



Preparazione caratterizzazione della proteina E1A di adenovirus umano

Candidato: Irene Mongatti (irene.mongatti@gmail.com, irene.mongatti@stud.unifi.it)

Relatore: prof.ssa Roberta Pierattelli (roberta.pierattelli@unifi.it, pierattelli@cerm.unifi.it)

Il lavoro di tesi si è basato principalmente sull'individuazione di un protocollo di espressione per la proteina 13S codificata dal gene E1A.

Il protocollo è stato inizialmente approntato per la proteina non marcata, solo successivamente è stata espressa quella marcata con ^{15}N .

In primo luogo è stata effettuata la trasformazione utilizzando un ceppo di *E.coli* e il plasmide ricombinante che porta la resistenza alla kanamicina oltre che il gene della proteina in questione. Durante la fase successiva, quella di precoltura, sono stati aggiunti al terreno di coltura LB una colonia prelevata dalla piastra di Petri e la kanamicina. Successivamente è stata effettuata la coltura per permettere la crescita delle cellule, al termine di questa fase è stata effettuata l'induzione con IPTG e la proteina è stata quindi prodotta. L'ultima fase è stata quella di purificazione durante la quale la 13S è stata separata dalle altre proteine presenti tramite cromatografia su colonna, IMAC.

In entrambi i casi, sia per la proteina marcata che non, al termine della purificazione sono stati effettuati dei gel SDS-PAGE per controllare se la proteina fosse stata effettivamente espressa e per individuare in quale frazione fosse presente. Per avere ulteriore conferma di aver espresso correttamente la proteina è stato effettuato, in entrambi i casi, uno spettro NMR.

La purificazione della proteina non marcata ha richiesto meno passaggi ed è risultata più semplice, per la proteina marcata invece è stato necessario l'uso dell'urea per consentire l'estrazione dalla frazione insolubile.