questo metodo si basa su due reazioni: la riduzione degli ioni del solfato di rame da Cu^{2+} a Cu^{+} , eseguita dalla proteina di interesse diluita in un medium alcalino (mediata dalla temperatura), e la chelazione di uno ione Cu^{+} con due molecole di BCA. Quest'ultima reazione porta alla formazione di un complesso di colore viola che assorbe fortemente la luce ad una lunghezza d'onda di 540nm. La struttura molecolare della proteina, il numero di legami peptidici (-NH-CO) e la presenza di particolari amminoacidi (cisteine, cistine, triptofano e tirosina) sono i principali responsabili del viraggio di colore. In base alla concentrazione di proteina presente in soluzione si ha una diversa intensità di colore che viene letta allo spettrofotometro sotto forma di Densità Ottica (OD). Contemporaneamente alla proteina d'interesse vengono saggiate diluizioni scalari di BSA (bovine serum albumin), per la costruzione di una retta di calibrazione usata per saggiare la OD ottenute dai campioni sottoposti ad analisi. Per il dosaggio della proteina con il metodo del BCA è stato utilizzato il kit "BCA protein assay kit" (Pierce Cat. No. 23227). L'esperienza di quantificazione è stato condotto in micropiastre a 96 pozzetti con fondo a "U", i campioni sono stati saggiati in doppio a varie diluizioni così come la retta di calibrazione che presentava 8 punti partendo dalla concentrazione di 2mg/mL di BSA fino a 0.0156mg/mL. Come da indicazioni presenti nel kit, sono stati usati 200 μL di soluzione di lavoro, composta da 50 parti di soluzione A e una di soluzione B, aggiunti ad un volume di campione di 10 μL per pozzetto. La piastra è stata incubata per 30' a 37°C e successivamente letta allo spettrofotometro a 540nm. I dati della lettura sono stati trasferiti su foglio Excel da cui è stata calcolata la retta di calibrazione standard ottenuta dalla BSA. La concentrazione dei campioni in esame è stata calcolata per interpolazione lineare tenendo conto dell'equazione della retta standard e della diluizione del campione.

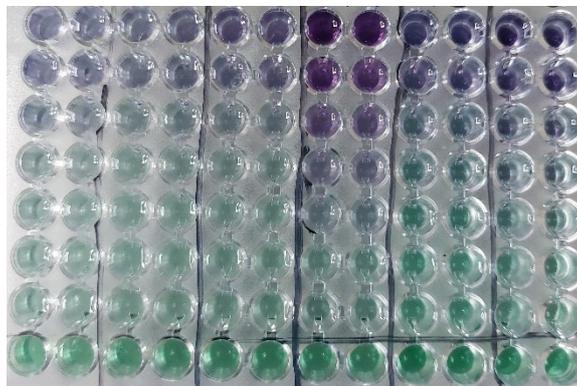


Figura 21: Piastra a 96 pozzetti in cui è stato eseguito il dosaggio delle proteine/frammenti proteici con il metodo BCA

Le concentrazioni delle stesse sono riportate in Tabella 55.

Tabella 55: Concentrazione delle proteine/frammenti proteici prodotti

Nome proteina	Concentrazione ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
P32 pET22b non denaturata	1.8
P32A pET45b	1.3
P32A pET22b	0.3
P32B pET22b	0.18
P32B1 pET22b	0.14
P32B2 pET22b	0.2
P32B3 pET22b	0.38
P32B4 pET22b	0.89
P32B5 pET22b	0.33
P32B6 pET22b	0.24
P32 pET22b denaturata	0.22

18. Western Blot

Per verificare il riconoscimento delle proteine di interesse da parte di anticorpi monoclonali e sieri positivi per LSDV, è stato eseguito un Western Blot (WB). Le proteine sono state fatte migrare singolarmente su gel di poliacrilamide SDS-page come descritto in precedenza e poi caricate su un unico pozzetto lungo per tutta la larghezza del gel. Il marcatore di peso molecolare (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Fisher Scientific) è stato caricato in pozzetto singolo. Alla fine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro) attraverso lo strumento “Trans-BlotTurbo” (Bio-Rad Cat. No. 18-0608 0718) secondo quanto raccomandato dal produttore. Concluso il trasferimento, la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione in tampone latte 5%, PBS 1X e 0.2% tween (Ricetta 7) al fine di bloccare siti di legame aspecifici. Successivamente sono stati caricati gli AcM da testare con l’utilizzo del MINI-PROTEAN® II Multiscreen Apparatus (Bio-Rad Cat. No. 17-04017), usando come controllo positivo l’anticorpo anti-Hys. Tutti gli AcM sono stati usati sotto forma di terreno metabolizzato da tessuto cultura di crescita dell’ibridoma esprimente l’AcM e diluiti 1/3 in una soluzione di latte al 2%, PBS 1X e 0.2% di Tween. Le eccezioni sono il controllo positivo diluito 1/1000 nella stessa soluzione e gli AcM presenti in quantità basse caricati in diluizione 1/12. Dopo incubazione per 1 ora a temperatura ambiente, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS 1X e Tween 0.2% dalla durata di 10 minuti in agitazione. Terminati i tre lavaggi, la membrana viene incubata con un anticorpo di capra marcato con Perossidasi di Rafano (Horseradish Peroxidase HRP) che riconosce le immunoglobuline G di topo diluito 1/250 (Numero lotto 21062023). Conclusa l’ora di incubazione in agitazione con l’anticorpo secondario si procede con i tre lavaggi descritti in precedenza al termine dei quali la membrana viene messa in contatto, in agitazione ed a temperatura ambiente, con un substrato cromogeno consistente in 6mL di soluzione HRP

Chromogenic Substrate (TMB) (Novex Cat. No. WP20004). Non appena sono apparse le prime bande, la soluzione cromogena è stata buttata e sostituita da acqua MilliQ per lavare le strisce. Dopo 10 minuti di agitazione in acqua, le strisce sono state fatte asciugare all'aria e la membrana è stata ricomposta.

Nel caso del Western Blot con pool di sieri positivi e negativi, successivamente alla fase di blocco della membrana con latte 5% sono stati aggiunti i pool in diluizione 1/20 in latte al 2%, PBS 1X e 0.2% di Tween. Nella soluzione è stato aggiunto E. Coli negativo in diluizione 1/100 per evitare che Ac contro componenti di E. Coli eventualmente presenti nei sieri diano segnale. I lavaggi in questo caso vengono effettuati con PBS 2X e Tween 0.2% e l'anticorpo secondario è un anti-ruminante 1G10 diluito 1/100.

19. Collezione di sieri

Sono stati utilizzati sia sieri di campo negativi che sieri sperimentali positivi.

I sieri positivi sperimentali (Tab. 56) sono stati ottenuti da infezioni eseguite da Friedrich Loeffler Institut (Greifswald – Insel Riems, Germany):

- I. 90 sieri derivanti da 18 bovini di cui sei vaccinati con il ceppo Neethling attenuato LSDV, otto infettati con il ceppo LSDV circolante nel nord della Macedonia nel 2016 e 4 con il ceppo nigeriano di LSDV isolato nel 2019 (referenza). Ogni animale è stato campionato dal giorno 0 e ogni 7 giorni fino a 28 giorni post-infezione (PI);
- II. 33 sieri ovini prelevati da due gruppi da sei infettati rispettivamente l'uno con il ceppo SPPV "India/2013/Surankote" e l'altro con il ceppo SPPV "Egypt/2018". Ogni animale è stato campionato dal giorno 0 e settimanalmente fino a 4 settimane PI (per alcuni animali il prelievo si è fermato a 7/14 giorni PI);
- III. 28 sieri di capra prelevati da 8 animali di cui 6 infettati con ceppo GTPV "V/103" e due in contatto. Ogni animale è stato campionato dal giorno 0 e settimanalmente fino a 4 settimane PI (per due il prelievo si è fermato alla prima/seconda settimana PI).

Un totale di 198 sieri bovini, 187 sieri di capra e 241 sieri ovini sono stati collezionati in Italia (nazione LSDV-free) ed usati come negativi per settare il valore di cut-off. I sieri bovini sono stati collezionati a partire da 27 allevamenti nel Nord Italia; i sieri ovini e di capra sono stati collezionati rispettivamente a partire da 18 e 28 allevamenti in Lombardia ed Emilia-Romagna.

Tabella 56: Sieri bovini collezionati settimanalmente fino a 28 giorni post infezione sperimentalmente infettati con diversi ceppi di LSDV. Il virus usato per ogni animale ed i risultati di VTN (test di neutralizzazione virale), ID.vet Capripox DA ELISA (Elisa commerciale), ELISA competitiva e indiretta basate su AcM sono riportati. I risultati positivi sono evidenziati con il simbolo *

Virus inoculato	ID animale	Dpi	VNT (titer)	Capripox DA ELISA (ID. vet)	ELISA competitiva (PI value)	ELISA indiretta (OD value)
LSDV "Neethling" Strain	124	-2	<1:10	13	0	0.018
		7	<1:10	4	0	0.073
		14	1:18*	99*	84*	1.248*
		21	1:57*	168*	94*	1.418*
		28	1:45*	196*	95*	1.525*
LSDV "Neethling" Strain	128	-2	<1:10	-4	0	0
		7	<1:10	9	0	0
		14	1:7	-1	66*	0.810*
		21	1:7	-6	69*	0.889*
		28	1:7	22	73*	0.965*
LSDV "Neethling" Strain	129	-2	<1:10	-1	0	0
		7	<1:10	10	0	0.033
		14	1:18*	34*	78*	0.552*
		21	1:45*	49*	88*	0.892*
		28	1:71*	101*	94*	1.206*
LSDV "Neethling" Strain	133	-2	<1:10	3	0	0
		7	<1:10	16	4	0.027
		14	1:13*	37*	83*	1.252*
		21	1:45*	36*	85*	1.515*
		28	1:180*	129*	90*	1.574*
LSDV "Neethling" Strain	193	-2	<1:10	4	0	0.089
		7	<1:10	14	0	0.043
		14	<1:10	17	53*	0.812*
		21	<1:10	43*	62*	0.919*
		28	1:7	36*	65*	0.0895*
LSDV "Neethling" Strain	195	-2	<1:10	-1	0	0
		7	<1:10	12	0	0
		14	<1:10	38*	71*	0.677*
		21	<1:10	50*	80*	1.15*
		28	1:13*	88*	81*	1.038*
LSDV North Macedonia 2016	200	-2	<1:10	3	0	0.046
		7	<1:10	13	0	0.007
		14	1:28*	71*	79*	1.068*
		21	1:28*	169*	87*	1.308*
		28	1:90*	196*	91*	1.480*
	285	-2	<1:10	7	0	0
		7	<1:10	20	0	0.037

LSDV North Macedonia 2016		14	1:28*	42*	88*	1.212*
		21	1:57*	65*	92*	1.492*
		28	1:90*	136*	94*	1.517*
LSDV North Macedonia 2016	286	-2	<1:10	13	0	0.168
		7	<1:10	0	0	0.097
		14	1:14*	-3	60*	1.069*
		21	1:36*	12	75*	1.165*
		28	1:45*	71*	87*	1.46*
LSDV North Macedonia 2016	477	0	<1:10	-1	0	0
		7	<1:10	-2	0	0.008
		14	1:100*	10	68*	0.871*
		21	1:200*	69*	80*	1.206*
		28	1:400*	190*	88*	1.398*
LSDV North Macedonia 2016	484	0	<1:10	0	1	0.233
		7	<1:10	0	6	0.166
		14	1:128*	89*	76*	1.355*
		21	1:200*	130*	81*	1.254*
		28	1:200*	166*	88*	1.407*
LSDV North Macedonia 2016	484	0	<1:10	-1	0	0.01
		7	<1:10	-2	0	0
		14	1:25*	18	63*	0.680*
		21	1:400*	112*	89*	1.288*
		28	1:1280*	128*	96*	
LSDV North Macedonia 2016	544	0	<1:10	-1	0	0
		7	<1:10	-2	0	0.073
		14	1:80*	24	74*	1.292*
		21	1:512*	64*	89*	1.344*
		28	1:320*	144*	94*	1.493*
LSDV North Macedonia 2016	556	-2	<1:10	0	0	0
		7	<1:10	-2	0	0.016
		14	1:64*	94*	78*	1.209*
		21	1:200*	86*	89*	1.443*
		28	1:320*	208*	95*	1.571*
LSDV Nigeria 2019	R-47	-2	<1:10	0	0	0
		7	<1:10	-1	6	0
		14	<1:10	2	51*	0.658*
		21	1:13*	43*	93*	0.994*
		28	1:80*	153*	96*	1.114*
LSDV Nigeria 2019	R-81	-2	<1:10	0	0	0
		7	<1:10	-2	0	0
		14	1:13*	10	66*	0.778*
		21	1:80*	50*	88*	0.967*
		28	1:100*	127*	84*	1.119*
	R-83	-2	<1:10	-1	15	0

LSDV Nigeria 2019		7	<1:10	-1	3	0.004
		14	<1:10	13	53*	0.459*
		21	1:20*	89*	94*	1.141*
		28	1:50*	125*	95*	1.052*
LSDV Nigeria 2019	R-84	-2	<1:10	-1	14	0
		7	<1:10	-1	10	0
		14	<1:10	17	76*	0.662*
		21	1:80*	92*	92*	1.045*
		28	1:64*	135*	93*	1.031*

20. Antigene virale

Il laboratorio WOAHA di referenza per LSDV (Pirbright Institute, UK) ha fornito il ceppo Neethling del virus che è stato amplificato in una cultura di cellule primarie di testicolo ovino (TSO) al fine di ottenere lo stock virale. Successivamente, la linea cellulare OA3.Ts (*Ovis aries testis*) è stata usata per propagare il virus ed ottenere l'antigene virale: rispetto alle cellule primarie le OA3.Ts garantiscono la produzione di un buon titolo virale [52]. Le cellule sono state sottoposte a cicli di gelo-scongelo dopo aver presentato il massimo degli effetti citopatici. La sospensione virale è stata raccolta, centrifugata e filtrata con filtri 0.45µm, ed il virus inattivato con β-propiolattone 0.01%, utilizzato per inattivare virus mantenendo immutata la struttura esterna virale [53]. Il virus inattivato è stato utilizzato nei test ELISA sviluppati per la detection di anticorpi. Per produrre e caratterizzare AcM, LSDV inattivato (1L) è stato sottoposto ad una procedura di purificazione tramite centrifugazioni differenziali. Brevemente, una centrifugazione iniziale è stata condotta per 1h a 11000g ed il pellet risospeso in buffer Tris 10mM pH 8.0; la soluzione virale è stata omogenata, sonicata e centrifugata per 15' a 1000g. Dopo aver conservato il surnatante il pellet è stato trattato una seconda volta allo stesso modo. Tutto il surnatante collezionato è stato ultracentrifugato tramite un cuscino di saccarosio 36% w/v a 18000 rpm per 90' a 4°C usando il rotore SW40 (Beckman Coulter); il pellet risospeso in 2mL di Buffer Tris 10mM pH 8.0 alla concentrazione finale di 500X. Lo step di purificazione finale è stato ottenuto tramite ultracentrifugazione con un gradiente continuo di saccarosio 24-40% a 14000 rpm per 40' a 4°C con il rotore SW40. Le frazioni centrali lattiginose di gradiente sono state unite, diluite a 10mL con il buffer Tris 10mM pH 8.0 e ultracentrifugate a 18000 rpm per 90' a 4°C con il rotore SW40. Il pellet è stato risospeso in 2mL di buffer Tris 10mM pH 8.0 (concentrazione finale 500X). La presenza del virus durante i diversi step di purificazione è stata monitorata con l'uso di microscopia elettronica. La concentrazione dell'antigene virale nella preparazione purificata virale era di 1mg/mL secondo il metodo BCA.

21. Pannello di anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali prodotti sono il risultato di due immunizzazioni di topi BALB/c eseguite con il virus purificato o semi-purificato. I topi sono stati inoculati per via sub cutanea con LSDV inattivato e l'adiuvante di Freund completo e, dopo 30 giorni, sono stati richiamati con la stessa dose di antigene in buffer fosfato salino (PBS) per via intraperitoneale. Un mese dopo è stato inoculato uno booster tramite iniezione intraperitoneale dell'antigene nella stessa condizione della precedente. Dopo l'eutanasia dei topi, gli splenociti sono stati fusi con le cellule di mieloma NS0. La fusione ed il clonaggio degli ibridomi positivi è stato eseguito seguendo le procedure standardizzate del laboratorio di ISZLER [54]. Lo screening degli ibridomi prodotti è stato eseguito tramite ELISA indiretta per individuare gli anticorpi secreti specifici contro il virus usato per l'immunizzazione e parallelamente verso un criolisato della linea cellulare OA3 per escludere la selezione di anticorpi aspecifici. In questo modo è possibile distinguere i AcM virus-specifici dagli AcM reattivi verso componenti cellulari contaminanti. A seguito di una caratterizzazione iniziale, alcuni degli ibridomi positivi sono stati clonati e fatti crescere in flask Integra CELLline (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) per almeno due mesi, con due/tre raccolte settimanali del terreno contenente concentrazioni di MAb nel range 0.2-1.5 mg/mL. Tre AcM sono stati purificati dal terreno con la proteina A [55] e coniugati con Horseradish Peroxidase (HRP, Merck Life Science, Darmstadt, Germany) seguendo il protocollo precedentemente descritto [56].

A partire Gli anticorpi monoclonali testati sono riportati in Tabella 57.

*Tabella 57: Isotopi e profilo di reattività dei Mabs reattivi in Western Blot contro il virus. La tabella riporta il valore OD dell'ELISA indiretta e la percentuale di inibizione (PI dell'ELISA competitiva tra i MAb testati (competitore) e i tre MAb coniugati alla perossidasi (PO). Una competizione alta è indicata con il simbolo *, una parziale con il simbolo + e l'assenza di simboli indica scarsa o nulla competizione*

MAb	ELISA indiretta Neethling LSDV (OD value)	PI vs 3H5-PO	PI vs 2C6-PO	PI vs 2F10-PO	Isotipo
2C6	2.0	96*	97*	96*	IgG1
3H5	1.9	96*	96*	54+	IgG1
5C8	1.5	60+	64+	53+	IgG2a
2F10	2.0	37	40	96*	IgG1
7B7	1.8	31	31	93*	IgG1
4E8	1.6	26	36	92*	IgG2a
6G4	2.1	28	35	91*	IgG1
2A9	2.1	24	14	88*	IgG1
2C9	2.1	21	17	66+	IgG1
2F12	2.0	20	19	58+	IgG1

8C4	1.8	13	27	52+	IgG1
5F9	0.5	13	15	75+	IgG2a
2C10	0.8	-9	-17	72+	IgG1
2E11	1.9	12	12	30	IgG1

La Tabella 57 riporta il pannello di 14 AcM che sono stati utilizzati per testare le proprietà immunogeniche ed antigeniche della P32 ricombinante sia in Western Blot che in ELISA indiretta. Gli AcM erano stati precedentemente testati in ELISA competitiva con il virus ottenendo i dati riportati in Tabella 57 in cui maggiore è la percentuale di inibizione (PI) tra l'anticorpo marcato e quello non, maggiore è la probabilità che essi riconoscano epitopi vicini tra loro. Per esempio, la PI tra l'AcM 3H5-PO e 2C6 è quasi 100: si deduce che i due AcM in esame competano per il legame ad epitopi vicini o per lo stesso epitopo. Questi esperimenti hanno permesso di raggruppare gli AcM in 4 gruppi antigenici da cui sono stati scelti gli AcM rappresentanti di ciascuno con cui testare i sub-frammenti proteici ottenuti. Inoltre, precedenti prove di ELISA competitiva per il legame all'antigene virale tra quattro AcM marcati (2C6, 3H5, 2F10 e 2F12) e un pool di sieri bovini positivi avevano dimostrato elevate percentuali di inibizione: si è dedotto che l'epitopo riconosciuto dagli anticorpi è immunogeno [57].

22. Saggi ELISA

Al fine di individuare le diluizioni ottimali per ciascun reagente sono state fatte delle titolazioni: gli antigeni sono stati adsorbiti a 5µg/mL, gli AcM da testare aggiunti tal quale in base due, i sieri in diluizione fissa 1/50 e l'anticorpo secondario marcato in diluizione 1/500. Per i saggi ELISA sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti di polistirene trattato a fondo piatto (Nunc Maxisorp) a cui è stato adsorbito, a seconda delle necessità, la proteina ricombinante di interesse/virus inattivato LSDV purificato/anticorpi monoclonali. I saggi ELISA sono stati utili per valutare la capacità sia del pannello di AcM che dei sieri positivi di riconoscere le proteine/frammenti proteici ricombinanti. Il primo saggio ELISA utilizzato è di tipo indiretto (Fig. 22) che prevede l'adsorbimento delle proteine di interesse sul fondo della piastra e l'aggiunta degli AcM/sieri eventualmente in grado di riconoscerle e legarle. Il secondo tipo di test è stato un ELISA Trapping indiretto (Fig. 23) che ha previsto l'adsorbimento dell'AcM 2F10 sulla superficie della piastra per catturare in modo specifico il virus inattivato/proteina ricombinante e l'aggiunta di sieri positivi. La presenza sia di AcM che di anticorpi nei sieri in grado di legare epitopi sulle proteine adsorbite è stata rilevata rispettivamente con un Anti IgG di Topo in capra coniugato con HRPO (Cod. 72.689) e un IgG anti-ruminante (1G10) coniugato con HRPO. I test sono stati condotti sia con sieri che con il pannello di anticorpi monoclonali. Le reazioni ELISA sono state eseguite in 50µL.

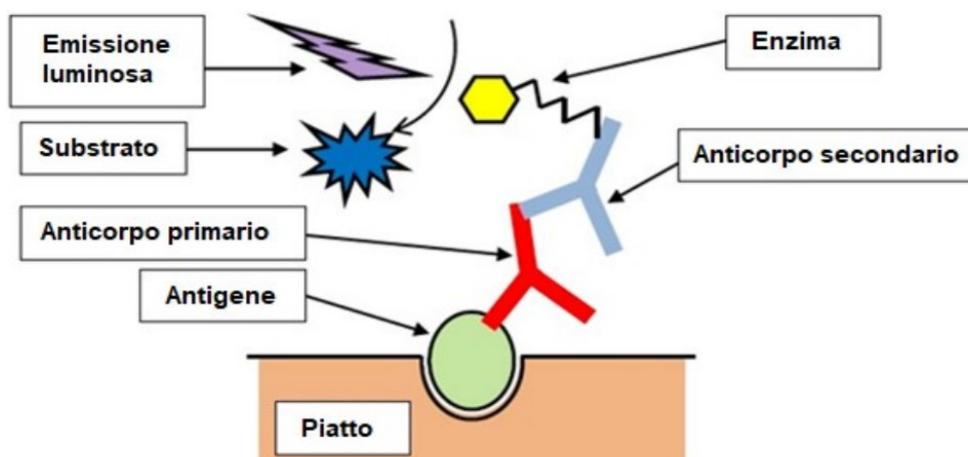


Figura 22: Schema rappresentativo dell'ELISA indiretta

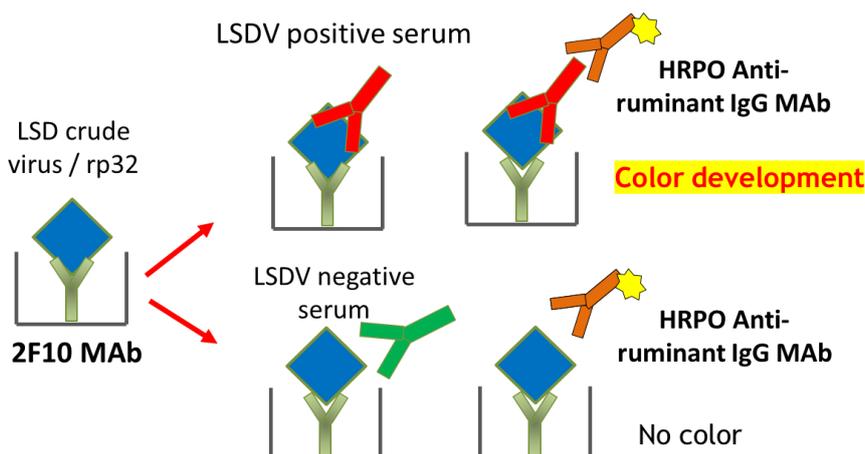


Figura 23: Schema rappresentativo dell'ELISA Trapping indiretta

a. Saggio ELISA Trapping indiretta ed ELISA indiretta con i sieri

Le micropiastre sono state adsorbite con l'AcM purificato 2F10 (3µg/mL), precedentemente dimostrato in grado di riconoscere e legare la proteina p32, ed incubate overnight a 4°C. Il giorno seguente sono stati eseguiti tre lavaggi da cinque minuti ciascuno con buffer PBS-Tween (PBS 1X + 0.05% di Tween) ed aggiunto il virus crudo inattivato LSDV/proteina ricombinante P32 in corrispondenza delle file dispari, mentre nelle pari il solo buffer di diluizione (carbonato bicarbonato). Successivamente ad un'ora di incubazione a 37°C e tre lavaggi in buffer PBS-Tween, sono stati aggiunti in duplicato sieri di bovini diluiti 1/50. Le micropiastre sono state incubate per 1h a 37°C e lavate per tre volte con buffer di lavaggio. Ad ogni pozzetto è stato aggiunto l'AcM IgG anti-ruminante (chiamato 1G10) coniugato con HRPO in diluizione 1/500 in tampone PBS-Tween addizionato con 1% di lievito ed incubato per 1h a 37°C. Dopo i tre lavaggi finali si è colorato con

l'aggiunta di OPD, addizionato a 0.02% di H₂O₂, per 10 minuti a temperatura ambiente; la reazione è stata interrotta con l'uso di acido solforico (pH 5.6). La densità ottica è stata letta allo spettrofotometro Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alla lunghezza d'onda di 420nm. Per determinare i risultati, il valore netto di OD è stato calcolato tramite la sottrazione del valore di OD dei pozzetti in cui non è presente l'antigene dall'OD dei pozzetti contenenti l'antigene. Nel caso del saggio ELISA indiretto con la proteina/frammenti proteici ricombinanti adsorbiti a 5µg/mL il procedimento è equivalente, ma senza immunocattura. Inoltre, è stato aggiunto E. Coli negativo 1% insieme al pool di sieri in diluizione per evitare che eventuali anticorpi positivi a proteine batteriche diano aspecificità.

b. Saggio ELISA indiretta con gli AcM

Sia la proteina P32 che i frammenti proteici quantificati sono stati adsorbiti alle micropiastre ELISA (Nunc Maxisorp) alla concentrazione di 5µg/mL e 2.5µg/mL in carbonato bicarbonato e incubate overnight a +4°C. Nel caso di frammenti proteici non quantificati l'adsorbimento è stato fatto partendo da una diluizione 1/10. Il giorno seguente sono stati eseguiti tre lavaggi da cinque minuti ciascuno di buffer di lavaggio PBS-Tween. Successivamente sono stati aggiunti gli AcM da testare tal quale e/o in base 2 (a seconda della quantità di tessuto cultura disponibile) in tampone PBS-Tween addizionato con 1% di lievito. Oltre agli anticorpi da testare sono stati aggiunti anche controlli positivi e negativi. Dopo l'incubazione di 1h a 37°C sono stati eseguiti i tre lavaggi precedentemente descritti. Quindi, sono stati aggiunti 50µL a pozzetto di Anti-IgG di Topo in capra coniugato con HRPO, diluito 1/500 in tampone PBS-Tween addizionato con 1% di lievito. Successivamente all'incubazione di 1h a 37°C si è proceduto con il lavaggio della piastra e l'aggiunta di OPD (Sigma-Aldrich Cas. No. 615-28-1) per 10 minuti a temperatura ambiente per la colorazione. L'OPD, che deve essere tenuto al buio, è stato attivato con l'aggiunta dello 0.02% di acqua ossigenata. La reazione cromogenica è stata bloccata con l'uso di acido solforico (pH 5.6); la densità ottica è stata letta allo spettrofotometro Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alla lunghezza d'onda di 420nm.

Ricette

1. Terreno LB Luria-Bertani per la crescita di batteri

Reagente	Quantità
NaCl	20g
Bacto™ Trypton (Gibco™, ThermoFisher Scientific. Cat. No. 211705)	20g
Bacto™ Yeast (Gibco™, ThermoFisher Scientific. Cat. No. 212750)	10g

Le polveri vanno mescolate in acqua milliQ fino al raggiungimento del volume (2L) e, utilizzando una cartina torna sole (pH 4.5-10, Carlo Erba, Dasit Group), si misura il pH, accertandosi che sia 7.5. Il terreno va poi sterilizzato in autoclave e conservato a +4°C.

2. Preparazione dell'antibiotico ampicillina

L'antibiotico utilizzato per la selezione dei batteri ricombinanti è stato l'ampicillina. Si è partiti da uno stock 100 mg/mL per arrivare alla concentrazione di 100 µg/mL in acqua MilliQ. Il preparato è stato poi filtrato sotto cappa con un filtro da 0.2µm, aliquotato e conservato a -20°C.

3. Preparazione dell'IPTG

Per indurre i batteri nella produzione delle proteine di interesse è stato utilizzato l'IPTG. Si è partiti pesando 2.38 gr di IPTG (1M) stock da introdurre in una falcon 50mL a cui aggiungere 10mL di acqua MilliQ. Il preparato è stato filtrato sotto cappa con un filtro da 0.2µm, aliquotato e conservato a -20°C.

4. Preparazione delle piastre di crescita

Prima della sterilizzazione della ricetta per la preparazione di LB, a 300mL di terreno sono stati aggiunti 4.5gr di Bacto-agar. Si procede con la sterilizzazione in autoclave e la conservazione a 4°C. Per preparare le piastre è necessario sciogliere il terreno solido LB Agar in microonde ed attendere che la temperatura di LB-agar sia inferiore a 60°C per evitare che il calore distrugga gli antibiotici da aggiungere. In una beuta si inserisce il volume di terreno che si desidera, in base al numero di piastre da preparare, a cui poi aggiungere, sempre sotto cappa, gli antibiotici di interesse. Nel nostro caso è stata aggiunta ampicillina in rapporto 1/1000 (100 ng/mL). Si aliquotano 15 mL di LB Agar + Amp nelle piastre Petri da conservare avvolte in parafilm a 4°C. La scadenza è di circa un mese e mezzo dopo averle preparate.

5. Lysis Buffer

Reagente	Quantità
NaCl 500 mM	29.22g
TrisHcl 50mM	6.1g
Imidazolo 15mM	1g
Glicerolo 10%	100mL

Per la preparazione di 1L di soluzione gli ingredienti vengono mescolati ed uniti ad acqua MilliQ. Il pH della soluzione deve essere 7.5. Il Lysis Buffer viene utilizzato per l'estrazione della proteina dal pellet batterico in condizioni native: il suo scopo

è quello di rompere le cellule batteriche per l'estrazione senza intaccare la struttura della proteina di interesse.

a. Wash Buffer

Il Wash Buffer utilizzato durante la purificazione nativa delle proteine ha la stessa composizione del Lysis Buffer, con la differenza della presenza di Imidazolo 20mM.

b. Elution Buffer

L'Elution Buffer utilizzato durante la purificazione nativa delle proteine per l'eluizione e raccolta delle stesse ha uguale composizione del Lysis Buffer, con la differenza della presenza di Imidazolo 250mM.

6. Buffer B Urea 8M

Reagente	Quantità
Urea 8M	480.48g
NaH ₂ PO ₄ 0.1M	13.8g
Trizma 0.01M	1.2g

Per la preparazione di 1L di buffer gli ingredienti vengono mescolati ed uniti ad acqua MilliQ fino al raggiungimento del volume. Per favorire lo scioglimento dell'urea è necessario scaldare e mescolare continuamente. Il pH, misurato con cartine torna sole prima della sterilizzazione, deve essere 8. Il Buffer Urea 8M viene utilizzato per l'estrazione della proteina dal pellet batterico in condizioni native.

a. Buffer C pH 6.3

Il Buffer C utilizzato durante la purificazione denaturante delle proteine ha la stessa composizione del Buffer B Urea 8M, ma pHato in modo diverso.

b. Buffer E pH 4.5

Il Buffer E utilizzato durante la purificazione denaturante delle proteine per l'eluizione e raccolta delle stesse ha uguale composizione del Buffer B Urea 8M, ma pHato in modo diverso

7. PBS (1X) + Tween (0.02%)

Reagente	Quantità
PBS 10X	150mL
Acqua MilliQ	1350mL
Tween	3mL

Per la preparazione di 1.5L di buffer per il lavaggio del Western Blot, 150mL di PBS 10X vengono diluiti a PBS 1X in 1350mL di acqua MilliQ per il raggiungimento del volume finale. Si aggiungono infine 3mL di Tween mescolando continuamente.

8. Gel agarosio 1/2% e TBE 1X (Tris Borato di EDTA)

I gel di agarosio homemade utilizzati sono costituiti da agarosio D1-LE a bassa elettroendosmosi (Cat. No: A0576) [58] e TBE 1X. A seconda della dimensione delle maglie desiderata e della lunghezza di amplificato da far correre, si avrà agarosio concentrato all'1% o al 2%. Una volta pesata la polvere di agarosio e aggiunto il TBE 1X (preparato diluendo 500 mL di TBE 10X in 4.5 mL di H₂O MilliQ, deionizzata e purificata), il composto viene messo nel microonde finché la polvere non è completamente sciolta e lo si lascia raffreddare in bagnetto termico a 45°C senza che il gel solidifichi. Quando la temperatura è scesa, si inserisce l'intercalante ((Midori Green Advance DNA stain Nippon Genetics Europe Cat. No. MG04).

9. MOPS SDS Running Buffer 1X

Per la corsa su gel NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris delle proteine è stato usato il MOPS SDS Running Buffer 1X. Per la sua preparazione 50mL di 20X MOPS SDS Running Buffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1mM EDTA, pH 7.7) sono stati aggiunti a 950mL di acqua MilliQ.

Risultati

1. Studio della proteina P32/frammenti proteici da esprimere

a. Visualizzazione 3D

Mediante l'uso del tool Swiss-Model è stato possibile ottenere il modello tridimensionale della regione extra-virione di P32, usando come template la proteina omologa H3L presente sull'envelope di Vaccinia Virus. L'identità di sequenza è del 32.91%. A partire dal tool è stato scaricato il file PDB aperto con il visualizzatore Chimera (Fig. 24).



Figura 24: Regione extra-virione della proteina P32 envelope di Lumpy Skin Disease Virus. In rosso il frammento proteico P32A, in verde il frammento proteico P32B ed in arancio la regione di overlap di 40 amminoacidi

Il frammento proteico P32A, che comprende l'N terminale della proteina P32, è dotato di 158 amminoacidi ed ha un peso molecolare di 19.51 kDa. Il frammento proteico P32B è dotato di 158 amminoacidi ed ha un peso molecolare di 20.02 kDa.

Tramite l'utilizzo dello stesso visualizzatore Chimera sono stati evidenziati gli altri sei frammenti proteici ottenuti tenendo fisso il C-terminale della proteina ricombinante extra-virione ed aggiungendo in posizione N-terminale dai 20 ai 50 amminoacidici (Fig. 25).

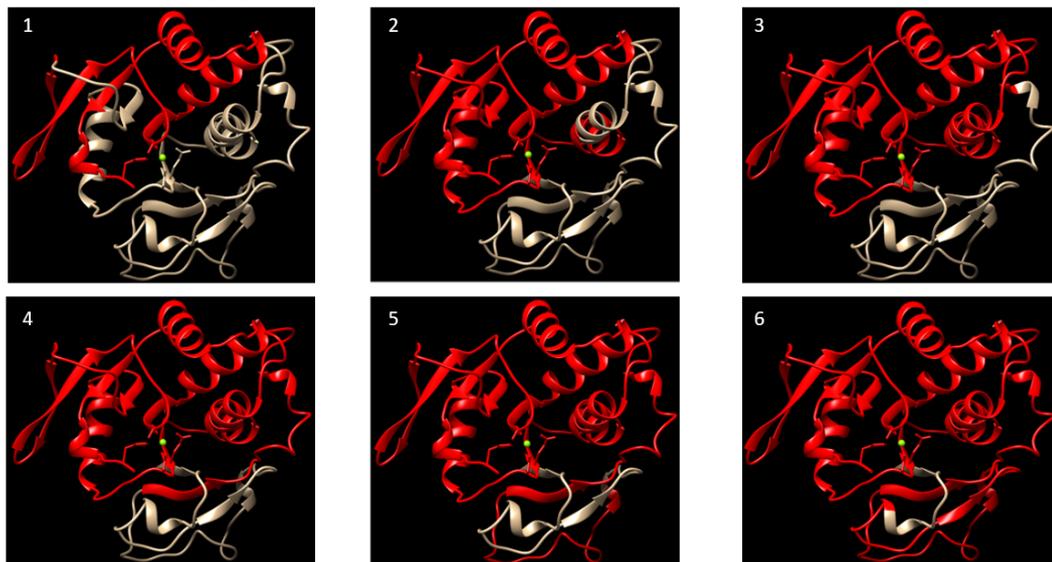


Figura 25: Struttura tridimensionale della regione extra-virione di P32. In rosso sono evidenziati i frammenti proteici prodotti a partire dal C-terminale mantenuto fisso

2. Clonaggio dei geni di interesse

I geni di interesse, sia quelli codificanti per la regione extra-virione di P32 che quelli codificanti i frammenti proteici, ed i plasmidi per l'espressione sono stati amplificati correttamente al peso molecolare atteso valutato su gel di agarosio (Fig. 26, Tab. 58). Dopo purificazione e quantificazione degli amplificati, si è proceduto ai diversi metodi di clonaggio ed alla trasformazione batterica. Il giorno seguente, le colonie cresciute sono state valutate attraverso Colony PCR (Fig. 27); a partire dalle colonie amplificate all'altezza attesa è stato estratto il plasmide dotato di inserto attraverso MINI-prep. Il sequenziamento Sanger ha dimostrato come i cloni sottoposti ad esame includessero il gene di interesse: uno di questi è stato selezionato per essere ulteriormente amplificato ed utilizzato per l'espressione di batteri B21 (DE3) (Tab. 59).

Tabella 58: Elenco degli amplificati ottenuti e la lunghezza attesa corrispondente

Nome amplificato	Lunghezza attesa
P32	828 nt
P32A	507 nt
P32B	510 nt
pET22 A	5941 nt
pET22 B	5939 nt
P32B1	386 nt
P32B2	566 nt
P32B3	626 nt
P32B4	686 nt

P32B5	746 nt
P32B6	806 nt
pET22 B1	6177 nt
pET22 B2	6175 nt
pET22 B3	6172 nt
pET22 B4	6175 nt
pET22 B5	6175 nt
pET22 B6	6175 nt

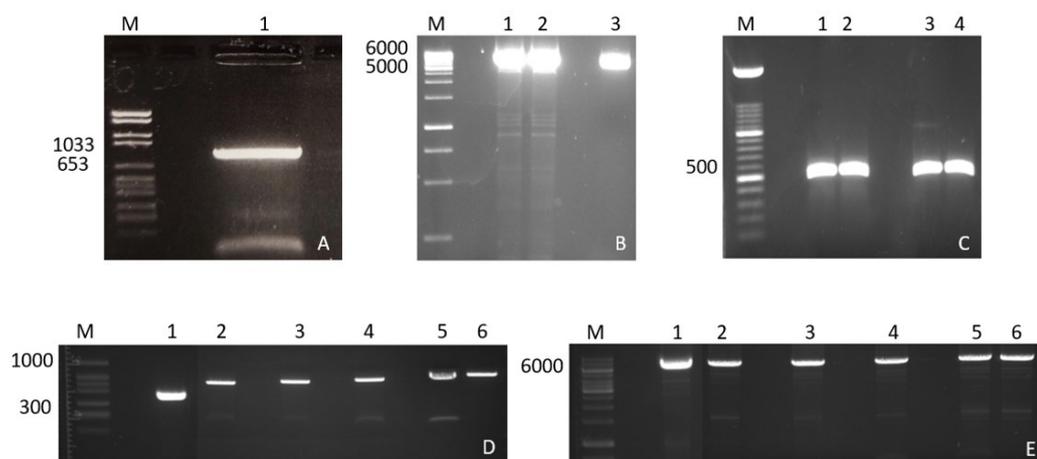


Figura 26: Illustrazione di ciascun amplificato ottenuto. A: Amplificazione di P32; B: Amplificazione dei plasmidi pET22 A e B con estremità Gibson (1-2) e pET45 (3); C: Amplificazione di P32A pET22(1-2) e P32B pET22(3-4) con estremità per il clonaggio Gibson; D: Amplificazione di P32B1-P32B6 con estremità per il clonaggio Gibson; E: Amplificazione di pET22 B1-B6 con estremità per il clonaggio Gibson

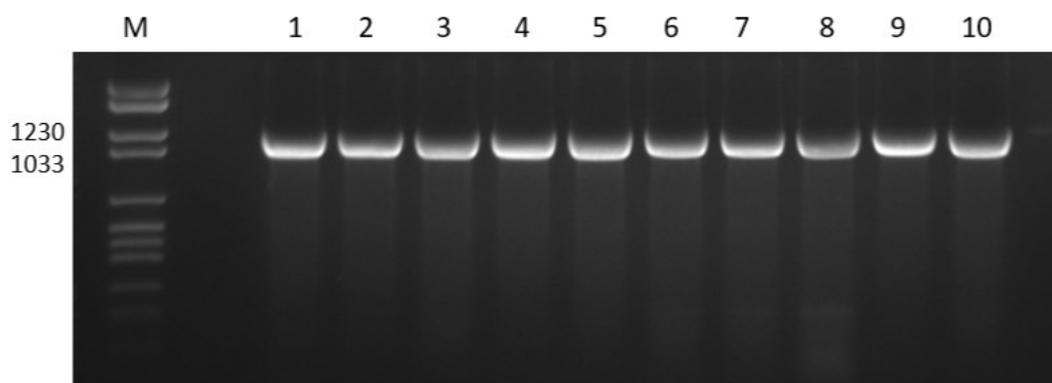


Figura 27: Esempio di Colony PCR per P32B pET22 (1207 nt). M: Marcatore di peso molecolare; 1-10: Colonie batteriche di P32B pET22

Tabella 59: Elenco delle proteine/frammenti proteici ottenuti ed il clone corrispondente selezionato

Nome proteina/frammento proteico	Clone scelto
P32	N°5
P32A pET22	N°6
P32B pET22	N°5
P32B1 pET22	N°1
P32B2 pET22	N°8
P32B3 pET22	N°2
P32B4 pET22	N°1
P32B5 pET22	N°5
P32B6 pET22	N°6

3. Espressione della proteina e dei frammenti proteici di LSDV

Per valutare l'espressione della proteina P32 e dei suoi frammenti proteici è stato eseguito un time-course che consisteva in prelievi sequenziali di 1mL di coltura batterica effettuati ogni ora dopo l'induzione dell'espressione e analizzati in SDS-PAGE (Fig. 28).

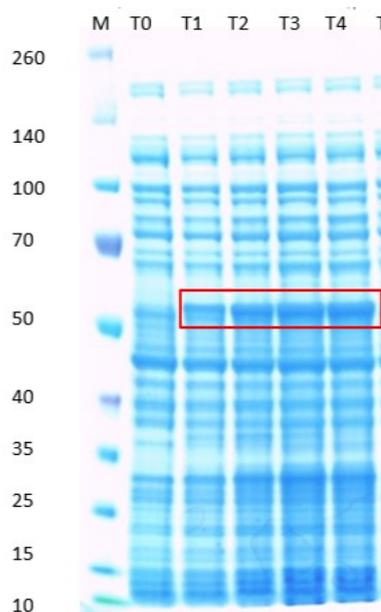


Figura 28: SDS-page per la valutazione della solubilità della proteina espressa. In rosso è evidenziato il profilo di Time-Course. 1: Marcatore di peso molecolare; 3-5: Controllo positivo e due controlli negativi; 6-10: Lisati della coltura batterica prelevati sequenzialmente ogni ora, partendo dal T0 (prelievo pre-induzione) fino al T4 (prelievo a 4 ore post-induzione)

Il profilo di time-course è risultato lo stesso per ogni proteina/frammento proteico prodotto: per tutte le proteine il plateau di produzione è stato raggiunto tra la seconda e la quarta ora post-induzione. È stata, quindi, valutata la solubilità delle proteine d'interesse attraverso il trattamento del pellet batterico prelevato al termine

del periodo d'incubazione con due diversi tamponi: uno nativo, ovvero una soluzione salina in grado di conservare strutturalmente le proteine, ed uno denaturante contenente Urea 8M. La proteina P32 ha confermato una buona solubilità dal momento in cui è stata estratta quasi tutta dai batteri dopo il trattamento del pellet con tampone nativo. Al contrario, ogni frammento proteico prodotto è stato estratto esclusivamente con l'utilizzo del tampone denaturante (Fig. 29). Negli esperimenti di comparazione delle reattività della P32 e dei sub-frammenti con gli AcM e con i sieri positivi, la P32 è stata estratta e testata sia in condizioni non denaturanti che denaturanti. Inoltre, le proteine che sono state testate sono solo quelle ottenute con il clonaggio nel plasmide di destinazione pET22b e non pET45b; l'assenza del CPD in quest'ultimo ha reso impossibile la produzione del frammento proteico ricombinante P32B, probabilmente tossico per i batteri.

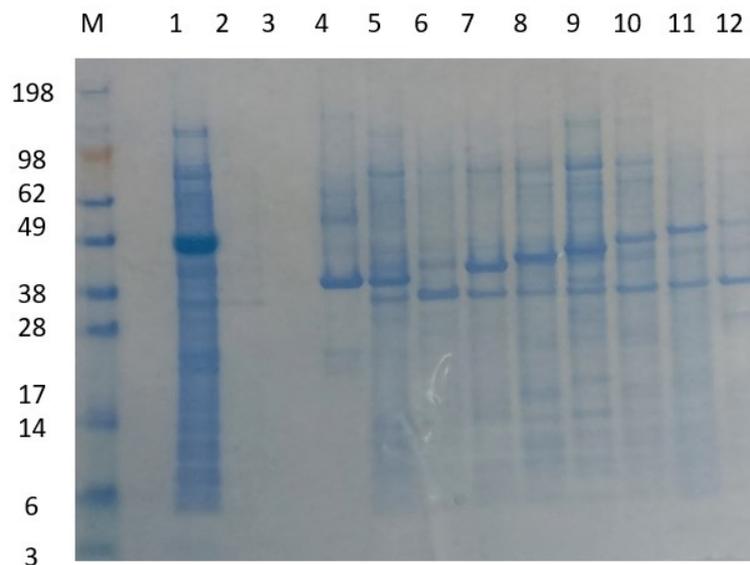


Figura 29: SDS-page riassuntiva di tutte le proteine/frammenti proteici prodotti. M: Marcatore di peso molecolare; 1: Pellet batterico trattato in modo nativo della regione extra-virione di P32; 2: Controllo negativo; 4-11: Pellet batterici trattati in modo denaturante dei frammenti proteici P32A, P32B, P32B1-P32B6; 12: Pellet batterico trattato in modo denaturante della regione extra-virione di P32

4. Purificazione della proteina P32/frammenti proteici ricombinanti di LSDV

L'unico frammento proteico che è stato purificato, e successivamente quantificato a $0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$, è P32A pET22 (Fig. 30); il resto delle proteine/frammenti proteici ricombinanti non purificati sono stati comunque quantificati mediante metodo del BCA ed utilizzati per valutare le proprietà antigeniche ed immunogeniche della P32. L'utilizzo di proteine non purificate non risulta un problema per i test condotti con AcM vista l'elevata specificità del paratopo di interagire solo ed esclusivamente con il proprio epitopo specifico. La questione è diversa nel caso di test condotti con

sieri che potrebbero contenere anticorpi positivi a proteine batteriche: per ovviare la problematica è stato aggiunto E. Coli negativo 1% insieme al siero in diluizione.

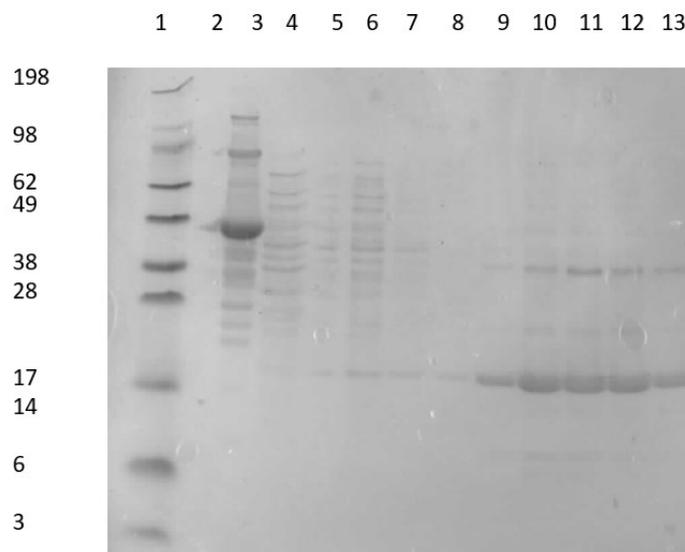


Figura 30: SDS-page per la valutazione della purificazione del frammento proteico P32A. 1: Marcatore di peso molecolare; 3-5: Controllo positivo e due controlli negativi; 6: Passato attraverso la resina (FT); 7-8: Lavaggi della resina; 9-13: Eluizioni della proteina/frammento proteico di interesse

Le proteine/frammenti proteici ricombinanti che sono stati selezionati per procedere con i test ELISA e Western Blotting sono riportati in Tabella 60.

Tabella 60: Elenco delle proteine/frammenti proteici ricombinanti ottenuti ed il peso molecolare corrispondente. Il peso molecolare del solo CPD è di 23kDa

Nome proteina/frammento proteico	Peso molecolare
P32 non denaturata	55 kDa
P32 denaturata	55 kDa
P32A pET22	42.49 kDa
P32B pET22	43 kDa
P32B1 pET22	38.11 kDa
P32B2 pET22	45.24 kDa
P32B3 pET22	47.39 kDa
P32B4 pET22	49.77 kDa
P32B5 pET22	52.15 kDa
P32B6 pET22	54.47 kDa

5. Western Blotting della proteina P32/frammenti proteici ricombinanti di LSDV

a. Western Blotting con anticorpo anti-istidine

Per confermare l'espressione delle proteine di interesse sono stati condotti dei Western Blotting (WB) utilizzando l'anticorpo anti-istidine specifico per la coda di istidine presente nella sequenza di ciascuna proteina/frammento proteico (Fig. 31).

L'anticorpo monoclonale anti-istidine ha dimostrato di riconoscere, al peso molecolare atteso, la regione extra-virione di P32 e tutti gli otto sub-frammenti proteici prodotti. Alcune bande di degradazione sono presenti a pesi molecolari inferiori, mentre possibili forme di aggregazione non completamente denaturate sono evidenti a pesi molecolari superiori. Nessun segnale è stato rilevato per il controllo negativo.

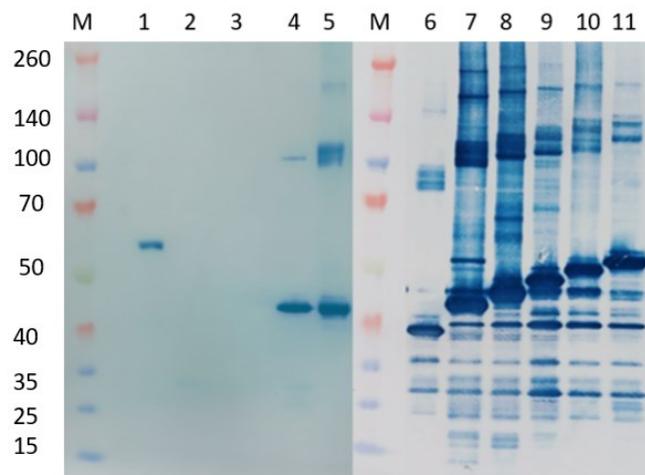


Figura 31: Western Blotting con anti-istidine eseguito su tutte le proteine/frammenti proteici prodotti. Tutti i frammenti proteici, ad esclusione di P32A e P32, sono stati caricati in diluizione 1:10 a partire dal lisato grezzo. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32; 2-3: Controlli negativi; 4: P32A; 5: P32B; 6-11: P32B1-P32B6

b. Western Blotting con gli AcM da testare

Per valutare le proprietà antigeniche ed immunogeniche della proteina P32 e delle diverse subunità prodotte si procede testando un pannello di anticorpi monoclonali precedentemente caratterizzati. Tutti gli AcM sono stati utilizzati in diluizione 1/3, ad esclusione dell'anticorpo monoclonale anti-istidine aggiunto in diluizione 1/1000.

L'Anti-istidine riconosce, oltre alla banda alla giusta altezza di 55kDa, altre due bande a 37kDa e 25kDa probabilmente rappresentanti prodotti di degradazione che hanno mantenuto la coda di istidine. La maggior parte degli AcM prodotti hanno dimostrato un discreto/buon riconoscimento della regione extra-virione nativa di P32 (Fig. 32); inoltre, si nota come gli AcM sotto esame individuino anche uno smear tra 25 e 35kDa, segno di degradazioni della proteina che probabilmente hanno perso la coda di istidine.

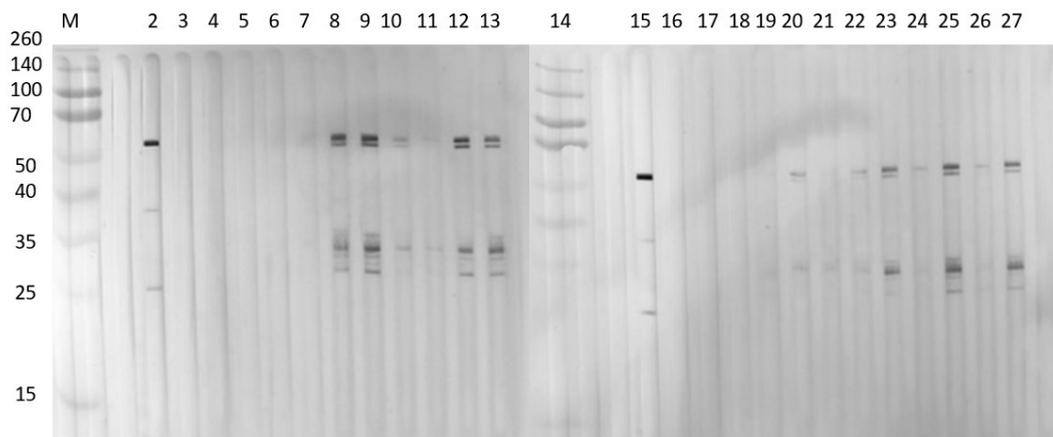


Figura 32: Western Blotting con P32 messa a 5ug in 100uL su pozzetto unico. M, 14: Marcatore di peso molecolare; 2, 15: Anti-istidine; 3, 16, 18: Vuoto; 4, 17: 2H3 S. Covid (CN); 6: 2B2; 7: 2A6; 8: 2C6; 9: 2A9; 10: 2C9; 11: 2C10; 12: 2F12; 13: 3H5; 19: 3D12; 20: 4E8; 21: 5C8; 22: 5F9; 23: 6G4; 24: 6B12; 25: 7B7; 26: 8C4; 27: 2F10

Le subunità P32A, P32B e da P32B1 ad P32B6 sono state testate in Western Blot con un pannello più ridotto di AcM per la scarsa quantità di tessuto cultura: gli AcM da testare sono stati scelti in base alla loro capacità di riconoscere la proteina P32. Sono stati scelti, oltre agli AcM principali quali 2C6, 3H5, 2F10, cinque anticorpi ovvero 8C4, 2F12, 2A9, 2C10 e 2E11. Quest'ultimi sono stati selezionati in base al loro diverso profilo di reattività in ELISA competitiva (Tabella 57) rispetto ai tre AcM principali: minore è la percentuale di inibizione tra due AcM maggiore è la probabilità che vengano riconosciuti come epitopi regioni diverse sulla proteina in esame. I cinque AcM scelti presentano una PI sempre più bassa rispetto a 2C6, 3H5 e 2F10, indice della loro capacità di riconoscere epitopi diversi e lontani. Come mostrato in Fig. 33, gli AcM 2C6, 3H5, 2F10, 8C4, 2F12 e 2A9 hanno mostrato capacità di riconoscimento di epitopi solo sulla regione extra-virione di P32 ricombinante, estratta sia in tampone non denaturato che denaturato. Contrariamente, 2E11 non riconosce nessun epitopo in nessuna proteina/frammento proteico ricombinante.

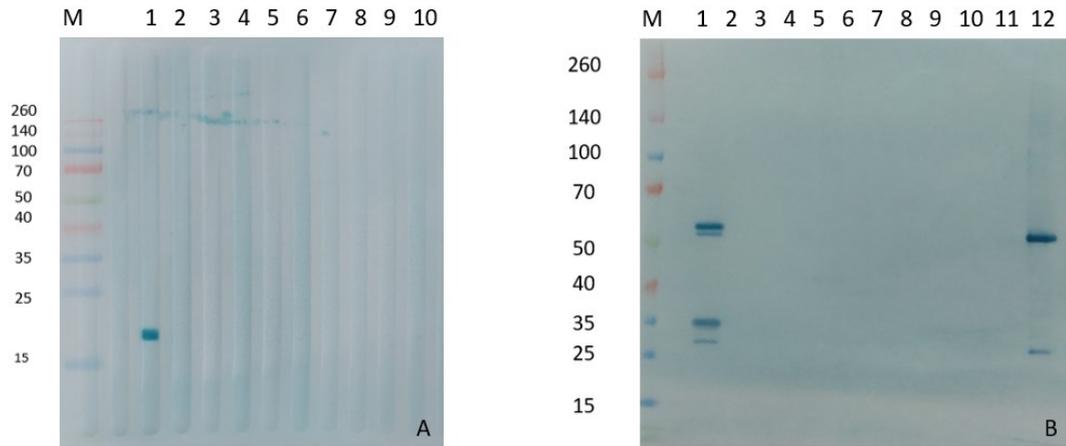


Figura 33: Illustrazione dei Western Blotting condotti con la selezione di AcM. A) Western Blotting del frammento proteico P32A caricato su pozzetto unico. M: Marcatore di peso molecolare; 1: AcM Anti-istidine; 2: AcM negativo; 3-10: AcM 2C6, 3H5, 2F10, 2F12, 8C4, 2C10, 2E11, 2A9. B) Esempio di Western Blotting di tutte le proteine/frammenti proteici ricombinanti. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 non denaturata; 2: Controllo negativo; 3: Vuoto; 4-11: Frammenti proteici P32A, P32B, P32B1-P32B6; 12: P32 denaturata

L'AcM 2C10 ha riconosciuto degli epitopi su alcuni dei frammenti proteici prodotti, quali P32B e P32B2-P32B6 (Fig. 34), oltre che sulla proteina P32 estratta sia in modo nativo che denaturato. Il risultato è in accordo con il WB in Fig. 32 in cui l'AcM in esame ha mostrato una lieve reattività nei confronti della regione extra-virione di P32.

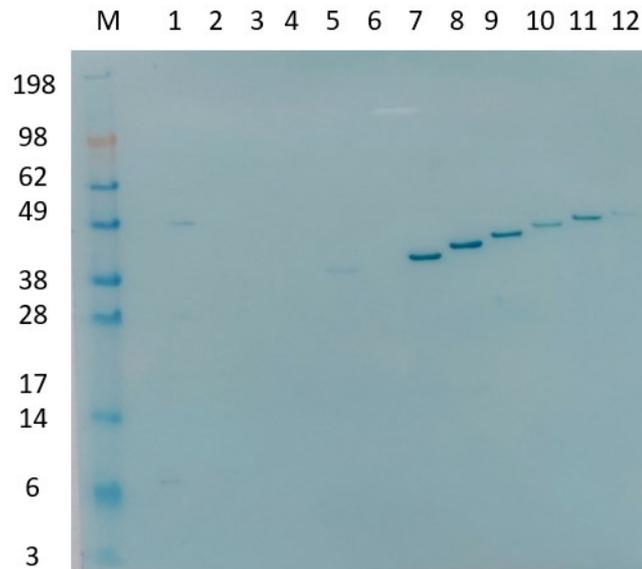


Figura 34: WB con l'AcM 2C10. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 nativa; 2: Controllo negativo; 3: Vuoto; 4: P32A; 4: P32B; 6-11: P32B1-P32B6; 12: P32 denaturata

c. Western Blotting con sieri

Sono stati testati un pool di sieri bovini positivi a LSDV ed un pool di sieri bovini negativi con tutte le proteine/frammenti proteici ricombinanti ottenuti. Il pool di positivi è stato ottenuto unendo aliquote di sieri bovini positivi tedeschi, e viceversa per il pool di negativi. Nonostante i frammenti proteici prodotti non vengano riconosciuti dalla maggiore parte degli AcM scelti, il WB con i sieri dimostra come siano presenti altri Ac non ancora caratterizzati che siano invece in grado di legarsi a tutti i frammenti proteici ricombinanti ottenuti (Fig. 35).

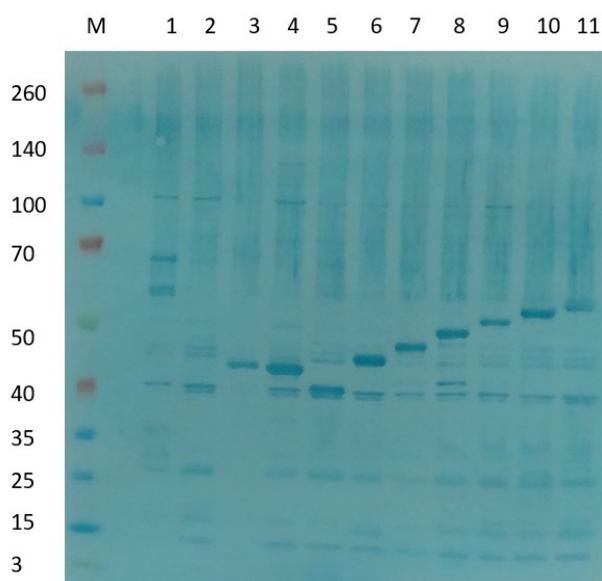


Figura 35: Western Blotting con pool di sieri bovini positivi a LSDV. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 nativa; 2: Controllo negativo (lisato grezzo di *E. Coli* trasformato con il plasmide vuoto); 3: P32A; 4: P32B; 5-10: P32B1-P32B6; 11: P32 denaturata

Come si osserva dall'immagine del WB sono presente altre bande, oltre a quelle corrispondenti alla proteina/frammenti proteici ricombinanti sotto esame. Le bande con un MW minore rispetto a quello atteso rappresentano degradazioni/proteine presenti anche in *E. Coli* (come dimostrato dal controllo negativo). Le bande superiori invece potrebbero rappresentare delle forme dimeriche delle proteine.

6. Saggi ELISA

a. Saggi ELISA indiretta con i sieri

Tutte le proteine/frammenti proteici ricombinanti ottenuti sono stati testati in ELISA Trapping indiretta. Attraverso la titolazione dei reagenti si è deciso di utilizzare la concentrazione di antigene adsorbito pari a $5\mu\text{g/mL}$, la diluizione dei sieri in esame 1/50 fissa e di marcatore 1/500. Né la ricombinante P32 né i frammenti proteici ricombinanti sono stati riconosciuti dal pool di sieri positivi; probabilmente l'adsorbimento in piastra non è sufficiente affinché ci sia riconoscimento ed è

necessaria l'immuno-cattura di ciascuno di loro. Il pool di sieri negativi non ha dato segnale di riconoscimento.

b. Saggi ELISA indiretta con AcM

Sia la regione extra-virione di P32 che le sue subunità sono state adsorbite a 5 μ g/mL in base due su piastre Nunc a 96 pozzetti, per il saggio ELISA indiretto. Le diluizioni ottimali di utilizzo sono state ottenute mediante titolazione dei reagenti utilizzati. In piastra sono stati aggiunti gli otto AcM scelti da testare con ciascuna proteina ricombinate. Come illustrato in Fig. 36, tutti gli AcM riconoscono più o meno bene la proteina P32 in forma nativa, mentre non interagiscono né con le subunità ottenute e nemmeno con la proteina stessa in forma denaturata. Il mancato riconoscimento della proteina P32 estratta in tampone nativo da parte dell'AcM 2A9 è probabilmente un artefatto: il dato in WB (Fig. 32), infatti, mostra una buona capacità di riconoscimento.

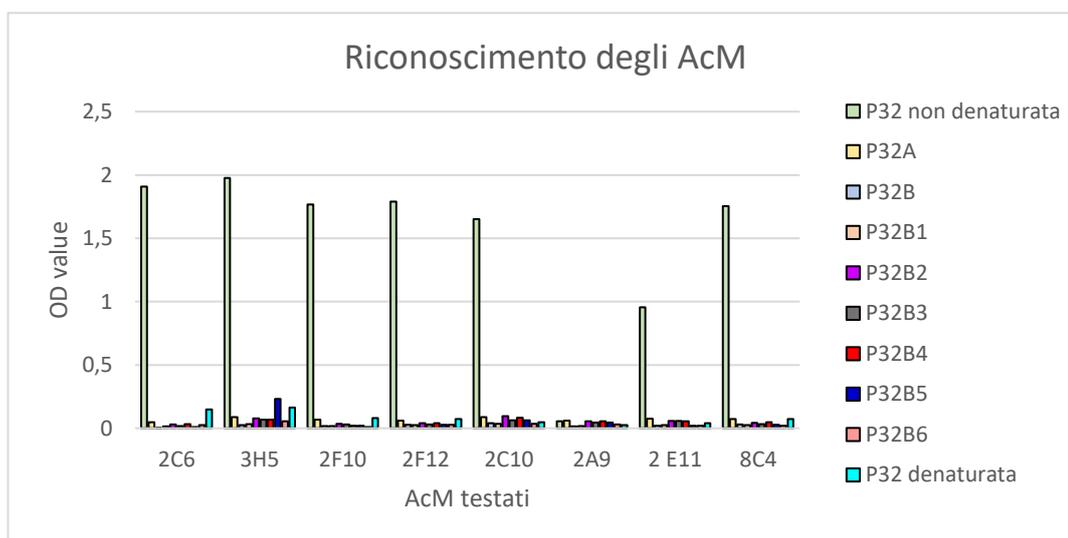


Figura 36: Istogramma che illustra la capacità di riconoscimento delle proteine/frammenti ricombinanti da parte degli AcM testati

c. Saggi ELISA sierologici tipo Trapping con P32 con i sieri

Dal momento in cui i saggi ELISA indiretti hanno dato i risultati esaminati in precedenza, la sola regione extra-virione di P32 estratta in tampone nativo è stata immuno-catturata in ELISA Trapping indiretta con l'AcM 2F10. Per il saggio sono stati utilizzati 198 sieri di bovini ottenuti da diverso bestiame italiano (nazione LDS-free) per settare il valore di Cut-off e 90 sieri derivanti da 18 bovini sperimentalmente infettati con differenti ceppi di LSDV. Questi ultimi sono stati collezionati settimanalmente fino a quattro settimane post-infezione.

In Fig. 37 sono riportati i grafici dei risultati con i sieri bovini negativi: il valore di Cut-off è stato settato a 0.2 OD ed il valore di specificità è del 100% sia immunocatturando il virus crudo inattivato che la P32 ricombinante.

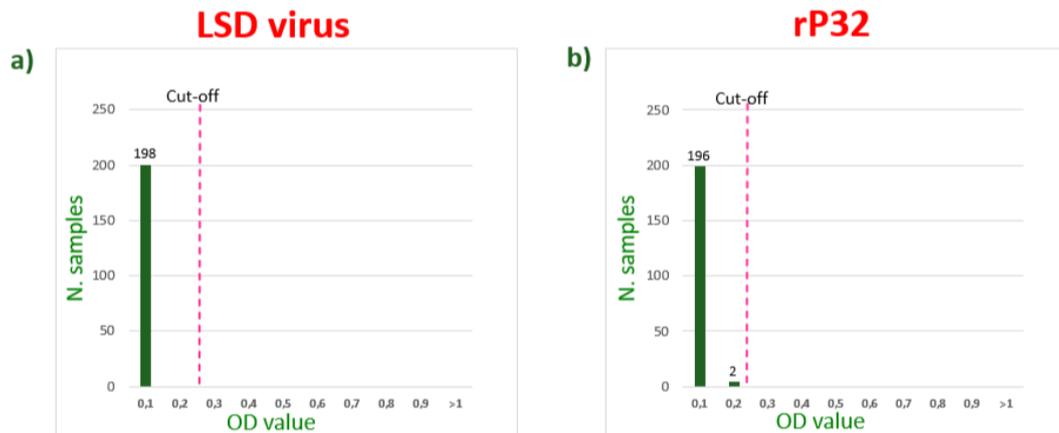


Figura 37: Risultati dei 198 sieri bovini negativi testati in ELISA Trapping indiretta con il virus inattivo crudo (a) e la proteina P32 ricombinante (b)

In Fig. 38 sono riportati i grafici dei risultati con i sieri bovini positivi: con il virus crudo inattivo immunocatturato si registra sieroconversione in tutti i bovini 14 giorni post-infezione (dpi). Con la proteina P32 ricombinante immunocatturata si registra sieroconversione a 14 giorni dpi in 16 bovini, mentre in due animali 21 giorni dpi. I 14 giorni post-infezione sperimentale ai quali si registra sieroconversione coincidono con l'attivazione della risposta immunitaria e della produzione di anticorpi specifici contro il virus.

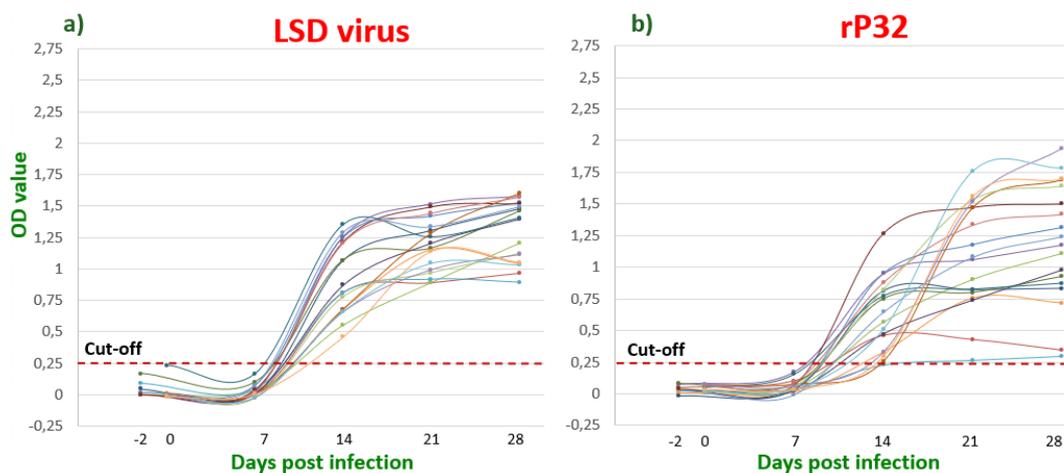


Figura 38: Sieroconversione individuata nei sieri bovini sperimentalmente infettati e testati in ELISA Trapping con il virus crudo inattivo (a) e la proteina P32 ricombinante (b)

7. Studio di antigenicità e idrofobicità della proteina

Tramite l'utilizzo del programma DNA Star del software "Protean" è stato valutato il profilo di antigenicità della regione extra-virione della proteina P32 con l'algoritmo di Jameson-Wolf. La scala Jameson-Wolf prevede potenziali

determinanti antigenici; i risultati vengono riportati in un grafico come dei picchi ognuno dei quali corrisponde ad un potenziale determinante antigenico.

Al fine di individuare le regioni idrofobiche/idrofiliche delle proteine sotto esame, il profilo di idrofobicità/idrofilicità è stato valutato con l'algoritmo Kyte-Doolittle. La scala Kyte-Doolittle è ampiamente utilizzata per individuare le regioni idrofobiche delle proteine, identificate da score positivi (0-3). L'output di DNA Star per la sequenza della regione extra-virione di P32 (Fig. 39) mostra come le regioni idrofiliche, esposte verso l'esterno della proteina corrispondano alle regioni maggiormente antigeniche, e viceversa.

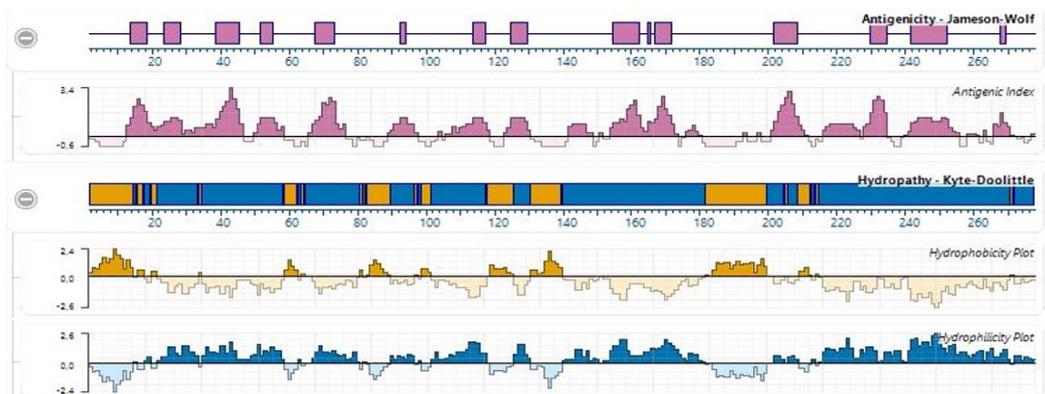


Figura 39: Profilo di antigenicità (Jameson-Wolf), idrofobicità e idrofilicità (Kyte-Doolittle) della regione extra-virione di P32

Dalla Fig. 40 si possono osservare i profili di idrofobicità, idrofilicità ed antigenicità di ogni frammento proteico prodotto a partire dalla proteina P32.

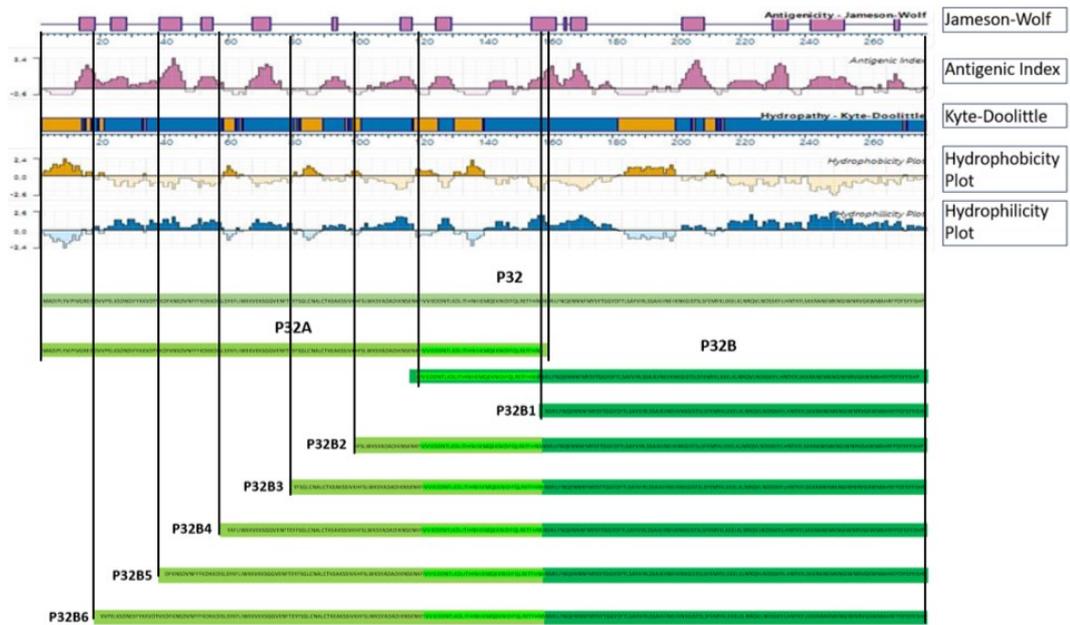


Figura 40: Illustrazione dell'indice di antigenicità, il plot di idrofobicità ed il plot di idrofilicità

Gli studi sono coerenti rispetto ai risultati ottenuti: gli anticorpi presenti nei sieri positivi riconoscono ciascuna proteina/frammento proteico ricombinante ottenuto in accordo con l'indice antigenico che mostra molte regioni con livelli alti di antigenicità.

Discussione e Conclusioni

Nel presente studio sono state valutate le proprietà antigeniche e l'immunogenicità della proteina strutturale del virus della Lumpy Skin Disease (LSDV) denominata P32 utilizzando un pannello di anticorpi monoclonali (AcM) prodotti verso il virus e dei sieri raccolti da bovini infettati sperimentalmente con LSD.

La P32 (322aa) è localizzata nell'envelope più interno del virus; la sua regione extra-virione intera (276aa) e otto diverse sue sub-frazioni sono state espresse in *E. coli*. I sub-frammenti ottenuti sono stati denominati P32A (da 1 a 158aa), P32B (da 118 a 276aa), P32B1 (da 158 a 276aa), P32B2 (da 98 a 276aa), P32B3 (da 78 a 276aa), P32B4 (da 58 a 276aa), P32B5 (da 38 a 276aa) e P32B6 (da 18 a 276aa). Solo la proteina intera è stata prodotta in condizioni native mentre tutte le sub-frazioni, anche se prodotte con una proteina di fusione al C-terminale (CPD) per facilitarne la solubilità, sono risultate insolubili e quindi solubilizzate in tampone denaturante. L'espressione di ciascuna proteina è stata valutata in Western Blotting (WB) con l'AcM anti-istidine, che ha riconosciuto la coda di sei istidine presente al C-terminale di tutte le proteine espresse.

Esclusa la sub-porzione P32A (da 1 a 154aa), nessuna delle proteine/frammenti proteici ricombinanti prodotti è stato purificato; probabilmente la coda di sei istidine nelle condizioni di purificazione è nascosta ed il legame con la resina è impedito.

Tutte le proteine espresse sono state valutate in WB ed in ELISA indiretta con un pannello di AcM murini prodotti e caratterizzati contro il virus, nessuno dei quali riconosce epitopi neutralizzanti; tuttavia, quattro di essi (2C6, 3H5, 2F10 e 2F12) hanno mostrato, in precedenti esperimenti di ELISA competitiva, di competere per lo stesso epitopo con i sieri positivi dimostrando che gli epitopi riconosciuti sono immunogeni. Inoltre, esperimenti di ELISA competitiva tra AcM, per valutare se riconoscevano lo stesso epitopo o epitopi differenti, hanno permesso di raggrupparli in almeno 4 gruppi antigenici da cui ne sono stati selezionati otto rappresentativi di ciascun gruppo e con i quali sono stati condotti i test sui sub-frammenti proteici.

Tutti i 14 AcM a disposizione hanno riconosciuto la P32 ricombinante in WB e, di questi, 12 hanno dimostrato reattività nei confronti della stessa in ELISA indiretta, mentre nessuno degli otto anticorpi selezionati, ad eccezione di uno (2C10), ha riconosciuto i sub-frammenti proteici ricombinanti sia in ELISA indiretta che in WB. Probabilmente gli epitopi riconosciuti dalla maggior parte degli AcM sono parzialmente lineari, oppure nascosti e sono riprodotti e accessibili solo sull'intera porzione extra-virione della P32. Solo l'AcM 2C10 ha dimostrato di riconoscere i vari sub-frammenti proteici, il suo epitopo è probabilmente riprodotto e presente nella regione compresa nel sub-frammento P32B (da 118 a 276aa).

L'immunogenicità della P32 e dei sub-frammenti prodotti è stata valutata anche con un pannello di sieri prelevati da bovini infettati sperimentalmente. Siccome non siamo riusciti a purificare la maggior parte dei sub-frammenti della P32, la valutazione della loro immunogenicità è stata fatta in WB utilizzando un pool di

sieri positivi a disposizione. Tutti i sub-frammenti, compresa la P32 intera, hanno reagito in WB, dimostrando che ogni porzione ottenuta dalla proteina include epitopi immunogeni (almeno lineari) consistentemente con le analisi in silico che evidenziano ampie regioni antigeniche e idrofiliche lungo la sequenza extra-virione della proteina.

L'immunogenicità della P32 ricombinante è stata valutata anche in ELISA Trapping. Infatti, la P32 catturata dall'AcM 2F10 viene esposta efficacemente al riconoscimento dei sieri bovini positivi; l'immuno-cattura della proteina da parte dell'anticorpo monoclonale garantisce l'immuno-purificazione della stessa usata come lisato grezzo. Sono stati testati un totale di 90 sieri da infezione sperimentale e 198 sieri bovini negativi prelevati su territorio italiano (indenne per la LSD) per stabilire una soglia di positività della reazione. I 198 sieri negativi non reagiscono verso la proteina ricombinante e presentano, infatti, valori di Densità Ottica (OD) basse nel range 0.1-0.2 OD. I sieri da infezione sperimentale, prelevati a vari giorni post-infezione (dpi), mostrano siero-conversione a 14dpi che coincide con l'attivazione della risposta immunitaria umorale con la produzione di IgG. Solo due sieri hanno dato siero-conversione a 21dpi. I sieri positivi hanno mostrato lo stesso profilo di reattività anche quando sono stati testati verso l'antigene virale nella stessa tipologia di ELISA Trapping, indicando che la proteina ricombinante riproduce le caratteristiche immunogeniche della proteina virale nativa.

Lo studio effettuato ha dimostrato che la proteina P32 espressa in *E. coli* ha riprodotto le proprietà antigeniche della proteina nativa verso la quale sono stati prodotti gli AcM, che la riconoscono nei vari test effettuati. Tuttavia, nessuno dei sub-frammenti riproduce le stesse proprietà antigeniche, dato che non vengono riconosciuti dalla maggior parte degli AcM anti-P32.

Sia la P32 che i suoi sub-frammenti si sono però dimostrati immunogeni dal momento in cui vengono riconosciuti da sieri bovini sperimentalmente infettati. La P32 ricombinante si è inoltre dimostrata come un buon candidato per essere utilizzata in test ELISA sierologici di screening per valutare la diffusione della malattia in paesi endemici.

Bibliografia

- [1] F. Namazi e A. Khodakaram Tafti, «Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review», *Vet Med Sci*, vol. 7, fasc. 3, pp. 888–896, mag. 2021, doi: 10.1002/vms3.434.
- [2] S. B. Sudhakar, N. Mishra, S. Kalaiyarasu, S. K. Jhade, e V. P. Singh, «Genetic and phylogenetic analysis of lumpy skin disease viruses (LSDV) isolated from the first and subsequent field outbreaks in India during 2019 reveals close proximity with unique signatures of historical Kenyan NI-2490/Kenya/KSGP-like field strains», *Transbound Emerg Dis*, vol. 69, fasc. 4, pp. e451–e462, lug. 2022, doi: 10.1111/tbed.14322.
- [3] T. Gupta, V. Patial, D. Bali, S. Angaria, M. Sharma, e R. Chahota, «A review: Lumpy skin disease and its emergence in India», *Vet Res Commun*, vol. 44, fasc. 3–4, pp. 111–118, nov. 2020, doi: 10.1007/s11259-020-09780-1.
- [4] S. Zeynalova, K. Asadov, F. Guliyev, M. Vatani, e V. Aliyev, «Epizootology and Molecular Diagnosis of Lumpy Skin Disease among Livestock in Azerbaijan», *Front Microbiol*, vol. 7, p. 1022, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01022.
- [5] E. Tuppurainen *et al.*, «Review: Vaccines and Vaccination against Lumpy Skin Disease», *Vaccines (Basel)*, vol. 9, fasc. 10, p. 1136, ott. 2021, doi: 10.3390/vaccines9101136.
- [6] K. Ratyotha, S. Prakobwong, e S. Piratae, «Lumpy skin disease: A newly emerging disease in Southeast Asia», *Vet World*, vol. 15, fasc. 12, pp. 2764–2771, dic. 2022, doi: 10.14202/vetworld.2022.2764-2771.
- [7] G. M. Cosseddu, «LUMPY SKIN DISEASE».
- [8] S. B. Sudhakar *et al.*, «Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in Odisha state, India in August 2019: Epidemiological features and molecular studies», *Transbound Emerg Dis*, vol. 67, fasc. 6, pp. 2408–2422, nov. 2020, doi: 10.1111/tbed.13579.
- [9] «WAHIS». Consultato: 20 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://wahis.woah.org/#/event-management>
- [10] B. Datten *et al.*, «An Extensive Examination of the Warning Signs, Symptoms, Diagnosis, Available Therapies, and Prognosis for Lumpy Skin Disease», *Viruses*, vol. 15, fasc. 3, p. 604, feb. 2023, doi: 10.3390/v15030604.
- [11] H. J. Eom, E.-S. Lee, e H. S. Yoo, «Lumpy skin disease as an emerging infectious disease», *J Vet Sci*, vol. 24, fasc. 3, p. e42, mag. 2023, doi: 10.4142/jvs.23016.
- [12] K. P. Suresh *et al.*, «Seroprevalence of sheeppox and goatpox virus in Asia and African continent: A systematic review and meta-analysis (Scientometrics)», *Vet World*, vol. 15, fasc. 2, pp. 455–464, feb. 2022, doi: 10.14202/vetworld.2022.455-464.
- [13] F. Liu, H. Zhang, e W. Liu, «Construction of recombinant capripoxviruses as vaccine vectors for delivering foreign antigens: Methodology and application», *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, vol. 65, pp. 181–188, ago. 2019, doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.013.
- [14] K. Sumana *et al.*, «Molecular phylogeny of Capripoxviruses based on major immunodominant protein (P32) reveals circulation of host specific sheeppox

- and goatpox viruses in small ruminants of India», *Infect Genet Evol*, vol. 85, p. 104472, nov. 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104472.
- [15] Z. Liang *et al.*, «Understanding the research advances on lumpy skin disease: A comprehensive literature review of experimental evidence», *Front Microbiol*, vol. 13, p. 1065894, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.1065894.
- [16] «Card fr», FAODocuments. Consultato: 6 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.fao.org/documents/card/fr?details=CB1892EN/>
- [17] R. C. Condit, N. Moussatche, e P. Traktman, «In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion», *Adv Virus Res*, vol. 66, pp. 31–124, 2006, doi: 10.1016/S0065-3527(06)66002-8.
- [18] K. L. Roberts e G. L. Smith, «Vaccinia virus morphogenesis and dissemination», *Trends Microbiol*, vol. 16, fasc. 10, pp. 472–479, ott. 2008, doi: 10.1016/j.tim.2008.07.009.
- [19] M. D. Greseth e P. Traktman, «The Life Cycle of the Vaccinia Virus Genome», *Annual Review of Virology*, vol. 9, fasc. 1, pp. 239–259, 2022, doi: 10.1146/annurev-virology-091919-104752.
- [20] «Vaccinia virus motility - PubMed». Consultato: 7 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527282/>
- [21] L. Liu, T. Cooper, P. M. Howley, e J. D. Hayball, «From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation», *Viruses*, vol. 6, fasc. 10, pp. 3787–3808, ott. 2014, doi: 10.3390/v6103787.
- [22] G. L. Smith, A. Vanderplasschen, e M. Law, «The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus», *J Gen Virol*, vol. 83, fasc. Pt 12, pp. 2915–2931, dic. 2002, doi: 10.1099/0022-1317-83-12-2915.
- [23] A. Sprygin, Y. Pestova, D. B. Wallace, E. Tuppurainen, e A. V. Kononov, «Transmission of lumpy skin disease virus: A short review», *Virus Research*, vol. 269, p. 197637, ago. 2019, doi: 10.1016/j.virusres.2019.05.015.
- [24] D. M. Zajonc, «Antibody Recognition of Immunodominant Vaccinia Virus Envelope Proteins», *Subcell Biochem*, vol. 83, pp. 103–126, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-46503-6_4.
- [25] P. C. Fay *et al.*, «The immune response to lumpy skin disease virus in cattle is influenced by inoculation route», *Front Immunol*, vol. 13, p. 1051008, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1051008.
- [26] M. Milovanović *et al.*, «Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests», *BMC Vet Res*, vol. 15, fasc. 1, p. 80, mar. 2019, doi: 10.1186/s12917-019-1831-y.
- [27] E. S. M. Tuppurainen *et al.*, «Review: Capripoxvirus Diseases: Current Status and Opportunities for Control», *Transbound Emerg Dis*, vol. 64, fasc. 3, pp. 729–745, giu. 2017, doi: 10.1111/tbed.12444.
- [28] C. L. Lin, C. S. Chung, H. G. Heine, e W. Chang, «Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo», *J Virol*, vol. 74, fasc. 7, pp. 3353–3365, apr. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.7.3353-3365.2000.
- [29] A. Haegeman *et al.*, «Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections», *Prev Vet Med*, vol. 181, p. 104704, ago. 2020, doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104704.
- [30] H. G. Heine, M. P. Stevens, A. J. Foord, e D. B. Boyle, «A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the

- homolog of the vaccinia virus H3L gene», *Journal of Immunological Methods*, vol. 227, fasc. 1, pp. 187–196, lug. 1999, doi: 10.1016/S0022-1759(99)00072-1.
- [31] A. Selim, E. Manaa, e H. Khater, «Molecular characterization and phylogenetic analysis of lumpy skin disease in Egypt», *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, vol. 79, p. 101699, dic. 2021, doi: 10.1016/j.cimid.2021.101699.
- [32] C. Le Goff *et al.*, «Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination», *J Gen Virol*, vol. 90, fasc. Pt 8, pp. 1967–1977, ago. 2009, doi: 10.1099/vir.0.010686-0.
- [33] G. Venkatesan *et al.*, «Expression and evaluation of recombinant P32 protein based ELISA for sero-diagnostic potential of capripox in sheep and goats», *Mol Cell Probes*, vol. 37, pp. 48–54, feb. 2018, doi: 10.1016/j.mcp.2017.11.005.
- [34] «Sviluppo di reagenti biotecnologici e test strategici per colmare lacune nella diagnostica della Lumpy Skin Disease (LSD) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna». Consultato: 6 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: https://www.izsler.it/bancadati_ricerca/sviluppo-di-reagenti-biotecnologici-e-test-strategici-per-colmare-lacune-nella-diagnostica-della-lumpy-skin-disease-lsd/
- [35] P.-D. Katsoulos *et al.*, «Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease», *Transbound Emerg Dis*, vol. 65, fasc. 1, pp. 174–185, feb. 2018, doi: 10.1111/tbed.12646.
- [36] T. Bedeković, I. Šimić, N. Krešić, e I. Lojkić, «Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination», *Transbound Emerg Dis*, vol. 65, fasc. 2, pp. 491–496, apr. 2018, doi: 10.1111/tbed.12730.
- [37] «OBP | Products». Consultato: 6 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.obpvaccines.co.za/products>
- [38] F. Vandebussche *et al.*, «Recombinant LSDV Strains in Asia: Vaccine Spillover or Natural Emergence?», *Viruses*, vol. 14, fasc. 7, p. 1429, giu. 2022, doi: 10.3390/v14071429.
- [39] F. Vandebussche, E. Mathijs, A. Haegeman, A. Al-Majali, S. Van Borm, e K. De Clercq, «Complete Genome Sequence of Capripoxvirus Strain KSGP 0240 from a Commercial Live Attenuated Vaccine», *Genome Announc*, vol. 4, fasc. 5, pp. e01114-16, ott. 2016, doi: 10.1128/genomeA.01114-16.
- [40] «putative IMV envelope protein [Lumpy skin disease virus] - Protein - NCBI». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN02799>
- [41] P. D. Kara *et al.*, «Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus», *Arch Virol*, vol. 148, fasc. 7, pp. 1335–1356, lug. 2003, doi: 10.1007/s00705-003-0102-0.
- [42] «PredictProtein - Protein Sequence Analysis, Prediction of Structural and Functional Features». Consultato: 25 settembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://predictprotein.org/>

- [43] A. Shen *et al.*, «Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag», *PLoS One*, vol. 4, fasc. 12, p. e8119, dic. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008119.
- [44] «One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>
- [45] «One Shot™ BL21(DE3) Chemically Competent *E. coli*». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C600003?SID=srch-srp-C600003#/C600003?SID=srch-srp-C600003>
- [46] «ProtScale analysis». Consultato: 9 ottobre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>
- [47] L. Avilan, «Assembling Multiple Fragments: The Gibson Assembly», in *DNA Manipulation and Analysis*, G. Scarlett, A c. di, in *Methods in Molecular Biology*. , New York, NY: Springer US, 2023, pp. 45–53. doi: 10.1007/978-1-0716-3004-4_4.
- [48] «MinElute Gel Extraction Kit». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/minelute-gel-extraction-kit>
- [49] A. F. Ismail e M. bin A. Rahman, «Silica Membrane», in *Encyclopedia of Membranes*, E. Drioli e L. Giorno, A c. di, Berlin, Heidelberg: Springer, 2016, pp. 1774–1776. doi: 10.1007/978-3-662-44324-8_534.
- [50] «NanoQuant_Manual.pdf». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: https://bif.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/389/2017/11/NanoQuant_Manual.pdf
- [51] «Gibson Assembly® Chemical Transformation Protocol (E5510) | NEB». Consultato: 8 giugno 2023. [Online]. Disponibile su: <https://international.neb.com/protocols/2012/12/11/gibson-assembly-transformation-protocol-e5510>
- [52] S. Babiuk *et al.*, «Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization», *J Vet Diagn Invest*, vol. 19, fasc. 5, pp. 486–491, set. 2007, doi: 10.1177/104063870701900505.
- [53] L. Tang *et al.*, «Effects of Three Types of Inactivation Agents on the Antibody Response and Immune Protection of Inactivated IHNV Vaccine in Rainbow Trout», *Viral Immunol*, vol. 29, fasc. 7, pp. 430–435, set. 2016, doi: 10.1089/vim.2016.0035.
- [54] E. Brocchi, D. Gamba, F. Poumarat, J. L. Martel, e F. De Simone, «Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies», *Rev Sci Tech*, vol. 12, fasc. 2, pp. 559–570, giu. 1993, doi: 10.20506/rst.12.2.702.
- [55] H. F. Liu, J. Ma, C. Winter, e R. Bayer, «Recovery and purification process development for monoclonal antibody production», *MAbs*, vol. 2, fasc. 5, pp. 480–499, 2010, doi: 10.4161/mabs.2.5.12645.
- [56] P. Tijssen e E. Kurstak, «Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays», *Anal Biochem*, vol. 136, fasc. 2, pp. 451–457, feb. 1984, doi: 10.1016/0003-2697(84)90243-4.

- [57] S. Baselli *et al.*, «ELISA Methods Based on Monoclonal Antibodies for the Serological Diagnosis of Lumpy Skin Disease», *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 2023, p. e8378153, lug. 2023, doi: 10.1155/2023/8378153.
- [58] «Agarosio Low EEO | Sigma-Aldrich». Consultato: 12 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <http://www.sigmaaldrich.com/>

Indice figure

<i>Figura 1: (a, g) Bovini che presentano segni clinici di Lumpy Skin Disease in India. (a, b, e, f) Presenza di noduli cutanei in tutto il corpo di una vacca indiana indigena. (c) Lesioni cutanee di un toro. (d) Opacità della cornea. (g) Grandi e gonfi noduli cutanei.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2: Situazione globale sulla diffusione della Lumpy Skin Disease. La patologia, inizialmente circoscritta al solo continente africano, ad oggi la si ritrova in diversi Paesi del Medio Oriente, oltre che in Russia ed in alcuni territori Europei</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3: Immagine schematica del genoma di LSDV. LSDV, così come tutti i virus appartenenti al genere Capripoxvirus, è dotato di un doppio filamento lineare di DNA. La regione centrale del genoma contiene circa 150 geni fondamentali per replicazione ed assemblaggio virale. Le regioni fiancheggianti invertite e ripetute contengono geni importanti per la virulenza</i>	<i>12</i>
<i>Figura 4: Immagine schematica dei due virioni di LSDV. A sinistra IMV, il virione maturo intracellulare dotato di una sola membrana esterna e liberato tramite lisi cellulare. A destra EV, il virione envelope extracellulare dotato di una doppia membrana esterna e liberato tramite esocitosi.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 5: Descrizione del processo di fusione di IMV ed EEV di Vaccinia Virus. (a-c) Micrografie elettroniche che descrivono l'ingresso di IMV tramite fusione con la membrana plasmatica dell'ospite. (a) Particelle di IMV legate alla cellula bersaglio tramite l'interazione delle proteine virali di superficie con GAG. (b) Fusione della membrana di IMV con quella plasmatica. (c) Rilascio del core virale nel citoplasma. (d-f) Micrografie elettroniche che descrivono l'ingresso di EEV. (d) Particelle di EEV legate alla cellula bersaglio. (e) Interruzione della membrana esterna di EEV che consente il contatto di IMV con l'ospite. (f) Fusione della membrana IMV e rilascio del core virale nel citoplasma.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6: (b) Le proteine presenti sulla parete del core virali vengono ubiquitinate e degradate dal proteasoma. (c) Il genoma virale, rilasciato nel citoplasma, si associa rapidamente alle membrane del reticolo endoplasmatico ed alle proteine virali</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7: Ciclo di vita di Vaccinia Virus, modello per la famiglia Poxviridae. Nel citoplasma della cellula ospite il genoma virale si replica al fine di ottenere virioni immaturi intracellulari che, processati, diventano maturi. Buona parte di IMV viene rilasciata dall'ospite tramite lisi, mentre una piccola frazione viene processata al fine di ottenere virioni intracellulari envelope (IEV). Questi, correttamente fusi con la membrana plasmatica, vengono a loro volta distinti in:</i>	

<i>CEV, virioni che rimangono adesi alla membrana cellulare, e EEV, virioni rilasciati per la diffusione a lungo raggio</i>	16
<i>Figura 8: Sequenza amminoacidica della regione extravirione di P32. Sottolineata la regione di overlap tra P32A e P32B</i>	24
<i>Figura 9: Prima strategia di espressione di sub-frammenti per la mappatura antigenica della proteina P32 di LSDV</i>	24
<i>Figura 10: Seconda strategia di espressione di sub-frammenti proteici per la mappatura antigenica della proteina P32 di LSDV</i>	25
<i>Figura 11: Mappa dei siti di restrizione di pET22b</i>	27
<i>Figura 12: Schema del clonaggio della sequenza nucleotidica codificante per la proteina/frammento proteico di interesse in pET22b; T7F e T7R rappresentano i primers che appaiano sul plasmide mentre HYS rappresenta la coda di sei istidine fondamentale per il passaggio di purificazione delle proteine</i>	27
<i>Figura 13: Mappa dei siti di restrizione di pET45b</i>	28
<i>Figura 14: Schema del clonaggio della sequenza nucleotidica codificante per la proteina/frammento proteico di interesse nel plasmide pET45; GCA è il codone non eliminabile codificate per l'Alanina e GTG, GGT, e ACC quelli codificanti per Valina, Treonina e Glicina</i>	28
<i>Figura 15: Multiple Cloning Site (MCS) del plasmide pET22b</i>	30
<i>Figura 16: Rappresentazione del metodo di clonaggio Gibson. L'enzima 5' esonucleasi taglia a livello delle regioni terminale omologhe dei frammenti di interesse. La DNA polimerasi riempie i gap generati mentre una DNA ligasi termostabile completa l'annealing tra i frammenti</i>	31
<i>Figura 17: A sinistra l'illustrazione del Multiple Cloning Site del plasmide pET45b; in arancio l'enzima di restrizione SacI ed in blu KpnI. A destra i siti di restrizione dei rispettivi enzimi</i>	33
<i>Figura 18: Suddivisione in griglie della Master plate contenente TOP10CC ricombinanti con il plasmide incorporato</i>	46
<i>Figura 19: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard su NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel e MES SDS Running Buffer. Marcatore utilizzato con il pre-casting Novex™ al 10-20% Tricine gel</i>	57
<i>Figura 20: SDS-PAGE band profile of the Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. Marcatore utilizzato con il NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel</i>	57
<i>Figura 21: Piastra a 96 pozzetti in cui è stato eseguito il dosaggio delle proteine/frammenti proteici con il metodo BCA</i>	60
<i>Figura 22: Schema rappresentativo dell'ELISA indiretta</i>	68
<i>Figura 23: Schema rappresentativo dell'ELISA Trapping indiretta</i>	68
<i>Figura 24: Regione extra-virione della proteina P32 envelope di Lumpy Skin Disease Virus. In rosso il frammento proteico P32A, in verde il frammento proteico P32B ed in arancio la regione di overlap di 40 amminoacidi</i>	72
<i>Figura 25: Struttura tridimensionale della regione extra-virione di P32. In rosso sono evidenziati i frammenti proteici prodotti a partire dal C-terminale mantenuto fisso</i>	73
<i>Figura 26: Illustrazione di ciascun amplificato ottenuto. A: Amplificazione di P32; B: Amplificazione dei plasmidi pET22 A e B con estremità Gibson (1-2) e pET45 (3); C: Amplificazione di P32A pET22(1-2) e P32B pET22(3-4) con estremità per</i>	

<i>il clonaggio Gibson; D: Amplificazione di P32B1-P32B6 con estremità per il clonaggio Gibson; E: Amplificazione di pET22 B1-B6 con estremità per il clonaggio Gibson</i>	74
<i>Figura 27: Esempio di Colony PCR per P32B pET22 (1207 nt). M: Marcatore di peso molecolare; 1-10: Colonie batteriche di P32B pET22</i>	74
<i>Figura 28: SDS-page per la valutazione della solubilità della proteina espressa. In rosso è evidenziato il profilo di Time-Course. 1: Marcatore di peso molecolare; 3-5: Controllo positivo e due controlli negativi; 6-10: Lisati della coltura batterica prelevati sequenzialmente ogni ora, partendo dal T0 (prelievo pre-induzione) fino al T4 (prelievo a 4 ore post-induzione)</i>	75
<i>Figura 29: SDS-page riassuntiva di tutte le proteine/frammenti proteici prodotti. M: Marcatore di peso molecolare; 1: Pellet batterico trattato in modo nativo della regione extra-virione di P32; 2: Controllo negativo; 4-11: Pellet batterici trattati in modo denaturante dei frammenti proteici P32A, P32B, P32B1-P32B6; 12: Pellet batterico trattato in modo denaturante della regione extra-virione di P32</i>	76
<i>Figura 30: SDS-page per la valutazione della purificazione del frammento proteico P32A. 1: Marcatore di peso molecolare; 3-5: Controllo positivo e due controlli negativi; 6: Passato attraverso la resina (FT); 7-8: Lavaggi della resina; 9-13: Eluizioni della proteina/frammento proteico di interesse</i>	77
<i>Figura 31: Western Blotting con anti-istidine eseguito su tutte le proteine/frammenti proteici prodotti. Tutti i frammenti proteici, ad esclusione di P32A e P32, sono stati caricati in diluizione 1:10 a partire dal lisato grezzo. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32; 2-3: Controlli negativi; 4: P32A; 5: P32B; 6-11: P32B1-P32B6</i>	78
<i>Figura 32: Western Blotting con P32 messa a 5ug in 100uL su pozzetto unico. M, 14: Marcatore di peso molecolare; 2, 15: Anti-istidine; 3, 16, 18: Vuoto; 4, 17: 2H3 S. Covid (CN) ; 6: 2B2; 7: 2A6; 8: 2C6; 9: 2A9; 10: 2C9; 11: 2C10; 12: 2F12; 13: 3H5; 19: 3D12; 20: 4E8; 21: 5C8; 22: 5F9; 23: 6G4; 24: 6B12; 25: 7B7; 26: 8C4; 27: 2F10</i>	79
<i>Figura 33: Illustrazione dei Western Blotting condotti con la selezione di AcM. A) Western Blotting del frammento proteico P32A caricato su pozzetto unico. M: Marcatore di peso molecolare; 1: AcM Anti-istidine; 2: AcM negativo; 3-10: AcM 2C6, 3H5, 2F10, 2F12, 8C4, 2C10, 2E11, 2A9. B) Esempio di Western Blotting di tutte le proteine/frammenti proteici ricombinanti. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 non denaturata; 2: Controllo negativo; 3: Vuoto; 4-11: Frammenti proteici P32A, P32B, P32B1-P32B6; 12: P32 denaturata</i>	80
<i>Figura 34: WB con l'AcM 2C10. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 nativa; 2: Controllo negativo; 3: Vuoto; 4: P32A; 4: P32B; 6-11: P32B1-P32B6; 12: P32 denaturata</i>	80
<i>Figura 35: Western Blotting con pool di sieri bovini positivi a LSDV. M: Marcatore di peso molecolare; 1: P32 nativa; 2: Controllo negativo (lisato grezzo di E. Coli trasformato con il plasmide vuoto); 3: P32A; 4: P32B; 5-10: P32B1-P32B6; 11: P32 denaturata</i>	81
<i>Figura 36: Istogramma che illustra la capacità di riconoscimento delle proteine/frammenti ricombinanti da parte degli AcM testati</i>	82

<i>Figura 37: Risultati dei 198 sieri bovini negativi testati in ELISA Trapping indiretta con il virus inattivo crudo (a) e la proteina P32 ricombinante (b).....</i>	83
<i>Figura 38: Sieroconversione individuata nei sieri bovini sperimentalmente infettati e testati in ELISA Trapping con il virus crudo inattivo (a) e la proteina P32 ricombinante (b).....</i>	83
<i>Figura 39: Profilo di antigenicit� (Jameson-Wolf), idrofobicit� e idrofilicit� (Kyte-Doolittle) della regione extra-virione di P32</i>	84
<i>Figura 40: Illustrazione dell'indice di antigenicit�, il plot di idrofobicit� ed il plot di idrofilicit�</i>	85

Indice tabelle

<i>Tabella 1: Sequenza amminoacidica e rispettivo peso molecolare dei sub-frammenti della P32 espressi</i>	25
<i>Tabella 2: Tabella riassuntiva dei plasmidi e delle tecniche utilizzate per i clonaggi effettuati nello studio.....</i>	29
<i>Tabella 3: Elenco dei primer per l'amplificazione di P32 ed il plasmide pET22b30</i>	
<i>Tabella 4: Elenco dei primer per l'amplificazione dei frammenti nucleotidici destinati al clonaggio in pET22b e del plasmide stesso</i>	31
<i>Tabella 5: Elenco dei primer per l'amplificazione dei frammenti nucleotidici destinati al clonaggio in pET45b</i>	33
<i>Tabella 6: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32 (6138 nt).....</i>	34
<i>Tabella 7: Profilo termico per l'amplificazione.....</i>	34
<i>Tabella 8: Reazione di PCR per amplificare P32 (828 nt).....</i>	34
<i>Tabella 9: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	35
<i>Tabella 10: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32A (5941 nt)</i>	36
<i>Tabella 11: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	36
<i>Tabella 12: Reazione di PCR per amplificare il pET22b per P32B (6200 nt)</i>	36
<i>Tabella 13: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	37
<i>Tabella 14: Reazione di PCR per amplificare P32A in pET22b (507 nt).....</i>	37
<i>Tabella 15: Reazione di PCR per amplificare P32B in pET22b (510 nt).....</i>	37
<i>Tabella 16: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	38
<i>Tabella 17: Protocollo di amplificazione dei plasmidi pET22 B1-B6 (6172-6177 nt)</i>	38
<i>Tabella 18: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	38
<i>Tabella 19: Protocollo di amplificazione dei frammenti P32B1-P32B6 in pET22b (386, 566, 626, 686, 746 e 806 nt)</i>	38
<i>Tabella 20: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	39
<i>Tabella 21: Volumi per l'amplificazione di P32A (490 nt)</i>	39
<i>Tabella 22: Volumi per l'amplificazione di P32B (493 nt)</i>	40
<i>Tabella 23: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	40
<i>Tabella 24: Calcoli per il clonaggio Golden Gate</i>	42
<i>Tabella 25: Reazione per il clonaggio Golden Gate</i>	42
<i>Tabella 26: Concentrazione dei frammenti e plasmidi per il clonaggio Gibson..</i>	43
<i>Tabella 27: Calcoli per il clonaggio Gibson</i>	43

<i>Tabella 28: Reazioni per il clonaggio in pET22b dei diversi frammenti della P32 attraverso il metodo Gibson. I volumi sono stati determinati in base ai calcoli sopra descritti.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabella 29: Reazione per la digestione del plasmide pET45b (5212 nt).....</i>	<i>44</i>
<i>Tabella 30: Reazione per la digestione di P32A in pET45b (490 nt).....</i>	<i>44</i>
<i>Tabella 31: Reazione per la digestione di P32B in pET45b (490 nt).....</i>	<i>44</i>
<i>Tabella 32: Calcoli per la ligazione plasmide-inserito</i>	<i>45</i>
<i>Tabella 33: Volumi per la ligazione di P32A e P32B in pET45b.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabella 34: Primer utilizzati per la Colony PCR.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabella 35: Reazione di Colony-PCR per valutare il clonaggio di P32 in pET22 (1189 nt).....</i>	<i>47</i>
<i>Tabella 36: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening</i>	<i>48</i>
<i>Tabella 37: Reazione di Colony-PCR valutare il clonaggio di P32A in pET22 (1204 nt)</i>	<i>48</i>
<i>Tabella 38: Reazione di Colony CPR per valutare il clonaggio di P32B in pET22 (1207 nt).....</i>	<i>48</i>
<i>Tabella 39: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening</i>	<i>48</i>
<i>Tabella 40: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B1 in pET22b (386 nt).....</i>	<i>49</i>
<i>Tabella 41: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B2 in pET22b (566 nt).....</i>	<i>49</i>
<i>Tabella 42: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B3 in pET22b (626 nt).....</i>	<i>49</i>
<i>Tabella 43: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B4 in pET22b (686 nt).....</i>	<i>49</i>
<i>Tabella 44: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B5 in pET22b (746 nt).....</i>	<i>50</i>
<i>Tabella 45: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B6 in pET22b (806 nt).....</i>	<i>50</i>
<i>Tabella 46: Profilo termico della reazione di amplificazione</i>	<i>50</i>
<i>Tabella 47: Colony PCR per valutare del clonaggio di P32A in pET45b (1764 nt)</i>	<i>50</i>
<i>Tabella 48: Reazione di Colony PCR per valutare il clonaggio di P32B in pET45b (1767 nt).....</i>	<i>51</i>
<i>Tabella 49: Profilo termico utilizzato per la PCR di screening</i>	<i>51</i>
<i>Tabella 50: Sequenza dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32 in pET22b</i>	<i>53</i>
<i>Tabella 51: Sequenze dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32A e P32B in pET45b.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabella 52: Sequenze dei primers utilizzati per il sequenziamento di P32A e P32B in pET22b.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabella 53: Sequenze dei primers per il sequenziamento di P32B1-P32B6 in pET22b.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabella 54: Descrizione delle proteine/frammenti proteici ricombinanti che sono stati caricati su gel per SDS-PAGE</i>	<i>57</i>
<i>Tabella 55: Concentrazione delle proteine/frammenti proteici prodotti.....</i>	<i>61</i>

*Tabella 56: Sieri bovini collezionati settimanalmente fino a 28 giorni post infezione sperimentalmente infettati con diversi ceppi di LSDV. Il virus usato per ogni animale ed i risultati di VTN (test di neutralizzazione virale), ID.vet Capripox DA ELISA, ELISA competitiva e indiretta basate su AcM sono riportati. I risultati positivi sono evidenziati con il simbolo * 63*

*Tabella 57: Isotopi e profilo di reattività dei Mabs reattivi in Western Blot contro il virus. La tabella riporta il valore OD dell'ELISA indiretta e la percentuale di inibizione (PI dell'ELISA competitiva tra i MAb testati (competitore) e i tre MAb coniugati alla perossidasi (PO). Una competizione alta è indicata con il simbolo *, una parziale con il simbolo + e l'assenza di simboli indica scarsa o nulla competizione..... 66*

Tabella 58: Elenco degli amplificati ottenuti e la lunghezza attesa corrispondente 73

Tabella 59: Elenco delle proteine/frammenti proteici ottenuti ed il clone corrispondente selezionato 75

Tabella 60: Elenco delle proteine/frammenti proteici ricombinanti ottenuti ed il peso molecolare corrispondente. Il peso molecolare del solo CPD è di 23kDa .. 77

Ringraziamenti

Ringrazio la relatrice, Prof.ssa Elisabetta Bergantino, e la controrelatrice, Prof.ssa Laura Cendron, sempre pronte a darmi dei consigli utili.

Ringrazio la Dott.ssa Giulia Pezzoni per avermi permesso di partecipare a questo progetto e per avermi guidata, con suggerimenti pratici, nella ricerca e nella stesura dell'elaborato. Ringrazio di cuore Manuel, per avermi aiutata ogni volta che ero in difficoltà, per avermi sostenuta quando ero immersa tra i dubbi sui calcoli e per avermi strappato sempre un sorriso nonostante gli ostacoli della ricerca. Ringrazio Anna, Roberto, Elena, Davide ed il resto del personale di laboratorio che fin dal primo giorno mi ha accolta calorosamente facendomi sentire subito parte integrante del gruppo. Sono stati nove mesi che mi porterò sempre nel cuore e che ricorderò con un sorriso grazie a voi.

Ringrazio i miei genitori che mi hanno permesso di continuare nel mio percorso di studi e mi hanno lasciato sempre la libertà di scegliere quello che più mi piace. Ringrazio mia mamma che con la sua forza mi ha insegnato che nella vita si può superare ogni difficoltà con l'amore della famiglia. Ringrazio mio papà che nonostante tutto è una roccia con il sorriso sempre stampato in faccia e mi ha insegnato che questo è il modo migliore per affrontare la vita.

Ringrazio Mattia che è sempre stato il fratello modello e l'esempio da seguire in tutto; grazie per aver alleviato l'ansia delle sessioni con battute improponibili. Ringrazio Veronica che, pur essendo la più piccola di casa, ha il carattere di una leonessa che mi ha insegnato come farsi rispettare da tutti. Ringrazio la nonna Teresina che mi ha sempre aiutata a passare gli esami con le sue preghiere ed i lumini accesi in chiesa.

Ringrazio Giovanni per essere sempre stato al mio fianco nei momenti in cui la mia ansia era insopportabile. Grazie per aver sempre creduto nelle mie capacità e nella mia determinazione; sei stato il mio fan numero uno fin dal principio ed ogni tuo "vedrai che andrai benissimo" mi ha aiutato a superare gli ostacoli. Grazie per essere la spalla che mi supporta e sopporta sempre e per credere in me molto più di quanto lo faccia io.

Ringrazio Nichole, l'amica che fin dalle superiori è stata al mio fianco e su cui so sempre di poter contare. Grazie per aver gioito con me ad ogni mio piccolo traguardo raggiunto, per avermi sostenuta nei momenti più difficili e per avermi fatto capire quanto valga un'amicizia così pura nella vita. Ringrazio Catia che tra i suoi impegni riesce sempre a trovare del tempo da passare insieme. Grazie per essere sempre rimasta anche quando gli altri se ne andavano e per essere l'amica sincera che tutti dovrebbero avere. Ringrazio il resto delle mie amiche e dei miei amici con cui ho passato momenti e serate indimenticabili.

Ringrazio Elena che è stata la compagna universitaria con cui ho condiviso gioie e disperazione e per essere stata la mia complice di laboratorio e grazie a tutte le mie amiche ed i miei amici universitari per aver condiviso questo cammino con me.

Infine, ringrazio me stessa per non aver mai mollato di fronte alle difficoltà e non essermi lasciata abbattere dalle mie insicurezze.