

Relazione finale

Laboratorio di Biologia Molecolare

Chiara Solito

Corso di Laurea in Bioinformatica
Università degli studi di Verona
A.A. 2020/21

La presente è la relazione finale per il corso di **Laboratorio di Biologia Molecolare** del CdS in Bioinformatica (Università degli Studi di Verona) - A.A. 2020/21.

Contents

1 MINIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO.	
Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina	2
2 Estrazione dell'RNA totale con TRIZOL	5
3 Quantificazione dell'RNA totale e del DNA mediante Spettrofotometro nanodrop	7
4 Restrizione del DNA	9
5 PCR: Polymerase Chain Reaction	12
6 Preparazione di piastre LB-agar e Cellule Competenti	14
7 Trasformazione di cellule di E.Coli DH5a	16
8 Elettroporazione di cellule competenti di E.Coli BL21	18
9 Colony PCR	20
10 Espressione eterologa di proteine e loro purificazione	24
11 Elettroforesi SDS-Page denaturante	26
12 Western Blotting	29
13 Ricostituzione in vitro di una proteina di membrana (Folding)	32
14 Cromatografia di affinità	34

1 MINIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina (MINIPREP MANIATIS)

Obiettivo

Estrazione di DNA plasmidico da una coltura batterica.

Introduzione e cenni teorici necessari

I plasmidi sono elementi genetici extracromosomici che si replicano autonomamente in cellule batteriche. Normalmente essi hanno DNA circolare a doppio filamento, superavvolto, anche se esistono dei plasmidi con DNA lineare.

Nella tecnologia del DNA ricombinante possono essere utilizzati per introdurre frammenti di DNA di nostro interesse in altre cellule, come vettori di clonaggio; per fare ciò vengono usati dei derivati di plasmidi naturali che sono stati "ingegnerizzati" in modo da rispondere a ben precisi requisiti. Dopo essere stati ingegnerizzati, hanno bisogno quindi di essere "preparati", dobbiamo isolare il DNA plasmidico e separarlo dal DNA del cromosoma: il metodo di preparazione dei plasmidi da noi usato in laboratorio si basa sulla lisi delle cellule in condizioni alcaline con conseguente denaturazione del DNA, seguita da rapida rinaturazione. Viene sfruttato del DNA plasmidico preparato in piccole quantità da diverse colture di batteri contenenti plasmidi. I batteri sono lisati tramite un trattamento con soluzione contenente sodio dodecil sulfato SDS e NaOH. La miscela è neutralizzata con potassio acetato che permette la rinaturazione del DNA plasmidico a differenza di quello genomico, poi rimosso da una centrifugazione. Infine il DNA plasmidico viene concentrato per precipitazione in etanolo.

Strumenti utilizzati

- Eppendorf
- Vortex
- Centrifuga
- Cappa sterile
- Micropipetta
- Coltura batterica cresciuta o/n (over night)

Soluzioni utilizzate nell'esperimento

- Soluzione 1:
è necessaria per risospendere le cellule e porle nelle condizioni adatte alla successiva lisi. La soluzione è isosmotica grazie alla presenza di glucosio. Contiene anche l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), come agente chelante che impedisce agli ioni Mg²⁺ di agire da coenzimi per DNasi, rendendole inattive, garantendo l'estrazione e la conservazione di DNA integro, in qualsiasi condizione di lavoro. Il pH della soluzione è basico.
- Soluzione 2:
a base di idrossido di sodio (NaOH). Permette la lisi alcalina con la quale il DNA genomico e plasmidico denaturano e precipitano. L'SDS (sodio dodecilsolfato) è un detergente che in ghiaccio precipita perdendo di efficacia per cui, la soluzione II va mantenuta a temperatura superiore.
- Soluzione 3:
riporta il lisato cellulare a pH che consente la rinaturazione del DNA plasmidico.
- TE:
soluzione tampone standard (contenente tris ed EDTA)
- Soluzione fenolo:cloroformio:isoamilico (25:24:1)
una soluzione sinergica altamente deproteinizzante che serve per eliminare i possibili contaminanti del DNA per evitare che interferiscano con i successivi trattamenti, specialmente nel caso in cui si lavori con enzimi di restrizione.

- Etanolo (100% v/v e 70% v/v).

Fasi Preliminari

Prelevare 1.5 ml di coltura batterica cresciuta o/n

L'estrazione del DNA plasmidico deve esser effettuata a partire da colture fresche, in quanto l'utilizzo di colture vecchie potrebbe influenzare negativamente la corretta purificazione del DNA a causa dell'accumulo di metaboliti secondari. La quantità esatta di coltura batterica prelevata non è importante: si tende tuttavia a riempire l'eppendorf per massimizzare la quantità di DNA estratto. Non è indispensabile l'utilizzo di una cappa sterile: l'eventuale presenza di DNasi esogene viene contrastata con l'utilizzo, nelle fasi successive, di EDTA.

Centrifugare per 30 secondi a 12000 rpm e eliminare il supernatante.

L'operazione può essere effettuata a 4°C o a temperatura ambiente indipendentemente: una volta si operava con microcentrifughe refrigerate per rallentare il metabolismo cellulare e quindi ridurre l'azione delle nucleasi. Oggi si ritiene superflua questa operazione e si preferisce operare a temperatura ambiente (23-25°C). Il tempo e la velocità della centrifugazione devono essere tali da consentire la formazione di un pellet più o meno compatto (quelli riportati sono valori di centrifugazione indicativi: se il pellet è instabile procedere con un'ulteriore centrifugazione). Per eliminare il suratante è sufficiente versare il contenuto del tubo capovolgendolo e picchiettarlo leggermente, con tappo aperto, su carta cercando di allontanare le eventuali goccioline di terreno residue, tale operazione consente di non modificare le concentrazioni delle tre soluzioni in seguito utilizzate.

Procedimento

1. Risospendere il pellet batterico in 100 μ L di Soluzione I.

Per la risospensione si può utilizzare il vortex o il puntale di una pipetta, in quanto le cellule sono ancora integre ed il DNA è protetto.

2. Aggiungere 200 μ L di Soluzione II.

Mescolare capovolgendo il tubo due o tre volte. In questa fase la soluzione alcalina provoca la lisi delle cellule e la denaturazione e precipitazione delle molecole di DNA genomico e plasmidico. Quindi, le molecole di DNA diventano estremamente fragili, per questo si deve mescolare adeguatamente ma evitando azioni troppo energiche (vortex) per non rompere meccanicamente il DNA stesso. Si ottiene un lisato cellulare viscoso e biancastro.

3. Aggiungere 150 ml di soluzione III entro 2-3 minuti dall'aggiunta della Soluzione II e mescolare capovolgendo il tubo due o tre volte

Anche in questo caso non vortexare per non di rompere il DNA. Con l'aggiunta della soluzione III si riporta il lisato cellulare a pH che consentono la riabirazione del DNA plasmidico. Il tempo di attesa che precede l'aggiunta della soluzione è fondamentale per la separazione del DNA plasmidico dal genomico: il DNA plasmidico, proprio perché superavvolto e di piccole dimensioni, se mantenuto in condizioni di lisi per un tempo non superiore ai 3-4 minuti riesce a rinaturare, mentre il DNA genomico e le proteine rimangono intrappolate irreversibilmente nel complesso formato da potassio e SDS. Nel caso la soluzione II venisse lasciata agire per periodi più lunghi, il DNA plasmidico sarebbe comunque in grado di rinaturare ma assumerebbe una conformazione tale da risultare inattaccabile dagli enzimi di restrizione.

4. Centrifugare a massima velocità per 5 min. e recuperare il supernatante in un nuovo tubo

Questo tempo deve essere rispettato per permettere la sedimentazione dei residui cellulari. Si consiglia di prelevare una quantità di surnatante non superiore a 300l in vista dall'aggiunta di un volume doppio di etanolo nelle fasi successive.

5. Trattamento con fenolo-cloroformia per eliminare le proteine rimanenti.

Nota: il trattamento è opzionale ma in questa esperienza si è scelto di utilizzarlo.

5.1 Aggiungere alla soluzione contenente il DNA 1 vol. di fenolo:cloroformio:isoamilico (25:24:1)

La presenza dell'isoamilico serve per semisaturare il cloroformio che altrimenti puro avrebbe la tendenza a disidratare il campione.

5.2 Miscelare le due fasi (non vortexare)

Agitare vigorosamente fintanto che il campione non si presenta lattiginoso.

5.3 Centrifugare almeno 3 minuti

Si formano due fasi distinte: quella inferiore di fenolo-cloroformio e quella superiore con il DNA in soluzione. L'interfaccia bianca è data dalle proteine denaturate.

5.4 Recuperare la fase superiore, contenente DNA

Importante è evitare di creare vortici che smuovano lo strato inferiore ed evitare di trasportare nel nuovo tubo tracce di fenolo-cloroformio (visibili in controluce come "sferette" vetrose), perché queste degraderebbero gli enzimi utilizzati in seguito.

6. Precipitare il DNA con due vol. di etanolo (100% v/v) oppure con 0.6 vol. di isopropanolo.

L'etanolo è aggiunto al 100% per ottenere una soluzione finale al 70%. Per esempio a 100 μL di DNA si aggiungono 200 μL di etanolo assoluto oppure 60 ml di isopropanolo. In questa fase è necessario capovolgere il tubo delicatamente: il DNA deve venire a contatto con l'alcol per precipitare.

7. Centrifugare a 12000 rpm per 5 min.

Se il DNA è sporco è possibile vedere il pellet bianco sul fondo del tubo. Se è presente una grande quantità di polisaccaridi il pellet è mucillaginoso.

8. Rimuovere il supernatante e lavare con etanolo 70% v/v.

Per eliminare l'etanolo capovolgere la provetta aperta e scuotere leggermente su un pezzo di carta, oppure effettuare un breve passaggio in centrifuga (30 secondi a massima velocità) per far scendere eventuali goccioline sul fondo del tubo e quindi aspirarle con una micropipetta. Il lavaggio con EtOH 70% serve a eliminare i sali rimasti. Versare nel tubo circa 500 μL di EtOH 70%.

9. Rimuovere completamente l'etanolo e lasciare seccare all'aria per 10 minuti.

Per eliminare l'etanolo aspirarlo con una micropipetta senza rompere il pellet, eventualmente ripetere una breve centrifugazione come spiegato al punto 3. È importante che il pellet sia completamente asciutto perché la presenza di tracce di etanolo determina una scarsa risospensione del DNA, soprattutto, ne provoca la fuoriuscita dal pozzetto quando si effettua il caricamento su gel di agarosio per un'elettroforesi. Questo passaggio può esser velocizzato ponendo la provetta in un luogo ben aerato, per esempio in una cappa a flusso laminare.

10. Risospender il DNA plasmidico in 50 μL di TE pH 8.0.

Si risospende in TE per evitare il pericolo di degradazione del DNA da parte delle DNAsi, infatti, la presenza di EDTA nel TE garantisce protezione dalle DNAsi.

11. Conservare a 4°C.

Se si risospnde in acqua si deve conservare a -20°C (la bassa temperatura blocca le DNAsi)

Conclusioni

Ho ottenuto DNA purificato. Il grado di purezza del campione ottenuto in questa sede verrà poi verificato in seguito.

Un'alternativa a questa esperienza è la purificazione con colonna di silice. Entrambe le modalità sono oggi vendute come kit commerciali (che hanno ressa maggiore e sono più rapidi, ma sono ovviamente più costosi).

2 Estrazione dell'RNA totale con TRIZOL

Obiettivo

Ottenere dell'RNA purificato. Infatti prima di poter manipolare gli acidi nucleici in qualsiasi modo, è necessario isolarli e purificarli: ovvero ottenere da una sospensione cellulare, una soluzione arricchita dell'acido nucleico di interesse con un grado di purezza che sia il più alto possibile. Nel caso dell'RNA, questo è reso estremamente difficile dall'enorme presenza di RNasi (enzimi che degradano l'RNA) nell'ambiente circostante.

Introduzione e cenni teorici necessari

Una tipica cellula di mammifero contiene circa 20-30 picogrammi di RNA.

La popolazione di RNA cellulari è molto eterogenea:

RNA totale:

- RNA codificante (4%):
Comprende le molecole di mRNA citoplasmatico e i precursori nucleari (hnRNA: heterogeneous nuclear RNA)
- RNA non codificante (96%)
 - RNA ribosomiali: 28S, 18S, 5,8S e 5S, con i relativi precursori, che costituiscono fino all'80% dell'RNA totale
 - tRNA e altri piccoli RNA a localizzazione nucleare, nucleolare o citoplasmatica (snRNA, snoRNA, scRNA)

L'RNA normalmente è costituito da un filamento singolo → molto meno stabile del DNA, si degrada facilmente anche per l'azione degli enzimi ad attività RNAsica rilasciati in seguito alla lisi cellulare. La purificazione del RNA viene condotta lavorando sempre a bassa temperatura (4 °C) e con soluzioni trattate con DEPC (dietylpirocarbonato, vedi sotto). Il protocollo comunemente utilizzato prevede la lisi cellulare mediante trattamento con detergenti o omogenizzazione meccanica (macinazione in azoto liquido nel caso di materiale vegetale) ed il trattamento con un TRIZOL (approfondito più avanti).

Strumenti e materiali utilizzati

- Pestello e mortaio
- Eppendorf da 2ml
- Centrifuga che mantiene la temperatura
- Vortex
- Spatola da laboratorio
- Pipette a 3 gradazioni diverse
- Foglie di tabacco

Soluzioni utilizzate nell'esperimento

- Azoto liquido:
utilizzato per riuscire a polverizzare i tessuti da analizzare.
- TRIZOL:
un composto a base fenolica in grado di inattivare gli enzimi degradativi (RNAsi) e capace di denaturare e far precipitare la maggior parte dei componenti cellulari ed in particolare le proteine ed il DNA. Esso mantiene l'integrità degli acidi nucleici e allo stesso tempo lisa la cellula e ne distrugge i componenti.

È costituito da una miscela di guanidina istotiocianato e fenolo. La guanidina istotiocianato è sia un potente inibitore di RNasi e DNasi sia un agente caotropico importante per la denaturazione delle proteine.

- Fenolo-cloroformio:
(come nel precedente esperimento)
una soluzione sinergica altamente deproteinizzante che serve per eliminare possibili contaminanti dall'RNA per evitare che interferiscano con i successivi trattamenti, specialmente nel caso in cui si lavori con enzimi di restrizione.
- 2-propanolo:
utilizzato per precipitare l'RNA purificato.
- Acqua DEPC:
soluzione utilizzata per risospendere l'RNA. Il Dietilpirocarbonato (DEPC) è un potente inibitore delle RNasi che si può aggiungere alle soluzioni acquose, che si attiva dopo passaggio in autoclave della soluzione con DEPC aggiunto.

Procedimento

1. Triturare le foglie in un mortaio versando azoto liquido fino ad ottenere una polvere. Trasferire circa 100 mg di campione (1-2 spatole) all'interno di 1 Eppendorf da 2 ml.
2. Risospendere i tessuti triturati in TRIZOL (1 ml per 50-100 mg di tessuto) e vortexare 10 secondi.
3. Lasciare il campione per 5 minuti a temperatura ambiente per assicurare la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici.
4. Aggiungere 0.2 ml di cloroformio per ml di TRIZOL usati e vortexare vigorosamente per 15 secondi.
5. Lasciare 15 minuti a temperatura ambiente.
6. Centrifugare a 12000xg per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione permette di ottenere tre fasi: una fase organica rossa (contenente le proteine), un'interfase (contenente il DNA genomico precipitato) e una fase acquosa superiore (contenente l'RNA).
7. Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta e aggiungere 0.5 ml di 2-propanolo per ml di TRIZOL usati e mescolare.
8. Lasciare 20 min a -20 °C e successivamente centrifugare a 12000xg per 10 minuti a 4°C. L'RNA precipita formando un pellet nel fondo della provetta.
9. Rimuovere il surnatante e lavare il pellet aggiungendo 1 ml di etanolo 70% per ml di TRIZOL usato.
10. Vortexare il campione e centrifugare a 12000xg per 5 minuti a 4°C.
11. Asciugare il pellet (RNA) per 10 minuti all'aria (non aspettare che l'RNA si asciughi completamente).
12. Aggiungere al pellet un volume appropriato (50-100 uL) di acqua DEPC e rispondere.

Conclusioni

Saremo in grado di stabilire la purezza dell'RNA ottenuto in questa esperienza, nella prossima.
Si può utilizzare l'RNA totale per molte analisi: ad esempio *northern hybridization*, *RNase protection*, *dot/slot blotting*, *sintesi di cDNA*, ecc. Oppure si può effettuare una purificazione per cromatografia e ottenere la frazione Poly(A⁺) per effettuare *mappatura S1*, *mappatura di RNasi*, *estensione di primer*, *costruzione di librerie di cDNA*, ecc. Esistono anche in questo caso dei kit commerciali che si basano sull'utilizzo di resine in grado di legare l'RNA e che di solito garantiscono una resa più alta ed un prodotto finale più puro.

3 Quantificazione dell'RNA totale e del DNA mediante Spettrofotometro nanodrop

Obiettivo

La qualità e la quantità del DNA o dell' RNA ottenuto possono essere determinati attraverso diversi metodi analitici. Il metodo che vediamo per quantificare RNA e DNA del plasmide pUC18 è attraverso lo spettrofotometro nanodrop.

Introduzione e cenni teorici necessari

Lo spettrofotometro nanodrop è uno spettrofotometro UV-VISIBILE che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm. Il sistema consente di leggere il campione sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che mantiene il campione sotto forma di goccia in sede di lettura. La sorgente luminosa è una lampada allo Xenon; una camera CCD rileva la luce dopo il passaggio attraverso il campione. Col NanoDrop è possibile leggere campioni non diluiti consentendo così di ridurre gli errori che vengono commessi operando le diluizioni. Il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo ($1\mu\text{L}$), pertanto è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta.

Per determinare la purezza del campione si calcola il rapporto tra l'assorbimento a 260 nm (DNA) e a 280 nm (proteine). In una preparazione pura questo rapporto è $>$ di 1.7.

Strumenti utilizzati

- H_2O (acqua)
- Carta assorbente
- Spettrofotometro nanodrop
- Campioni di DNA ed RNA preparati precedentemente

Procedimento

1. Depositare una goccia ($2 \mu\text{L}$) di acqua sul tip del nanodrop.
2. Abbassare delicatamente il braccio e registrare il bianco.
3. Sollevare il braccio, asciugare il tip con della carta assorbente.
4. Depositare una goccia ($2 \mu\text{L}$) di campione sul tip del nanodrop.
5. Abbassare delicatamente il braccio e registrare lo spettro.
6. Calcolare la quantità di RNA ($A = 1 \Rightarrow 40\text{ng}/\mu\text{L}$) e la sua purezza (rapporto A_{260}/A_{280}).
7. Congelare l'RNA non diluito ed il plasmide pUC18.

Conclusioni

Dalle mie misurazioni:

Campione	Quantità	Purezza (A_{260}/A_{280})	A_{230}/A_{260}
DNA	1111.4	1.98	2.25
RNA	401.9	1.88	1.33

Osservazioni: entrambi i valori sono al di sopra di 1.7 quindi posso considerare la preparazione pura (data dal rapporto A_{260}/A_{280}).

Le foto:

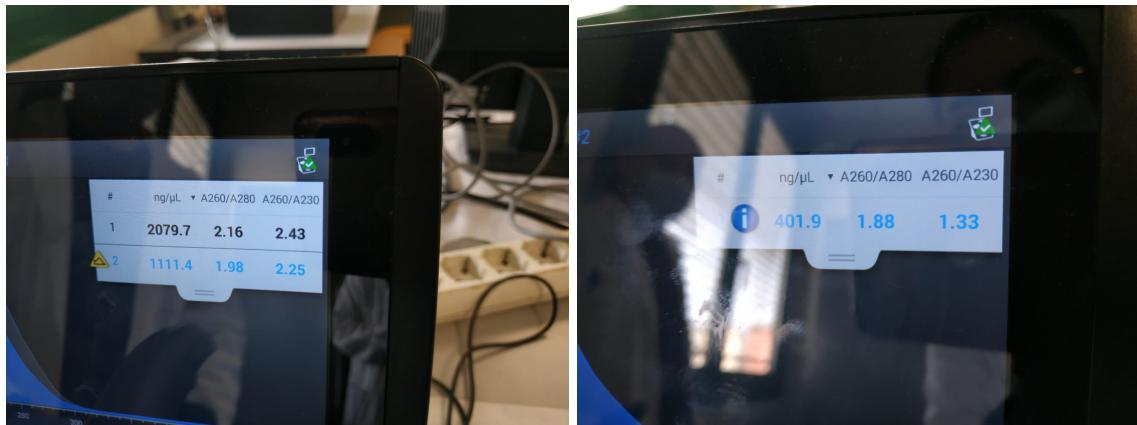


Foto da monitor nanodrop

sono i risultati dell'esperimento riportati nella tabella sopra.

L'alternativa a questo esperimento da poter replicare in laboratorio era l'analisi con spettrofotometro a cuvetta, di cui ci è stato mostrato solo il macchinario, poiché la quantità di DNA plasmidico non era sufficiente per fare una diluizione e ottenere dei risultati affidabile; abbiamo utilizzato lo spettrofotometro nanodrop che permette di misurare la concentrazione del campione da una goccia di soluzione.

4 Restrizione del DNA

Obiettivo

Visualizzare il confronto tra frammenti di DNA ottenuti dalla reazione di digestione del DNA plasmidico con l'utilizzo dell'enzima di restrizione EcoRI e il controllo negativo.

Introduzione e cenni teorici necessari

La funzione di un enzima di restrizione è di "digerire" il DNA plasmidico su punti specifici detti siti di restrizione.

Visualizziamo i frammenti tramite l'elettroforesi su gel. L'elettroforesi è costituita da un movimento di cariche in un campo elettrico. È il metodo più comune per separare molecole di DNA, RNA e proteine e trova numerose applicazioni in biologia molecolare. Vengono utilizzati due diversi tipi di gel: noi usiamo gel di agarosio. L'agarosio è un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro a seconda della sua concentrazione. È quindi la percentuale di agarosio che determina la gamma dei frammenti di DNA, RNA o proteine che vengono separati.

Strumenti e materiali utilizzati

- Eppendorf
- Microonde
- Beuta
- Vaschetta elettroforetica
- Pettinino
- Nastro adesivo di carta
- Pipette
- Alimentatore per la corsa elettroforetica
- Plasmide pUC18
- H_2O
- Agarosio
- SYBR Safe
 - È un colorante per DNA che si illumina con un colore verde brillante quando viene eccitata con luce UV.
- EcoRI
- Buffer 10X
 - È composto da una soluzione di Tris-borato-EDTA, e l'EDTA sequestra i cationi bivalenti. Il buffer TBE è particolarmente utile nella separazione di piccoli frammenti di DNA (peso molecolare < 1000), ad esempio piccoli prodotti risultanti dalla digestione con enzimi di restrizione.
- TAE 50X
 - Tris base
 - Il termine tris base è usato per denominare il composto tris (idrossimetil) amminometano, avente la formula chimica C₄H₁₁NO₃. È anche conosciuto come THAM. È un composto organico utilizzato come componente nelle soluzioni tampone TAE e buffer TBE.*
 - Acido Acetico Glaciale
 - EDTA
 - Acqua distillata

Procedimento

1. Restrizione del DNA plasmidico

1.1 Vengono preparati due eppendorf, la prima contenente l'enzima di restrizione e l'altro senza.

1.1.1 Eppendorf 1 - campione direazione

- Prelievo di 10 μ L di pUC18 (DNA plasmidico)
- Aggiunta di 11.5 μ L di acqua e 2.5 μ L di buffer 10X per facilitare l'azione dell'enzima

- Aggiunta per ultimo di $1\mu\text{L}$ di EcoRI (enzima di restrizione)

1.2.1 Eppendorf 2 - controllo negativo

- Prelievo di $10\ \mu\text{L}$ di pUC18 (DNA plasmidico)
- Aggiunta di $12.5\ \mu\text{L}$ di acqua e $2.5\ \mu\text{L}$ di buffer 10X

1.2 Le digestioni preparate vengono lasciate per 1 ora circa a 37°C.

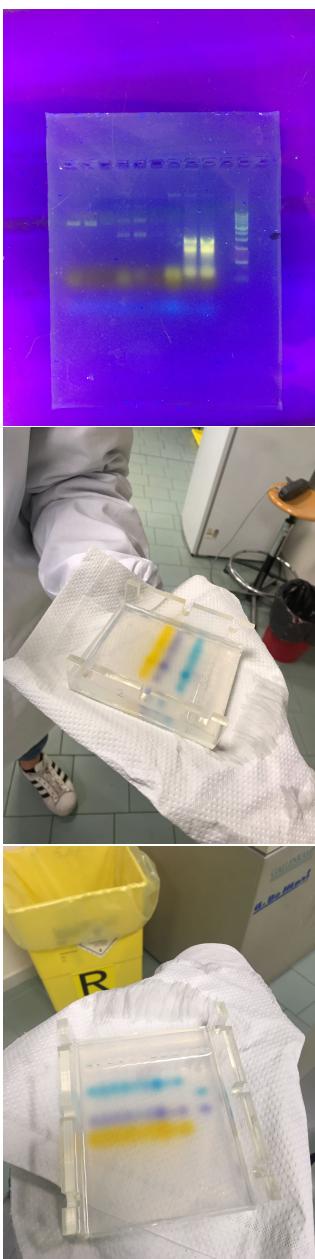
2. Preparazione TAE 50X (50 ml)

- 2.1 Pesare 12.2 g di Tris base
- 2.2 Aggiungere 2.8 ml di acido acetico glaciale (sotto la cappa chimica)
- 2.3 Aggiungere 5 ml di EDTA 0.5 M pH 8.0
- 2.4 Portare a volume con acqua distillata
3. Pesare la quantità necessaria di agarosio per un gel allo 0.8%, aggiungere il TAE 1X e portare a volume. Per 0.6g agarosio, aggiungere 1.6ml TAE 50X e 78.4ml H_2O . Il totale deve essere 80ml.
4. Scaldatare nel forno a microonde in una beuta senza fare bollire e mescolare ogni tanto per sciogliere bene l'agarosio. Aspettare qualche minuto e aggiungere $5\mu\text{L}$ di SYBR Safe; mescolare e versare nell'apposita vaschetta precedentemente preparata. Aggiungere un pettinino a lato, ed aspettare per circa 30 minuti che il gel si solidifichi.
5. Il gel solidificato va posto nella vaschetta di corsa senza il pettinino e coperto con 250 ml di buffer di corsa (TAE 1X).

Campioni da caricare:

- $25\mu\text{L}$ pUC18 digerito (+ $5\mu\text{L}$ Sample Buffer)
 - $25\mu\text{L}$ pUC18 non digerito (+ $5\mu\text{L}$ Sample Buffer)
 - $25\mu\text{L}$ RNA totale (+ $5\mu\text{L}$ Sample Buffer)
6. Aggiungere poi in un altro pozzetto $5\mu\text{L}$ di DNA ladder (marcatore di pesi molecolari).
 7. Impostare nell'alimentatore il voltaggio per la corsa eletroforetica (90-100 V).

Conclusioni



- I risultati ottenuti non sono esattamente quelli attesi. Le bande di DNA digerito sono più evidenti (come ci si aspettava), mentre la banda dell'RNA non è ben visibile (segno che probabilmente è avvenuta digestione dell'RNA), com'è possibile vedere in foto.
- Il DNA ladder produce tutte le bande e viene usato come unità di misura per la lunghezza dei frammenti.
- Il DNA plasmidico digerito deve produrre una banda spessa
- Il DNA non digerito invece produce una banda più sottile
- L'RNA ha lunghezza variabile e quindi nella corsa viene suddiviso e crea così una strisciata continua (visibile negli ultimi due pozzetti).

Il gel di agarosio non ha il potere risolutivo per separare molecole di DNA che differiscono soltanto per uno o pochi nucleotidi. Per questo scopo vengono invece utilizzati i gel di poliacrilammide i quali riescono a separare frammenti diversi anche di un solo nucleotide (range 1-1000 bp) grazie a pori di dimensioni minori rispetto a quelli di agarosio. A differenza di quelli dell'agarosio, i legami formati nella poliacrilammide sono irreversibili.

5 PCR: Polymerase Chain Reaction

Obiettivo

Visualizzare il tratto di DNA amplificato tramite PCR.

Introduzione e cenni teorici necessari

La PCR è una tecnica per replicare ripetutamente (amplificare), in modo molto selettivo, un tratto ben definito di DNA del quale si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali, partendo da una soluzione dello stesso. In questo modo è possibile isolare e studiare un qualsiasi tratto di DNA a partire da un campione biologico da cui è possibile recuperare tracce di DNA. Come per la replicazione del DNA in un organismo, la PCR richiede un enzima DNA polimerasi che crea nuovi filamenti di DNA, usando fili esistenti come modelli. La DNA polimerasi tipicamente utilizzata nella PCR è chiamata Taq polimerasi, dal nome del batterio dal quale è stata ottenuta (*Thermus aquaticus*). La stabilità al calore rende la Taq polimerasi ideale per la PCR. Gli ingredienti chiave di una reazione PCR sono Taq polimerasi, primer, DNA modello e nucleotidi (blocchi di costruzione del DNA). Gli ingredienti sono assemblati in un tubo, insieme ai cofattori necessari all'enzima, e sono sottoposti a cicli ripetuti di riscaldamento e raffreddamento che consentono di sintetizzare il DNA.

Strumenti utilizzati

- Termociclatore
 - apparecchio che permette di ottenere i cicli di temperatura necessari per la reazione di PCR.
È composto da una piastra riscaldante con alloggiamenti per i campioni in grado garantire rapidi cambi di temperatura.
- Eppendorf da 250 μL
- Micropipetta
- Beuta
- Forno a microonde
- Soluzione da amplificare
- Componenti della mix (*a lato →*)
 - H_2O sterile
 - buffer TAQ (10X)
 - MgCl_2 (50 mM)
 - Primer FOR
 - Primer REV
 - Sono dei corti frammenti di DNA, della lunghezza di 18-20 basi, utilizzati per allungare il segmento dato.*
 - dNTPs (10 mM)
 - La funzione dei dNTP nella PCR è di espandere il filamento di DNA in crescita con l'aiuto della Taq DNA polimerasi.*
 - DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000 bp.
 - TAQ polimerasi

Procedimento

1. In un eppendorf da 250 μL preparare la seguente mix:

- 12 μL H_2O sterile
- 2 μL buffer TAQ (10X)
- 1 μL MgCl_2 (50 mM)
- 1 μL Primer FOR (25 μL)
- 1 μL Primer REV (25 μL)
- 1 μL dNTPs (10 mM)
- 1 μL DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000 bp.
- 1 μL TAQ polimerasi

totale: 20 μL

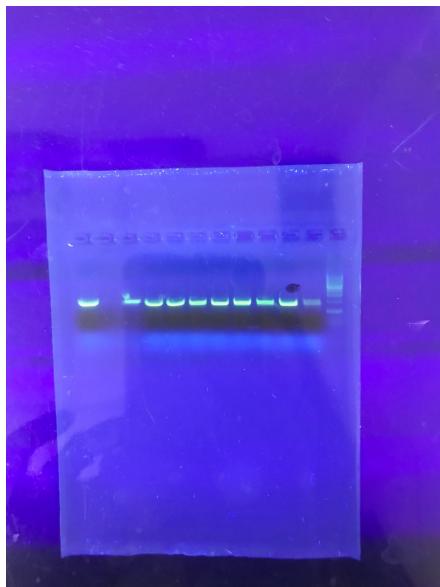
Nota: Prestare attenzione a non contaminare!

2. Vortexare la soluzione.
3. Effettuare il programma della PCR:

Step	Temperature	Tempo
Denaturazione iniziale	95°	3 minuti
Amplificazione (35 cicli)	95° (denaturazione)	30 secondi
Annealing	55°	30 secondi
Estensioni	72°	60 secondi
Estensione finale	72°	5 minuti

4. Preparazione del gel agarosio 0.8 % (come nell'esperienza precedente).
5. Al campione risultante dalla PCR bisogna aggiungere $4\mu\text{L}$ di LB ottenendo $24\mu\text{L}$ di soluzione. Diluire la soluzione ("6 per il campione") e ricavarne $20 \mu\text{L}$ da inserire nel gel.

Conclusioni



Dall'immagine si può concludere che la PCR è avvenuta con successo in quanto è presente una banda che corrisponde alle dimensioni della sequenza target.

In particolare il contrasto tra le bande fluorescenti e il secondo pozzetto a destra (controllo negativo) rende evidente che è avvenuta PCR. Il plasmide pUC18 digerito produce una sola banda corrispondente alla sua lunghezza, il plasmide non digerito invece non produce risultati.

6 Preparazione di piastre LB-agar e Cellule Competenti

Obiettivo

In questa esperienza vogliamo preparare il terreno di coltura complesso utile alla prossima esperienza in cui vedremo la trasformazione delle cellule di E.Coli.

Introduzione e cenni teorici necessari

Nei laboratori si usano comunemente vari ceppi (strains) selezionati e modificati di Escherichia coli (batterio gram negativo non patogeno) che, a seconda del genotipo (con mutazioni su particolari geni o introduzione di geni estranei), vengono utilizzati per diversi scopi. Per la crescita delle cellule e per l'espressione di proteine ricombinanti non modificate, si usano terreni di coltura complessi. I mezzi complessi impiegano estratti grezzi di sostanze come la caseina (proteina del latte), proteine animali, soia, estratti di lieviti, e altre sostanze altamente nutritive. Queste sostanze sono commercialmente disponibili in polvere e possono essere pesate e aggiunte al mezzo di coltura. (*A differenza dei mezzi di coltura minimi che hanno già a disposizione gli amminoacidi necessari. senza doverli ricavare da altre proteine e che quindi sono utilizzati per compiere delle analisi più precise.*)

In questa esperienza preparamo terreno LB(Luria Bertani medium): 1% triptone, 0.5% estratto di lievito, 0.5% NaCl. (se le cellule contengono un plasmide con una resistenza, si aggiunge l'antibiotico opportuno per la selezione).

Le cellule competenti invece sono cellule, sottoposte a processi chimici/fisici, così che siano in grado di acquisire DNA esogeno dall'ambiente in un processo chiamato trasformazione (verrà spiegato meglio nella prossima esperienza).

Le cellule batteriche di E. Coli vengono sottoposte a un trattamento con buffer specifici contenenti *CaCl₂* (ma funzionano anche altri sali come *RbCl₂*) e assumono la capacità di legare le molecole di plasmide sull'esterno della cellula, questo poi viene internalizzato mediante shock termico.

Strumenti e materiali utilizzati

- Pipetta
- Centrifuga
- Bilancia di precisione
- Bottiglietta di vetro
- Nastro autoclave
- Autoclave
- Cappa biologica
- Provette Falcon
- Eppendorf
- Piastre di Petri
- Micropipette
- Coltura fresca (cresciuta o/n) di E.coli

- Trypone

Il triptone è l'assortimento di peptidi formati dalla digestione della caseina mediante la proteasi della tripsina.

- Yeast extract (estratti di lievito)

Gli estratti di lievito sono costituiti dal contenuto cellulare del lievito senza le pareti cellulari. Sono utilizzati come additivi o aromi alimentari o come nutrienti per i terreni di coltura batterica.

- NaCl
- Agar batteriologico
- *H₂O*
- E.Coli
- Buffer 1
- Buffer 2
- Azoto liquido
- Ampicillina

Composizione buffer 1 e 2:

• Buffer 1:

- RbCl 12 g (0.6 g)
- MnCl₄·H₂O 9.9 g (0.49 g)
- 1.5 ml di una soluzione di KAC 1 M a pH 7.5
- Cacb·2H₂O 1.5 g (0.075 g)
- Glicerolo 150 g (7.5 g)
- Si porta a pH 5.8 con HAC, si porta a volume (50 ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.

• Buffer 2:

- 0.4 ml di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
- RbCl 1.2 g (0.025 g)
- Cacb·2H₂O 11 g (0.22 g)
- Glicerolo 150 g (3 g)
- Si porta a volume (20 ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.

Procedimento

1. Preparazione di terreno LB solido (50 ml)

1.1 Pesare le quantità necessarie a preparare 50 ml di terreno, ovvero: 1% tryptone (0.5 g), 0.5% yeast extract (0.25 g) e 0.5% NaCl (0.25 g). Aggiungere 50 ml di acqua distillata.

1.2 Attaccare alla bottiglia un pezzetto di nastro da autoclave.

1.3 Sterilizzare in autoclave.

2. Preparazione delle cellule competenti

2.1 *Sotto Cappa*: Prelevare in sterilità 5 ml di una coltura di cellule di E. coli DH5α ad OD 600 di 0.3-0.4 e trasferirli in una provetta Falcon da 50 ml sterile.

2.2 Centrifugare 5 minuti a 3000 rpm a 4°C ed eliminare il surnatante.

2.3 Risospendere dolcemente le cellule in 0.8 ml di buffer 1 e trasferire sotto cappa la sospensione in un eppendorfda 2 ml.

2.4 Incubare in ghiaccio 15 minuti.

2.5 Centrifugare 5 minuti a 3000 rpm a 4°C.

2.6 Eliminare sotto cappa il surnatante e risospendere le cellule in 400 µL di buffer2.

2.7 Congelare in N2 liquido e conservare a -80°C.

Conclusioni

Abbiamo ottenuto la piastra come desiderato, il terreno si è solidificato in maniera corretta e sarà possibile utilizzarlo successivamente.

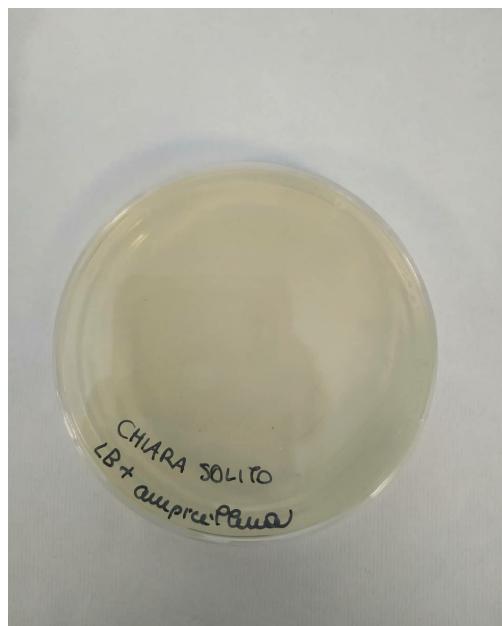
3. Preparazione delle piastre di LB-agar

3.1 Sciogliere il terreno LB-agar nel microonde (se già solidificato).

3.2 *Sotto cappa*: Aspettare che si raffreddi (essendo gli antibiotici sensibili alle alte temperature, ma non che solidifichi) e aggiungere 100 µg/ml di ampicillina (50 µL dello stock 1000X).

3.3 Versare il terreno nelle due piastre.

3.4 Lasciarle aperte sotto cappa fino a che l'agar solidifica, chiuderle e conservarle a 4°C.



La piastra terminata

7 Trasformazione di cellule di E.Coli DH5α

Obiettivo

L'obiettivo è trasformare un ceppo di E. Coli tramite shock termico, per permettergli di esprimere resistenza all'antibiotico (ampicillina).

Introduzione e cenni teorici necessari

Gli organismi procariotici possono acquisire materiale genetico estraneo mediante i processi di coniugazione, trasduzione e trasformazione. Nella trasformazione molecole di DNA derivanti da cellule lisate vengono acquisite dai batteri direttamente dall'ambiente esterno. Questi batteri si dicono competenti.

È stato dimostrato in diversi casi che la competenza dipende dalla secrezione all'esterno della cellula di una molecola di natura polipeptidica. Tale molecola, detta fattore di competenza, si accumula all'esterno della cellula fino al raggiungimento di una concentrazione-soglia che induce nella cellula batterica la sintesi di specifici recettori di membrana. Questi legano il DNA e lo trasportano nel citoplasma dove, se esistono regioni di omologia tra il DNA estraneo e quello cellulare, avviene un evento di ricombinazione che determina l'integrazione del DNA estraneo (o di parte di esso) sul cromosoma e la sua eventuale espressione nella cellula ospite. Molte specie batteriche non naturalmente competenti possono essere trasformate artificialmente in laboratorio e rese tali (come abbiamo fatto noi con E.Coli nell'esperienza precedente).

In questa esperienza le cellule del ceppo DH5α del batterio Escherichia coli rese "competenti" per la trasformazione, vengono trasformate con quantità note di DNA plasmidico.

La trasformazioni in laboratorio può avvenire con due metodi:

- Shock termico

È la tecnica che usiamo in questa esperienza, le cellule incubate in ghiaccio vengono sottoposte ad un bagno termostatico e poi nuovamente raffreddate.

- Elettroporazione

Le cellule, mescolate con il plasmide, sono sottoposte ad una breve ma intensa scarica elettrica, che ne apre i pori di membrana.

Il plasmide utilizzato conterrà un gene il cui prodotto è un enzima con attività β -lattamasica che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina. Dopo la trasformazione le cellule verranno piastrate su terreno con l'aggiunta dell'ampicillina ed incubate a 37°C per 12-15 ore. In presenza dell'antibiotico cresceranno solo le cellule trasformate, che contenendo il plasmide esprimono il gene per la resistenza all'ampicillina.

Strumenti e materiali utilizzati

- Miniprep del pUC18
- H_2O
- 1000 μL Cellule competenti
- 250 μL LB liquido
- Piastra di LB-Amp-Xgal-IPTG
- Eppendorf
- Bagno termostatico
- Incubatrice
- Cappa Biologica
- Becco Bunsen

Procedimento

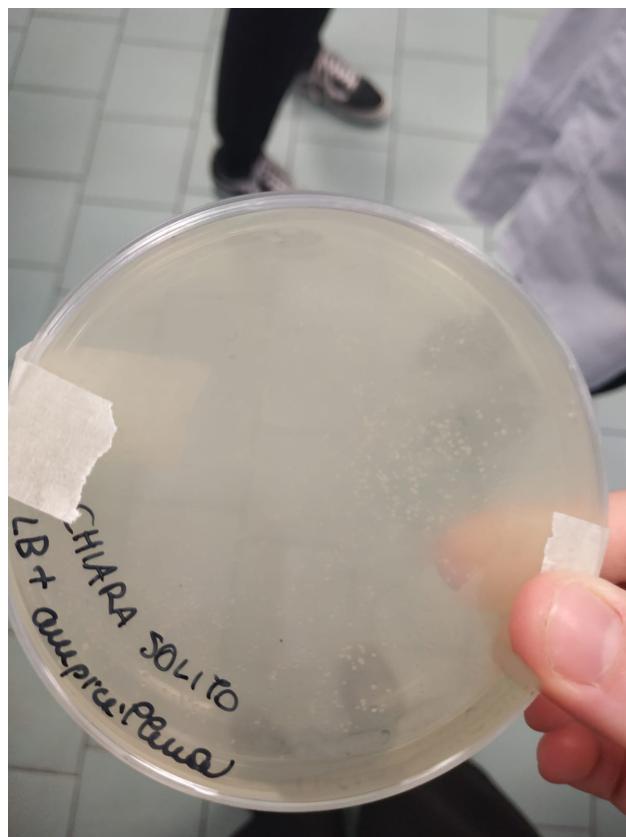
1. Diluire la miniprep del pUC18 ad una concentrazione finale di 100 ng/ μ L in acqua.
Il calcolo effettuato è stato:

$$x * 1111.4 = 100 * 100 \approx 9$$

2. Prelevare sottocappa 1000 μ L di cellule competenti e trasferirli in una eppendorf nuova.
3. Aggiungere 1 μ L della miniprep diluita ai 100 μ L di cellule competenti.
4. Agitare ed incubare in ghiaccio per 30 minuti.
5. Effettuare lo shock termico immergendo il tubo nel bagno termostatico a 42° per 1 minuto.
6. Raffreddare velocemente in ghiaccio per 5 minuti.
7. Aggiungere 250 μ L di LB liquido ed incubare a 37°C per un'ora (per esprimere la resistenza all'antibiotico).
8. Piastrare 150 μ L della sospensione delle cellule su una piastra di LB-Amp-Xgal-IPTG e lasciarla a 37°C overnight.

Conclusioni

In questa esperienza si ottengono delle colonie che, se cresciute sulla piastra, sono resistenti all'antibiotico.



La piastra con le colonie.

8 Elettroporazione di cellule competenti di E.Coli BL21

Obiettivo

Trasformare le cellule per esprimere la proteina di interesse (GFP o LHC).

Introduzione e cenni teorici necessari

In questa esperienza cellule di E.coli (BL21) saranno trasformate con un plasmide ingegnerizzato al fine di esprimere una proteina d'interesse. Verranno espresse due diverse proteine: GFP (green fluorescent protein) e LHC-SR3 di *Chlamydomonas reinhardtii* (d'ora in poi LHC). I geni codificanti per queste proteine sono stati precedentemente inseriti in due diversi plasmidi ingegnerizzati al fine di permetterne l'espressione. Il vettore contiene:

- Ori: l'origine di replicazione
- KanR: per la resistenza alla Kanamicina per la selezione dei trasformati su terreno selettivo
- Rop: gene che codifica per mantenere un numero di copie basso del plasmide.

Mi basta infatti un numero di copie limitato che esprime ad alta efficientza (Buona produzione in biomassa)

- Lac promotore e lacI: responsabili della repressione dell'operone lac
- T7 promoter e terminator: per la RNA polimerasi
- Lac operator: sequenza a cui si lega l'operone lac
- GFP o LHCSR3: il gene di interesse - esso porta due His-tsg nel caso di GFP e una sola nel caso LHCSR.

Viene inserito nel mezzo di promotore e terminatore T7.

Le proteine che esprimeremo sono due proteine diverse: una solubile (da citosol) ovvero GFP, e una idrofobica (di membrana) ovvero LHC.

GFP

Proteina intrinsecamente fluorescente (campione giallo) assorbita e riemessa sottoforma di fotoni (non dipende da CROMOFORI ~altre molecole legate ma intrinseca).

27kDa, 238 aminoacidi con catene aromatiche che si avvicinano adeguatamente ad assorbire la luce. Si usa come marker/reporter, viene fatta esprimere per verificare quando e dove, ciò è utile (ad esempio) per verificare se un promotore viene espresso o meno, o quando un fattore di trascrizione interagisce con un promotore.

È la prima di tante proteine fluorescenti che derivano in parte da essa.

LHC

È una delle proteine coinvolte nell'ambito fotosintetico. Sono nello specifico, proteine coinvolte nei sistemi antenna, presenti nei centri di reazione dei fotosistemi.

In questa esperienza si lavora con LHCSR, proteine di membrana; queste proteine si possono foldare solo ed esclusivamente, con tutti i pigmenti a disposizione.

In E.Coli non si foldano, a differenza delle GFP, ci aspettiamo quindi espressione con aggregati proteici. Faremo poi in modo di indurre il folding nelle esperienze successive.

In condizioni "normali" il prodotto del gene lacI va fisicamente a bloccare la possibilità che la T7 RNA polimerasi trascriva il gene d'interesse. La RNA polimerasi si va a legare fisicamente al promotore e scivola sul filamento di DNA fino al terminatore; questo scivolamento è impedito dalla presenza dell'inibitore. In seguito all'aggiunta di lattosio (o di substrati analoghi come l'IPTG in questo caso), i quali si legano al repressore, il legame al DNA è impedito, permettendo quindi all'RNA polimerasi di scorrere e di trascrivere il gene d'interesse.

Strumenti utilizzati

- Plasmide (precedentemente isolato tramite miniprep)
- Cellule competenti BL21;
- LB liquido;
- Elettroporatore
- LB agar;
- Piastre Petri;
- Antibiotici per la selezione (Kanamicina);
- Falcon, eppendorf e puntali sterili;

Procedimento

I primi due punti vanno effettuati sotto cappa:

1. Scongelare un'aliquota di cellule competenti in ghiaccio per 15 min.
2. Aggiungere 1ul del plasmide ed attendere in ghiaccio 10 min.
3. Trasferire inoculo batterico con DNA in cuvetta, attendere poi 10 minuti;
4. Elettroporare a 1.5 kV (1 minuto);
5. Aggiungere 1 ml di terreno LB liquido (nuovamente sotto cappa);
In questo caso sto fornendo alle cellule ciò che è necessario per riprendersi dopo lo stress subito finora, quindi senza antibiotico (altrimenti le ucciderei)
6. Incubare in agitazione a 37°C per 45 min circa.

Le cellule che sono state trasformate esprimeranno l'enzima necessario a conferir loro la capacità di crescere tollerando la presenza dell'antibiotico nel terreno.

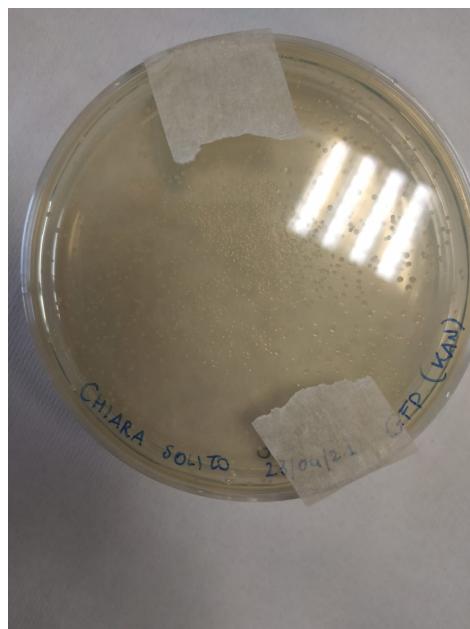
Nel frattempo, preparare le piastre che serviranno per effettuare la selezione delle cellule trasformate, con terreno LB solido e marker di selezione.

Noi abbiamo preparato due piastre, una da 200 μL e l'altra da 500 μL .

Conclusioni

A questo punto, solo le cellule che hanno integrato il plasmide e hanno trascritto/tradotto il gene "kan" saranno in grado di crescere su terreno selettivo. La quantità di colonie sviluppatesi sono minori di quelle attese (con differenze tra le piastre di GFP e quelli di LHC), questo potrebbe essere stato causato da diversi fattori (problemi nella risposta delle normali capacità cellulari dopo l'elettroporazione, una mancata inoculazione del plasmide o tempi sbagliati nella preparazione).

7. Sciogliere il terreno LB Agar in microonde;
8. Prelevare con l'aiuto di una falcon sterile 50 ml di terreno;
9. Aggiungere 50ul di antibiotico Kanamicina;
10. Dividere il terreno in due piastre Petri e lasciar polimerizzare;
11. Le cellule vengono quindi piastrate ed incubate ON a 37°C per permettere la formazione di colonie visibili.



La piastra preparata.

9 Colony PCR

Obiettivo

Verificare che le colonie siano effettivamente state trasformate.

Introduzione e cenni teorici necessari

La Colony PCR è un metodo che permette di effettuare un'analisi della avvenuta trasformazione di plasmidi mediante la PCR direttamente sulla colonia senza dover fare una miniprep. Ha una rapida velocità di esecuzione, un basso costo e fa uno screening massivo.

Il metodo si può suddividere in 3 fasi distinte

1. Disegno dei primer
2. Standard PCR
3. Elettroforesi su gel

Strumenti utilizzati

- Eppendorf e micropipette
- Termociclatore
- Piastre in cui sono state piastrate le cellule trasformate
- Piastre di LB Agar vuote
- Apparato per corsa elettroforetica
- Transilluminatore
- Colonie batteriche
- Gel di Agarosio
- Loading dye 6X
- Buffer-Mg
- $MgCl_2$
- Taq polimerasi
- sNTPs
- Primer Forward
- Primer Reverse
- TAE 1x
- EuroSafe

In questo caso sono stati utilizzati i primer universali del pET

T7: TAATACGACTCACTATAGGG
T7 rev: CGTCCCATTGCCAATCC

I primer universali si appiano sul plasmide.

Possono succedere due cose:

- Il plasmide non c'è
Non accade nulla - le colonie sono resistenti
- Il plasmide c'è
I due primer si appiano su due porzioni del plasmide: verifco il plasmide e ottengo il transgene.

La PCR si divide in 3 steps. Vi è una reazione a catena → tempiato → ... → Amplifichiamo 800 basi in 90 secondi (il calcolo del tempo avviene per lunghezza e velocità, 1Kb per 90 secondi)

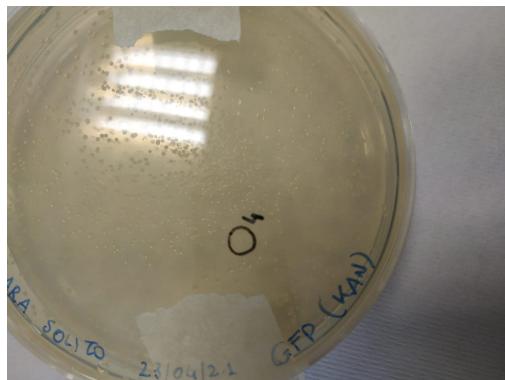
Step	Temperatura	Cosa succede?
Denaturazione iniziale	95°	I filamenti di DNA vengono separati
Annealing	50°	I primer si appaiano all'inizio e alla fine della regione da amplificare
Estensione (noi l'abbiamo allungata a 5 min.)	72°	La TAQ polimerasi sintetizza il frammento

Fasi Preliminari

- **FASE 1: Preparazione del tempiato**

Preparare quattro mini eppendorf da PCR marcati, contenenti ognuno 20 μL di acqua sterile

- Scegliere 4 colonie ben identificabili e abbastanza isolate dalle altre. Le colonie devono essere grandi ma non troppo.



Una delle colonie scelte.

- Con l'aiuto di un puntale sterile prelevare una coltura e strisciarla su una piastra nuova (non fatto sotto cappa).
- Immergere lo stesso puntale usato in precedenza nell'eppendorf contenente l'acqua

Procedimento

- **FASE 2: Allestimento della reazione di PCR**

Alestitire la reazione di PCR con i seguenti composti (deve essere sufficiente per 5 campioni, quindi moltiplicare tutto per 5):

- 10x buffer-Mg : 2.5 μL
- 50 nM MgCl₂ : 0.8 μL
- 10 nM dNTPs : 0.5 μL
- 10 nM Primer forward : 1.3 μL
- 10 nM rimer reverse : 1.3 μL
- Tempiato : 1 μL
- H₂O : to 25 μL

- Dividere le mix in 4 mini eppendorf (24 μ L per eppendorf)
- Taq : 0.1 μ L per ognuna

I primer sono utilizzati uno nella regione del promotore T7 e l'altro nella regione terminatrice ($T_a=55-58^\circ C$).

Le regioni amplificate sono circa 800 bp in entrambi i casi. Vengono allestite 4 reazioni (2 campioni + 1 controllo negativo + 1 controllo positivo), ma viene preparato un mix per 5.

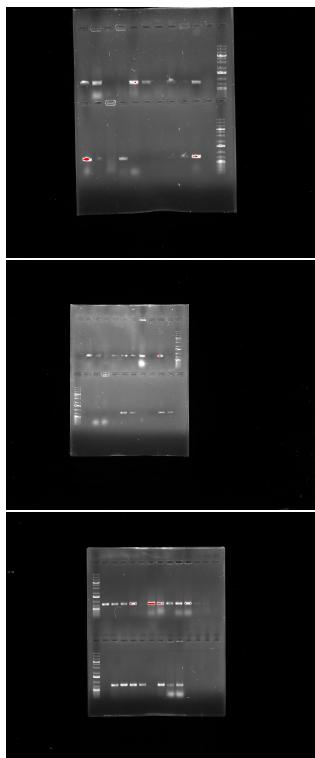
Per preparare la reazione partiamo dal volume più grande fino a quello piccolo, lasciando però il templato per ultimo.

Infine incubiamo i campioni a 99°C per 10 minuti. Questo avviene per far sì che le cellule si disgregino meglio e liberino il DNA (avremmo dovuto farlo alla fine della fase 1, ma lo facciamo qui per risparmiare del tempo).

• FASE 3: Verifica su gel

1. Pesare la quantità di agarosio necessaria per preparare 50 ml agarosio 1%
2. Aggiungere all'agarosio 50 ml di tampone TAE1x
3. Portare ad ebollizione per sciogliere l'agarosio in microonde
4. Aggiungere 6 μ L di EuroSafe
5. Colare nelle vaschette ed attendere la polimerizzazione
6. Aggiungere ai campioni prelevati dal termociclatore il loading Dye 6x (5 μ L)
7. Caricare i campioni su gel
8. Settare un voltaggio di 100V ed attendere la corsa
9. Verificare al transilluminatore la presenza degli amplificati

Conclusioni



- Questo tipo di PCR (usando l'acqua in cui si è stemperato come templato) è un approccio impreciso, ma utile in questo caso per verificare velocemente la presenza delle proteine di interesse.
- Nel caso specifico abbiamo trovato alcuni campioni in cui le proteine erano presenti e alcuni in cui invece non vi erano.

Fase aggiuntiva:

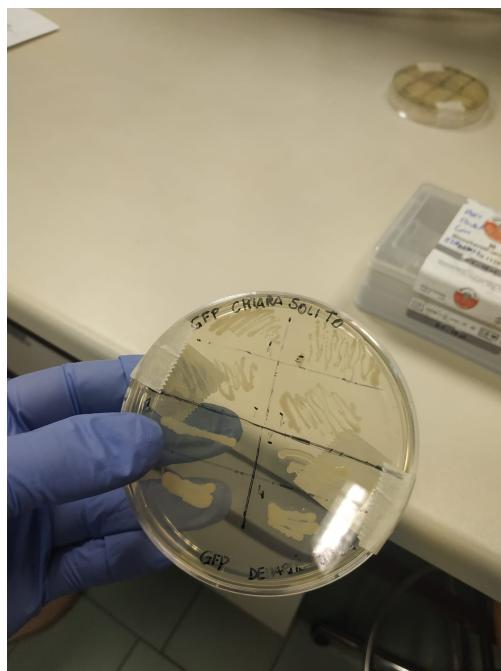
Abbiamo identificato le colonie positive: sono sotto il controllo dell'operone lac. Ho quindi un sistema costante di regolazione e cerco di sfruttarlo. Faremo in modo di avere quindi delle culture batteriche da queste colonie e indurremo l'espressione della proteina ricombinante.

Le proteine ricombinanti sono ottenute tramite l'espressione in E.coli dei ceppi BL21. Come sappiamo il ceppo BL21 è resistente al cloramfenicolo. L'espressione delle proteine ricombinanti viene indotta nelle colture batteriche ottenute precedentemente tramite l'aggiunta di IPTG, in grado di bloccare il repressore LacI.

- Da una coltura batterica trasformata e verificata tramite colony PCR (le colonie scelte prima), si ottiene un pre-inoculo di 3-20 ml di coltura satura in LB con antibiotici
- La precoltura satura viene trasferita in circa 300 ml di terreno SB con antibiotici
- I batteri sono lasciati crescere fino a $OD_{600nm} = 0.25/cm$, quindi viene indotta l'espressione mediante l'aggiunta di 1 mM IPTG (isopropilgalattoside);
- L'espressione continua per 6 ore (oppure overnight) a 37°C sotto forte agitazione (275 rpm).

E.Coli è composta principalmente da acqua, i fotoni vengono scatterati dalla cellula e noi vediamo lo scattering. Abbiamo quindi un valore che dipende dalla densità.

Necessario raggiungere i $0.25 OD/cm$ (cammino cuvetta).



La piastra con le colonie positive

Il trasferimento batterico sulla nuova piastra è ben riuscito e le colonie di GFP (che si erano ben sviluppate nell'esperienza precedente) sono cresciute ben visibilmente.

Alla fine terremo solo il pellet per la prossima esperienza.

10 Espressione eterologa di proteine e loro purificazione

Obiettivo

In questa esperienza le proteine d'interesse (GFP e LHC) verranno purificate.

Introduzione e cenni teorici necessari

Nel caso della GFP verrà semplicemente eliminata la parte precipitabile e recuperato il surnatante (giallo fluorescente). Nel caso dell'LHC invece, essendo non foldabile, favoriremo la precipitazione degli aggregati, con una serie di centrifugate sequenziali da cui verrà recuperato il PELLETT, da trattare con detergenti per ottenere la proteina purificata. Le proteine così purificate possono poi essere conservate ed utilizzate per altre esperienze.

Strumenti utilizzati

- Eppendorf, Pippette e Falcon
- H_2O
- Coltura di E. Coli precedentemente indotta
- Bilancia
- Falcon 50ml
- Lisozima
- DNAasi
- $MgCl_2$
- Centrifuga
- Ghiaccio

Soluzioni utilizzate nell'esperimento

- *Tampone di Lisi*: 50 mM Tris pH 8, 25% saccarosio, 1 mM EDTA
- *Tampone Detergente*: 200 mM NaCl, 1% acido deossicolico, 1% NONIDET P-40, 20 mM Tris pH 7.5, 2 mM EDTA, 10 mM b-mercaptopetanolo
- *Tampone Triton 0.5%*: Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM b-mercaptopetanolo
- *Tampone di Ricostituzione 1x*: 50 mM Hepes pH 8, 12.5% saccarosio, 2% LDS, 5 mM acido 6-aminocaproico, 1 mM benzamidina

Purificazione GFP - Procedimento:

1. 300 ml di coltura batterica vengono centrifugati a 4350 giri per 5 minuti;
2. Il pellet pesato viene risospeso in 0.8 ml/g di Tampone di Lisi con l'aggiunta di 2 mg di lisozima per grammo di cellule e lasciato in ghiaccio per 30 minuti;
3. Si incuba per 30 minuti a temperatura ambiente con 20 μ g/ml DNAsi e 10 mM $MgCl_2$;
4. Centrifugare per 10 minuti a 12000 giri e recuperare il surnatante.



Purificazione GFP

Purificazione LHC - Procedimento:

1. 300 ml di coltura batterica vengono centrifugati a 4350 giri per 5 minuti;
2. Il pellet pesato viene risospeso in 0.8 ml/g di Tampone di Lisi con l'aggiunta di 2 mg di lisozima per grammo di cellule e lasciato in ghiaccio per 30 minuti;
3. Si incuba per 30 minuti con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNAsi e 10 mM $MgCl_2$;
4. Si aggiungono 2 ml per grammo di cellule iniziali di Tampone Detergente e si centrifuga 10 minuti a 12000 giri in modo da precipitare i corpi di inclusione;
5. Il pellet viene lavato 3-4 volte con circa 5ml di Tampone Triton, fino a purificare quasi completamente la proteina ricombinante dai contaminanti batterici;
6. La proteina presente nei corpi di inclusione viene infine lavata in H_2O
7. I corpi di inclusione vengono solubilizzati nel Tampone di Ricostituzione. Al fine di evitare la formazione di schiuma, risospendere il pellet in 200 μL di acqua e aggiungere 200 μL di tampone di ricostituzione 2x
Purtroppo si è dovuto effettuare un po' più di lavaggi e rompere cellule e DNA con l'aiuto di una siringa.

Conclusioni

Nell'esperienza successiva verificheremo l'avvenuta purificazione delle proteine, dal solo campione non è possibile infatti essere certi della purificazione.



Purificazione con l'aiuto di una siringa

11 Elettroforesi SDS-Page denaturante

Obiettivo

Stabilire il grado di purezza delle proteine che abbiamo precedentemente purificato.

Introduzione e cenni teorici necessari

L'elettroforesi è una tecnica che consente la separazione su gel di acrilammide di polipeptidi a seconda del peso molecolare, della carica e forma. La tecnica SDS-PAGE consente di separare le proteine unicamente in funzione del loro peso molecolare. I polipeptidi vengono trattati con un agente riducente, come β -mercaptoetanolo, il detergente anionico SDS (Sodio Dodecil Solfato) e bolliti per 1 minuto. Questo trattamento consente di rompere le strutture proteiche. L'SDS si lega ai polipeptidi con un rapporto costante di 1,4 g per g di proteina, in questo modo il rapporto carica/massa è uguale per tutti polipeptidi caricati su gel. A seguito della rottura delle strutture proteiche i polipeptidi assumono una forma globulare e durante la migrazione su gel di acrilammide vengono separati unicamente in base al peso molecolare. Le due soluzioni del gel di separazione (running gel) e del gel di impaccamento (stacking gel) vengono preparate a partire da soluzioni stock dei vari componenti. La funzione dello stacking gel, localizzato sopra il running, è quella di focalizzare i polipeptidi in bande dallo spessore molto ridotto prima del loro ingresso nel gel di separazione. Le due soluzioni sono composte da acrilammide/bisacrilammide in rapporto e concentrazione totale di acrilammide diversi a seconda del tipo di gel utilizzato, e da un tampone a un pH che può essere uguale o diverso tra lo stacking e il running gel. Eventualmente è possibile aggiungere Urea nel running gel per rendere il gel più denaturante. Le soluzioni di acrilammide vengono fatte polimerizzare tramite l'aggiunta di Temed e APS (solfato di ammonio) in due lastre di vetro di 10 x 7.4 cm con uno spaziatore di 1 cm. La corsa elettroforetica viene eseguita applicando una differenza di potenziale variabile secondo il tipo di gel utilizzato e le sue dimensioni, per un tempo sufficiente per la migrazione del fronte delle clorofille o del colorante fino al margine inferiore del gel.

Strumenti utilizzati

- Pipette
- Sistema di electroblotting
- Bunsen
- Falcon da 15 ml
- Pettinini e vetri per SDS-PAGE
- i campioni (GFP, LHC)
- Acrilammide
- 1,5 M Tris-HCl pH 8.8
- 0,5 M Tris-HCl pH 6.8
- 0,125 M Tris-HCl pH 6.8
- H_2O
- Isopropanolo
- Glicerolo
- Temed
- APS
- Soluzione di colorazione: 0.04% (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250, 50% metanolo, 10% acido acetico.
- Soluzione di decolorazione: 7.5% (v/v) acido acetico, 92.5% (v/v) H_2O .

Fasi Preliminari

Preparazione dei gel: Preparare 4 gel, uguali a 2 a 2: 2 saranno colorati (al blu comassie).

- Stacking gel:
 - 4% (W/V) acrilamide 36.5:1 (36.5 acrilamide - 1 bis-acrilamide)
 - 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

- Running gel:

12% (W/V) acrilammide 29.2/0.8 (29.2 acrilammide, 0.8 bis-acrilammide)
1.5 M Tris-HCl pH 8.8

La polimerizzazione avviene aggiungendo TEMED (crea il "ponte" tra le molecole) e persolfato di ammonio (APS che induce la polimerizzazione in pochi minuti).

In una falcon da 15 ml:

	Running gel	Stacking gel
Acrilammide (40 %)	1.5 ml	0.5 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.75 ml	
0.5 M Tris-HCl pH 6.8		1.25
H_2O	fino a 5 ml	fino a 5 ml
TEMED	3.5 μ L	19 μ L
10 % APS	24 μ L	60 μ L

Procedimento

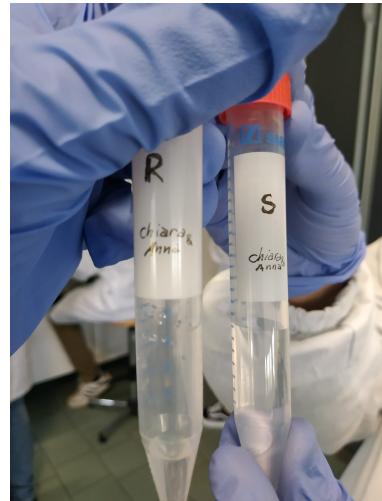
Dopo aver polimerizzato, si deve procedere molto velocemente all'elettroforesi

- Preparazione elettroforesi:

1. Colare tra i vetri il Running gel per primo (circa 5 ml)
2. Colare 1 ml di Isopropanolo (non si mescola con il gel e rimane in superficie. Serve per permettere al gel di mantenere una superficie piatta e non formare ondine durante la solidificazione)
3. Risciacquare accuratamente il fronte del gel per eliminare ogni traccia di isopropanolo
4. Posizionare il pettinino all'imboccatura dei vetri (senza farlo entrare completamente)
5. Colare lo Stacking gel (polo più di 1 ml). Fare attenzione a non incorporare bolle d'aria
6. Spingere il pettinino in sede

- Preparazione campioni

7. Diluire il campione in Laemmli Loading Buffer (4% SDS, 20% Glicerolo, 10% 2-mercaptopropanolo, 0.004% blu bromofenolo, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) in rapporto 1:300 (1 μ L di corpi d'inclusione in 299 di LB)
8. Bollire il campione per 30 secondi
9. Centrifugare brevemente
10. Caricare sul gel 10 μ L di ogni campione



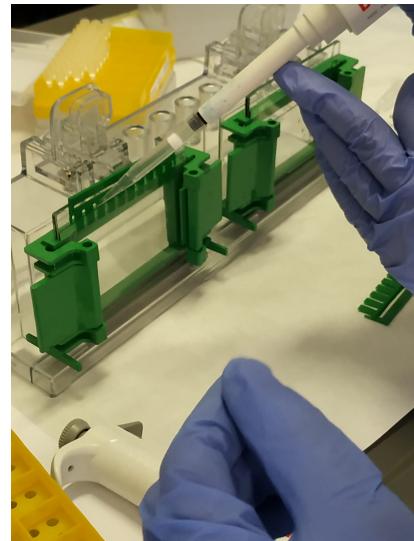
Le due falcon con i gel



Preparazione dell'elettroforesi

Il caricamento (su gel 6) aveva ordine:

- vuoto
- marker
- LHC 10:1
- LHC 5:1
- GFP1 5:1
- LHC 5:1
- GFP 5:1



Caricamento su gel

• **Colorazione al Coomassie**

11. Aprire i vetri
12. Tagliare il gel (devo rimuovere il gel di stacking e tenere quello di running - la parte inferiore)
13. Immergere il gel nel buffer di trasferimento per 10 minuti
14. I gel vengono quindi immersi nella soluzione di colorazione
Teoricamente ciò avviene per circa 20-90 minuti, in agitazione. In questo caso per velocizzare il processo vengono posti per 1 minuto nel microonde.
15. Ne segue la decolorazione, che continua fino a quando le bande proteiche contrasteranno nettamente con il fondo del gel.



Colorazione al Coomassie

Conclusioni

La colorazione è avvenuta e le bande delle diverse proteine sono ben riconoscibili.

12 Western Blotting

Obiettivo

Identificare le proteine in base alle reazioni con anticorpi specifici

Introduzione e cenni teorici necessari

Il western blotting è una tecnica che consente di trasferire da gel ad un filtro di nitrocellulosa (o altri materiali) polipeptidi che vengono poi fatti reagire con anticorpi specifici che ne consentono il riconoscimento. La miscela di proteine generalmente viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto e poi riconosciute tramite anticorpo specifico.

Strumenti e soluzioni utilizzate

- Gel su cui è stata effettuata la corsa elettroforetica
- Sistema Trans-blot turbo Bio-rad
- Carta da filtro Whatman (2 fogli)
- Nitrocellulosa (filtro)
- Tampone di trasferimento: 20mM Tris, 152mM glicina, 20% metanolo
- Tampone PBS pH7.2 10X: 1.37 NaCl, 27mM KCl, 15mM KH₂PO₄, 81mM Na₂HPO₄
- Soluzione di bloccaggio: Tampone PBS pH 7.2, 0.2% Tween, 5% latte scremato in polvere
- Soluzione di sviluppo: 100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂.
A 10ml della soluzione di sviluppo vengono aggiunti 66 µL nitroblu- tetrazolium (NBT) e 33 µL di 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP)
- Soluzione di colorazione: 0.2% Ponceau Red e 3% acido tricloroacetico

Procedimento

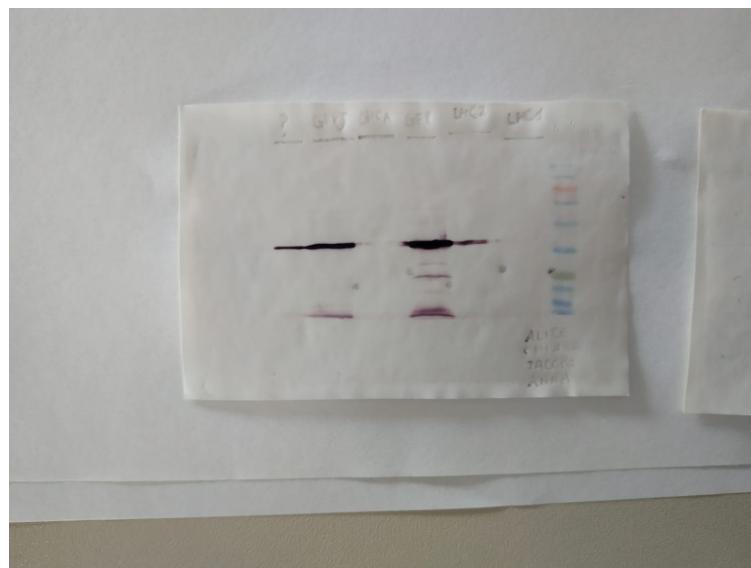
1. Replicazione del "sandwich" in delle vaschette, che costituiscono un sistema semi-dry. Utilizziamo 2 fogli di carta da filtro Whatman, i fogli di nitrocellulosa.
2. Il gel (dalla corsa elettroforetica, toccato il meno possibile) viene inserito nel tampone di trasferimento (non immerso però, così da avere meno elettrolita)
3. Si effettua una corsa a 25V, 1A, per 30 minuti.
Dal basso, e verso il basso, le proteine sono trasferite sul filtro.
4. Si incuba il filtro in soluzione di colorazione.
Al contrario del Coomassie (colorante usato alla fine dell'SDS page) la colorazione avviene in poco tempo. Ora le bande devono essere trattate per fare in modo di poter associare la banda alla rispettiva proteina.
5. Si incuba il filtro per 1 ora in agitazione con la soluzione di bloccaggio, questo è una soluzione proteica (a volte a base di albumina, altre di dsa). In questo caso si usa una soluzione a base di latte in polvere. La soluzione fa in modo di saturare tutti i siti della membrana che potrebbero legare altre proteine.

6. Si incuba per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito nella soluzione di bloccaggio. Gli anticorpi primari sono immunoglobuline prodotte da altri organismi (topi o conigli di solito). La proteina ricombinante ignerizzata viene iniettata nell'organismo che produce le immunoglobuline. Dall'organismo viene estratto il sangue e dal sangue separato il siero, che viene diluito per 1000 o 2000 volte.
7. Nuovamente lavaggio con soluzione di bloccaggio, per rimuovere gli anticorpi non legati (dovrebbero essere tre ma noi ne facciamo solamente uno).
8. Si incuba ora con l'anticorpo secondario coniugato con la fosfatasi alcalina.
Mentre l'anticorpo primario è specifico per il tag di 6 istidine delle nostre proteine, quello secondario è generico (riconosce e lega altri anticorpi), ma ha un sistema di detection costituito dalla fosfatasi alcalina.
9. Si lava ora il filtro 2 volte con la soluzione di bloccaggio per 10 minuti a temperatura ambiente e una volta con tampone PBS a pH 7.2.
10. I filtri vengono incubati nella soluzione di sviluppo che contiene il substrato BCIP/NBT. Il substrato viene convertito in situ in un composto blu dalla fosfatasi alcalina immunolocalizzata.
Il BCIP fa da substrato e si forma un intermedio idrossile. Questo reagisce con l'NBT formando un sale insolubile e colorato che precipita, indicando la proteina sul filtro.
11. Quando la colorazione ha raggiunto un buon contrasto si blocca la reazione con H_2O

Conclusioni

L'esperimento è andato a buon fine per quel che riguarda la GFP, si possono infatti riconoscere sulla carta assorbente le proteine (in figura). L'LHC invece non risulta sul filtro.

Tutti e tre i filtri ottenuti finora (Blue di Comassie, Ponceau Red e filtro finale) sono paragonabili l'uno con l'altro. L'analisi con gli anticorpi specifici è stata di successo soprattutto per quel che riguarda la GFP - si notano infatti le due righe più scure al centro dei filtri.



Filtro alla fine del Western Blot

Un procedimento alternativo per il trasferimento, più classico, avrebbe previsto la creazione del cosiddetto sandwich, ovvero una camera di trasferimento, composta come segue:

- polo negativo
- spugna porosa
- carta da filtro Whatman
- gel

- nitrocellulosa
- carta da filtro Whatman
- spugna porosa
- polo positivo

Al metodo della precipitazione di sale invece (più quantitativo) può essere sostituita la chemiluminescenza (metodo più usato), la luminescenza, la fluorescenza, ecc.

13 Ricostituzione in vitro di una proteina di membrana (Folding)

Obiettivo

Ottenere il ripiegamento della proteina LHC per poter fare una cromatografia di affinità.

Introduzione e cenni teorici necessari

Con il termine folding si intende il processo di ripiegamento di una proteina per arrivare alla forma funzionalmente attiva.

La ricostituzione in vitro permette di ottenere proteine ricombinanti ripiegate con la corretta conformazione strutturale (processo di re-folding). Durante la procedura di ricostituzione i pigmenti che le proteine legano in vivo vengono aggiunti alle apoproteine. Questi pigmenti sono necessari al fine di ottenere il corretto ripiegamento.

Strumenti utilizzati

- 40 μL di apoproteina (il campione)
- 340 μg di clorofilla
- Tubo di polipropene
- Vortex
- 100 μL di etanolo tamponato con NaCO_3
- H_2O
- Eppendorf
- 45 μL di KCl 2ml
- Centrifuga
- Pipette

Soluzioni utilizzate nell'esperimento

- OGP (octil- β -glucopiranoside)
detergente per il folding corretto della proteina
- Tampone di Ricostituzione (2% LDS, 12.5% saccarosio, 5 mM acido amminocaproico, 1 mM benzimidina, 50 mM Hepes KOH pH 8)

Procedimento

1. Il campione è aggiunto a 1.1 ml di Tampone di Ricostituzione in un tubo di polipropilene
2. Vengono fatti bollire a 100 °C per 2 min. e lasciati raffreddare per 10 min in bagnetto termostatato a 25°C
3. Durante il raffreddamento dell'apoproteina i pigmenti sono risospesi con vortex in 100 μL di etanolo assoluto tamponato con NaCO_3 (il volume di etanolo non deve superare il 7% del volume finale della reazione, per non ostacolare il folding del complesso proteico)
4. La soluzione contenente i pigmenti viene quindi addizionata lentamente alla soluzione di apoproteina sotto blanda agitazione
I pigmenti vanno tenuti il più possibile al buio, poiché altamente fotosensibili.



Aggiunta dei pigmenti

5. Il campione è suddiviso in 2 tubi tipo eppendorf da 1.5 ml in aliquote da $600 \mu\text{L}$ e mantenuto separato per facilitare le fasi successive
6. Si mettono le eppendorf in ghiaccio per 10 minuti.
7. Si aggiunge ad ogni campione $60 \mu\text{L}$ di octil- β -D-glucopiranoside (OGP) 10% (1% finale)
8. Dopo 7 minuti di incubazione in ghiaccio si aggiungono $45 \mu\text{L}$ di KCl 2M (150 mM finale). Il KCl aggiunto causa la precipitazione a freddo dell'LDS (Litio dodecil solfato)
9. Dopo 10 minuti di incubazione in ghiaccio i campioni vengono centrifugati per 15 minuti
10. Il surnatante viene recuperato e contiene la proteina ricostituita legante pigmenti in modo specifico.

Conclusioni

Proveremo a verificare la presenza della proteina ricombinante nella prossima esperienza

14 Cromatografia di affinità

Obiettivo

Purificare le proteine ricombinanti.

Introduzione e cenni teorici necessari

La chromatografia di affinità permette di separare le proteine in base alla loro "affinità" per una resina specifica. Proteine con una "coda" di 6 histidine possono essere separate tramite chromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC). La proteina di interesse contiene la 6His-tag e si leggerà fortemente alla resina IMAC mentre le altre, meno affini, saranno eluite con il fronte o eliminate durante le fasi di lavaggio. La resina utilizzata è del tipo NiNTA (Qiagen) e contiene Ni⁺⁺ fissato a beads di Sepharose mediante il chelante nitrilotriacetato (NTA). La proteina, contenendo la coda di 6 His, ha una elevata affinità e si complessa saldamente alla resina.

Strumenti utilizzati

- Colonna per chromatografia: La colonna contiene una resina che lega il Nikel, il quale a sua volta lega le code di istidina della proteina LHC e GFP così che rimangano legate alla resina.
- Detergente OGP
- OG Buffer
- Rinse buffer
- Tris pH 8 con saccarosio 12.5 %
- Imidaziolo 1 M in tris - buffer di eluizione
- Tubo di polipropene
- Eppendorf

Procedimento

1. Caricare nella colonna 2 ml di tampone OG Buffer, quello dell'LHC conterrà OGP, mentre quello della GFP non conterrà detergente. Lasciare che fluisca all'interno della resina facendo attenzione che la colonna non si svuoti del tutto e la resina non si secchi. Sotto la colonna inseriamo un tubo di polipropilene, per raccogliere tutto ciò che faremo fluire attraverso il filtro
2. Fare lo stesso con i campioni
3. Ora caricare nuovamente 2 ml di OG buffer quello che è contenuto nel tubo va ora buttato e il tubo sostituito da una eppendorf
4. Infine caricare 2 ml di buffer di eluizione
5. Nelle eppendorf sarà rimasta l'eluito, contenente le proteine.

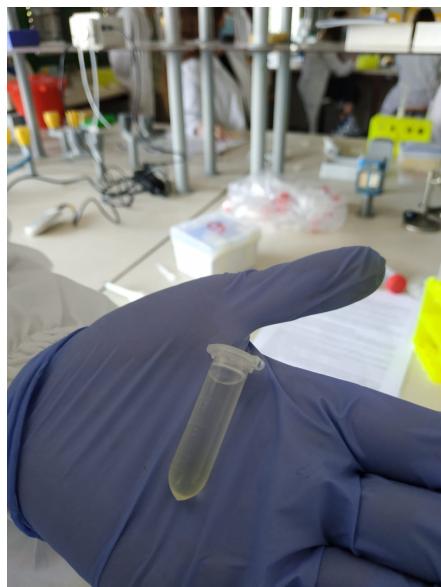
Conclusioni

Purtroppo per nessuna delle proteine si è avuto un risultato soddisfacente.



Filtro della GFP

Nel caso specifico della GFP, la proteina è rimasta bloccata nel filtro. Sebbene sia sicuramente presente la proteina (perché abbiamo ottenuto un eluito giallo), ci sono stati problemi di legami alla resina (forse causati da proteasi che ha rimosso le code di istidina) o per troppi residui che hanno bloccato il filtro. Sarebbero necessarie ulteriori analisi per capire la motivazione.



Eluito dal filtro dell'LHC

Per quanto riguarda la LHC molto probabilmente la proteina non ha foldato, quindi non essendo andato a buon fine l'esperimento precedente, non è stato visibile nulla in questo.