

RELAZIONI DI LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Litterini S.
Giulio B.
Cracco A.
Buzzolan T.

June 14, 2018

ELENCO DELLE RELAZIONI :

1. Minipreparazione di DNA plasmidico
2. Estrazione dell'RNA totale con TRIZOL
3. Preaparazione TAE 50X e restrizione del DNA
4. Polymerase Chain Reaction (PCR)
5. Praparazione terreno LB, cellule competenti e piastre LB agar
6. Trasformazione delle cellule di E. coli XL1 Blue
7. Allestimento culture cellulari
8. Utilizzo delle culture cellulari umane in analisi molecolari e morfologiche
9. Estrazione RNA con kit su colonna Qiagen: Retrotrascrizione in cDNA
10. Amplificazione RealTime PCR ed Estrazione delle proteine totali
11. SDS-PAGE delle proteine estratte
12. Separazione cellulare su gradiente di ficoll

STRUMENTI UTILIZZATI NELLE ESPERIENZE :

1. Provette Eppendorf :



2. Provette Falcon :



3. Micropipette e puntali:



4. Microscopio ottico:



5. guanti in lattice:



6. Camice:



7. Beuta:



8. Vasca per l'elettroforesi:



1 Preparazione TAE e Restrizione del DNA

1.1 Sommario

1.1.1 Scopo

Quest'esperienza in laboratorio si divide in due fasi:

- Restrizione del DNA
- Preparazione delle componenti per l'elettroforesi

Durante la fase di Restrizione del DNA, dobbiamo fare in modo che all'interno del plasmide pUC18 venga inserito il gene di interesse e quello per la resistenza all'ampicillina.

Durante la fase di Preparazione dei componenti per l'elettroforesi invece bisognerà preparare il gel di agarosio, dove poi andranno a correre le due concentrazioni di plasmide, uno digerito e l'altro non digerito.

1.1.2 Cenni teorici

Enzimi di restizione

Gli enzimi di restrizione, sono degli enzimi endonucleasici che taglano le molecole di DNA a doppio filamento in siti specifici, chiamati siti di restrizione, che si trovano all'interno o adiacenti a sequenze di nucleotidi chiamate siti di riconoscimento. Questi enzimi, riconoscono anche sequenze di DNA palindromiche, cioè sequenze che lette sia partendo da 5' che dal 3' sono identiche.

Gli enzimi di restizione producono due diversi tipi di estremità nel DNA:

- Estremità piatte, nel caso di enzimi di restrizione che taglano i filamenti esattamente nell'asse di simmetria della sequenza palindromica (Clunt ends);
- Estremità protruding(overhangs) a singolo filamento(stickly ends), nel caso degli enzimi di restizione che taglano ogni filamento in posizione similare ai lati opposti dell'asse di simmetria

l'enzima di restizione da noi usato è **EcoR I**, questo crea 4 estremità adesive(sticky ends) nucleotide con 5'end di AATT. La sequenza di riconoscimento degli acidi nucleici in cui l'enzima taglia è G / AATTC, che ha una sequenza palindromica complementare di CTTAA / G.

Elettroforesi

L'elettroforesi su gel di agarosio, da noi utilizzata in questa esperienza è un metodo semplice e veloce che permette di separare e quindi di identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare.

I gel più utilizzati per questa tecnica sono 2:

- Gel di poliacrilamide: Usualmente usati per separare frammenti di DNA inferiori a 500pb ed hanno un'elevata risoluzione, ma sono però più complicati e pericolosi da preparare e più difficili da maneggiare rispetto a quelli fatti con agarosio.

- Gel di agarosio: Sono semplici da preparare e sono tipicamente usati per separare frammenti di dimensioni variabili, da poche centinaia di basi, fino a 20 Kb. Essi sono i più diffusi e maggiormente utilizzati per l'analisi di routine su DNA. L'agarosio è un polimero di carboidrati estratto dalle alghe. Esso, se fuso e gelificato, forma una matrice, la cui porosità dipende dalla concentrazione di agarosio.

Dopo la loro polimerizzazione, i gel vengono posti nelle apposite vaschette elettroforetiche, riempite in seguito dal buffer di corsa. Questo tampone è lo stesso e alla stessa concentrazione di quello usato per polimerizzare l'agarosio. I tamponi più usati sono:

- TAE (Tris-acetato +EDTA): Questo nel tempo perde la capacità tamponante perchè si ha la separazione di cariche agli elettrodi. Viene utilizzato quasi sempre alla concentrazione 1X;
- TBE (Tris-borato + EDTA): Ha capacità tamponante superiore al TAE. È stabile e usato in corse elettroforetiche particolarmente lunghe. L'unico difetto è che con il tempo tende a precipitare. Può essere utilizzato ad una concentrazione di 0.5X perchè già a questa concentrazione ha un potere tamponante sufficiente;
- TPE (Tris-fosfato + EDTA).

Il Tris contenuto nel tampone è un sale che tampona tra pH 7 e pH 8, range dove il DNA si mantiene molto bene. L'EDTA invece è un chelante che sequestra ioni Mg^{2+} presenti in soluzione e che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi).

Il principio di funzionamento dell'elettroforesi consiste nel movimento di particelle caricate negativamente, il DNA o RNA o proteine (saturate con SDS cioè Sodio-dodecilsolfato), in un campo elettrico verso il polo positivo (anodo).

La separazione avviene in base alle dimensioni e quindi alla massa della molecola. La distanza di migrazione è maggiore per molecole piccole, le quali sono trattenute meno dalla maglia polissaccaridica formata dal gel.

Un altro aspetto importante per la corsa elettroforetica è il tempo, che è direttamente proporzionale alla risoluzione. Si può però velocizzare il processo aumentando il voltaggio, ma bisogna fare attenzione a non incorrere nei rischi del calore prodotto per l'effetto Joule.

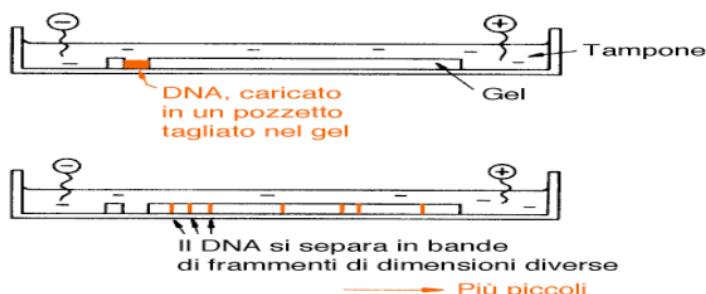


Figure 1: Elettroforesi su GEL

1.1.3 Materiali utilizzati

- Guanti in lattice

- Micropipette (100-1000 e 2-200 microlitri)
- Beuta da laboratorio
- Forno a micronde
- Strumenti per l'elettroforesi
- Eppendorf

1.1.4 Soluzioni utilizzate

- miniprep del pUC18
- enzima di restizione EcoR I
- Acqua
- buffer 10X(digestione)
- TAE 50X
- SyberSafe
- Marker (DNA Ladder)

1.2 Procedimento

1.2.1 Restrizione del DNA

1. prelevare 10 μL di pUC18 e metterli in una nuova eppendorf ed altri 11.5 μL da mettere in un' altra eppendorf per fare in una provetta la reazione(con l'enzima) e nell'altra il controllo negativo(senza l'enzima)
2. Addizionare alla eppendorf contenente il nostro plasmide, prima 11.5 μL di H_2O , successivamente 2.5 μL di buffer 10X ed infine 1 μL del nostro enzima di restizione EcoR I.
3. Portare la eppendorf contenente la reazione ad una temperatura di 37°C (Temperatura ottimale per l'enzima di restrizione EcoR I) per 1-2 ore, di modo che l'enzima EcoR I possa compiere la sua catalizzazione.

1.2.2 Preparazione ed Elettroforesi

1. Per prima cosa si procede preparando il gel di agarosio 0.8%, Prendendo una beuta ed aggiungendo a questa 0.6 g di agarosio, 1.6 ml di TAE 50X e successivamente 78.4 ml di H_2O di modo da avere un volume totale di 80 ml.
2. la miscela a questo punto si presenterà con l'agarosio in fase solida, poichè a temperatura ambiente non è solubile, dobbiamo perciò portare la sluzione ad una temperatura prossima all'ebollizione. Andremo quindi a scaldare il tutto all'interno di un forno a micronde, stando attenti che la soluzione non bolla per più di qualche secondo.

3. Successivamente una volta estratta la beuta, facendo attenzione al calore di questa per non scottarsi, la si mescola fino a che non si sarà una soluzione omogenea in contenuto e colore.



Figure 2: Mescolamento della soluzione con agarosio

4. Una volta che la soluzione è omogenea e si è raffreddata un pò, si va ad aggiungere 5 µL di SyberSafe, questo serve come intercalante che va a legare la doppia elica e una volta andando a guardarla tramite raggi UV, si può notare, grazie alla sua fluorescenza.
5. Andiamo a versare la soluzione nella vasschetta apposita che, una volta solidificato il gel, me ne dà una forma. Non bisogna dimenticarsi di mettere il pettinino all'interno del gel, nella vaschetta, non ancora solidificato, per creare i pozetti, dove si andrà a mettere il contenuto delle due provette eppendorf preparate in precedenza. A questo punto si apetta che il gel solidifichi.

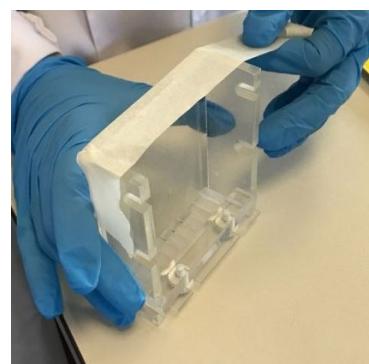


Figure 3: Vaschetta per solidificazione del gel di agarosio

6. Non appena il gel si sarà solidificato, lo si pone nella vaschetta di corsa senza il pettinino
7. Si va ad aggiungere 250 ml di buffer di corsa(TAE 1X) fino al livello indicato

8. Si andrà poi a caricare all'interno dei pozetti le varie soluzioni che mi interessano per la corsa elettroforetica tra cui:

- 25 µL di pUC18 digerito (con 5 µL di Loading Buffer)
- 25 µL di pUC18 non digerito (con 5 µL di Loading Buffer)
- 25 µL di RNA totale derivante dalla scorsa esperienza (con 5 µL di Loading Buffer)
- Un pozzetto è riservato per il Marker.

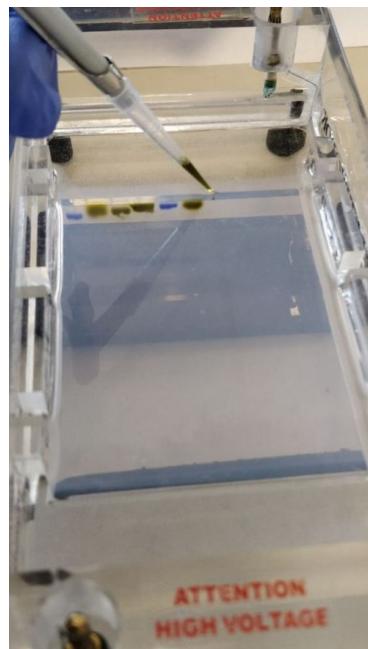


Figure 4: Fase di caricamento dei pozetti

il Marker è un composto da una miscela di frammenti lineari di DNA di dimensioni note i quai migrano nel gel in maniera nota. In questo modo, confrontando il mio campone con il marker, posso dire più o meno di che lunghezza è il mio frammento.

il Loading buffer è un colorante con velocità di migrazione nota, aggiunto ai miei composti aggiunti ai pozetti in modo da seguire istante per istante l'andamento dell'elettroforesi.



Figure 5: Divisione delle bande colorate (Loading buffer)

9. Una volta caricati i pozzetti, si chiude la scatola per l'elettroforesi e si va ad azionare la corrente, aspettando il tempo necessario che le bande siano ben separate.
10. Finito il processo di elettroforesi, si va a prendere il gel e lo si mette su una piastra che emana raggi UV, e lo si copre con una lastra di vetro che non fa conpenetrare i raggi UV, di modo da non danneggiare gli occhi dai raggi, e avviata la macchina che manda i raggi, si potranno notare le bande dove si è localizzato il nostro DNA rispetto alle bande del marker, per capire la lunghezza del nostro frammento.

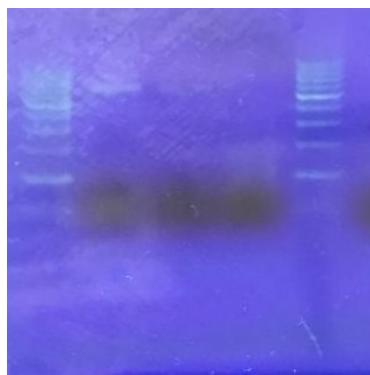


Figure 6: Fluorescenza del SyberSafe (DNA)

1.3 Risultati e Conclusioni

Durante questa esperienza abbiamo capito il funzionamento dell'elettroforesi nei suoi passaggi, tra cui la preparazione del gel di agarosio, la preparazione e la colorazione delle soluzioni, il caricamento nei pozzetti di queste e la successiva fluorescenza data dai raggi UV.

Abbiamo capito poi il processo di digestione tramite gli enzimi di restrizione, soprattutto quello usato da noi cioè EcoR I.

Andando a guardare l'immagine risultante dalla fluorescenza, possiamo notare come nei nostri pozzetti, la nostra quantità di DNA è molto bassa rispetto al marker(all'interno del primo pozzetto e del sesto pozzetto) e andando a confrontare con il marker si può sapere all'incirca le dimensioni dei nostri frammenti.

2 Trasformazione delle cellule di escherichia coli xl1 blue

2.1 Sommario

2.1.1 Scopo

L'obiettivo di questa esperienza è quello di manipolare le **culture batteriche di E.coli** (batterio gram negativo non patogeno usato comunemente all'interno dei laboratori di ricerca), andando a **trasportare il plasmide pUC18**, precedentemente trattato, all'interno di questi batteri per poi andare ad essere quello che è un ceppo di propagazione(atto al clonaggio e alla propagazione di plasmidi) all'interno di un terreno di crescita.

2.1.2 Cenni teorici

Il procedimento di trasporto del dsDNA da esterno alla cellula all'interno è chiamato **trasformazione batterica**, ed è un fenomeno parasessuale che consente ai batteri lo scambio di materiale genico.

Solo alcune specie batteriche possono acquisire DNA estraneo dall'ambiente (DNA esogeno) che deve essere a doppia elica con facilità, queste sono dette cellule "*naturalmente competenti*", altre specie invece diventano competenti solo in particolari condizioni fisiologiche ed altre ancora come per esempio E.coli necessitano di una trasformazione artificiale in laboratorio tramite vari metodi chimici o fisici (da noi usato è il metodo dello *shock-termico*) che le rende **competenti**.

una volta che il plasmide si trova all'interno della cellula batterica di E.coli, questa la si fa crescere all'interno di piastre precedentemente preparate con LB-agar-amp (Luria Bertani medium with ampicillin), in grado di fornire il nutrimento necessario alla cellula per potersi nutrire e clonare, producendo molte cellule batteriche contenenti molti plasmidi ingegnerizzati di nostro interesse.

2.2 Materiali utilizzati

- Guanti in lattice
- Provette Eppendorf (2mL)
- Micropipette (100-1000 e 2-200 microlitri)
- Scatola di polistirolo contenente ghiaccio
- Bagno termostatico
- piasra di LB-agar-amp
- bacchette in vetro

2.3 Soluzioni utilizzate

- miniprep del pUC18
- cellule competenti

- LB liquido

2.4 Procedimento

1. Come primo lavoro si è dovuto diluire la nostra miniprep del pUC18 (descritta nell’esperienza numero 1) in acqua pura in misura 1:10 quindi, necessitando ai passi successivi di 1 microlitro di soluzione diluita, si è ritenuto adeguato prelevare 1 microlitro di miniprep del pUC18 e 9 microlitri di acqua pura tramite una micropipetta e inserire le due componenti in una nuova provetta eppendorf da 2 mL.
2. Si è andati ora a lavorare in una *ambiente biologicamente sterile* per poter prelevare sotto cappa biologica 100 microlitri di cellule competenti, e li si è messi in una provetta eppendorf sempre da 2 mL. Lavorando in un ambiente sterile si garantisce che il nostro ambiente sia protetto da agenti inquinanti derivanti dall’esterno.
3. A questo punto all’interno della eppendorf contenente le cellule competenti si è andato ad aggiungere 1 microlitro della miniprep, diluita con acqua al passo n° 1, così formando una soluzione contenente sia le cellule batteriche che i plasmidi che dovranno poi entrare all’interno delle cellule.
4. Una volta che la soluzione è stata Agitata per far sì che i plasmidi si distribuiscono in modo unitario all’interno della soluzione, si va ad incubare la provetta contenente la soluzione in ghiaccio, una trentina di minuti per far sì che la temperatura si abbassi gradualmente di qualche grado e che i plasmidi si vadano a legare sulla membrana della cellula batterica.
5. Passata una mezz’ora, la temperatura della soluzione contenente cellule e plasmidi si è raffreddata e stabilizzata ad una bassa temperatura e in linea teorica i plasmidi si sono ancorati alle membrane delle cellule dove dovranno poi essere incorporati, ora bisogna effettuare un’operazione di cruciale importanza, cioè lo **shock termico**, portando la provetta eppendorf da una temperatura di ca. 0°C(ghiaccio) ad una temperatura di 42°C molto rapidamente e lasciarla nel bagno termostatico per 1 minuto (il tempo è importante poichè se si lascia il tutto ad una temperatura alta per troppo tempo le cellule batteriche potrebbero morire). Questo passaggio fa sì che all’interno delle cellule batteriche di E.coli si aprano dei pori, in grado di far passare il DNA esogeno nella parte interna della membrana, cioè all’interno della cellula formando così una **cellula trasformata**, al cui interno c’è il plasmide contenente il gene interessato. (un’altro metodo per poter effettuare l’apertura dei pori e la successiva immissione dei plasmidi all’interno delle cellule competenti è l’elettroporazione che consiste in una repentina scarica elettrica ad alto voltaggio, il vantaggio di questa è che può essere applicata anche a cellule eucariotiche)



Figure 7: Bagno termostatico e immersione in ghiaccio

6. Subito passato il minuto si prende di nuovo la eppendorf e la si rimette in ghiaccio per altri 5 minuti, facendo in questo modo si favorisce di nuovo il *rallentamento del metabolismo cellulare*.
7. Si aggiunge poi del nutriente LB liquido all'interno della provetta, e la si incuba a 37°C per 1 ora, facendo così, la cultura batterica si accresce e si esprime la **resistenza all'antibiotico** (ampicillina) (gene contenuto all'interno del plasmide) per poter poi sapere, una volta messo sul terreno di LB-amp se il nostro plasmide è stato effettivamente incorporato all'interno della cellula batterica o no.

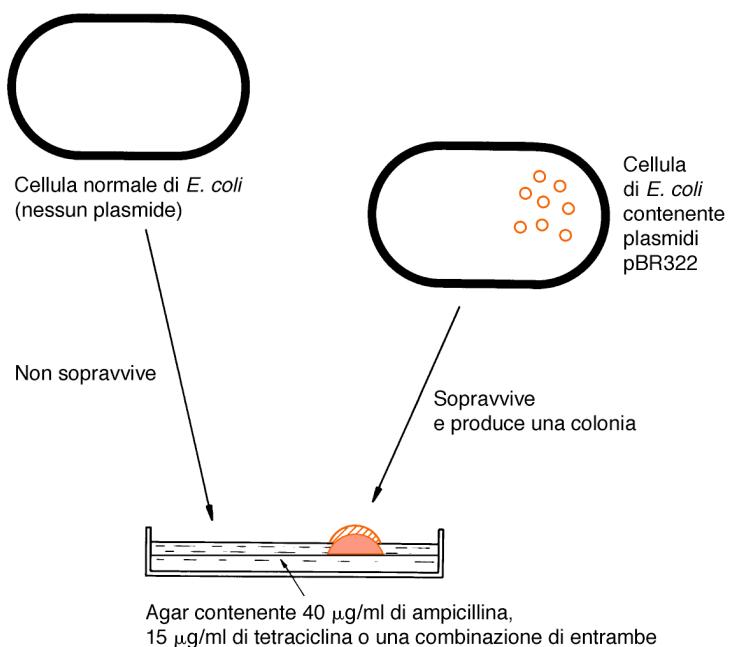


Figure 8: Colonie con il plasmide integrato resistono al terreno con ampicillina

- Come ultimo passaggio si va a piastrare 150-200 microlitri della sospensione delle cellule precedentemente incubate a 37°C, su di una piastra di LB-amp, distribuendole con una bacchetta di vetro a forma di 'L' su tutta la superficie della piastra, le si mettono poi ad una temperatura di 37°C per una notte a crescere.

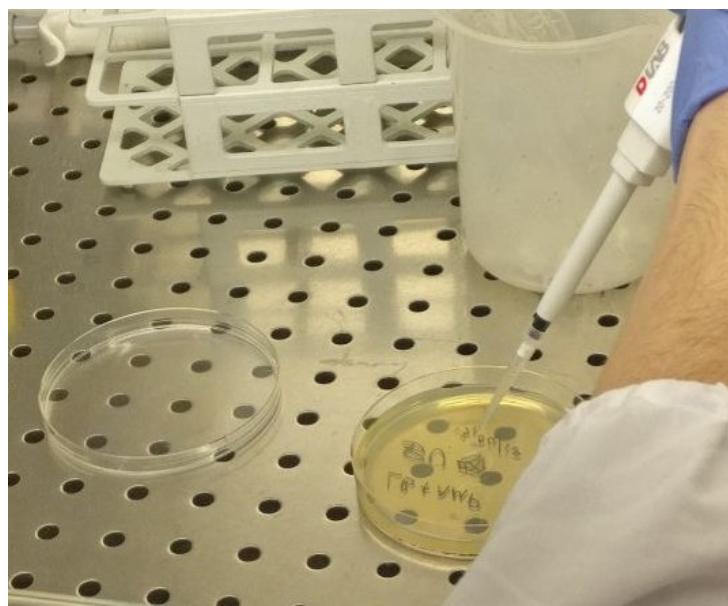


Figure 9: Piastraggio delle cellule di *E. Coli* su terreno LB-Amp

2.5 Risultati e Conclusioni

Tramite questa Procedura si è potuto inserire all'interno delle nostre cellule batteriche di E.coli rese competenti, i plasmidi pUC18 contenenti i geni di mio interesse da clonare, o da esprimere.

3 SEPARAZIONE CELLULARE SU GRADIENTE DI FICOLL

3.1 Sommario

3.1.1 Scopo

In questa esperienza introduciamo la metodologia di separazione per le cellule del sangue. Questa operazione viene effettuata per purificare linfociti e monociti, separandoli dai globuli rossi e dai granulociti (esempio piastrine) che sono di gran lunga i componenti più numerosi del sangue.

Considerazione: essendo che non possiamo lavorare con il sangue in quanto può essere molto rischioso abbiamo usato delle cellule di melanoma prese da una coltura

3.1.2 Cenni teorici

L'utilizzo di questa procedura viene usata specialmente per il sangue. Essa permette di isolare le sue diverse componenti in modo tale da poter successivamente lavorare più nello specifico con quelle di nostro interesse.

Un ruolo importante lo riveste il Ficoll. Il Ficoll è un copolimero sintetico di alto peso molecolare e grazie alla sua densità permette di spingere verso il fondo quelle componenti che non ci interessano. Quindi nel caso del sangue otterremo 4 diverse fasi:

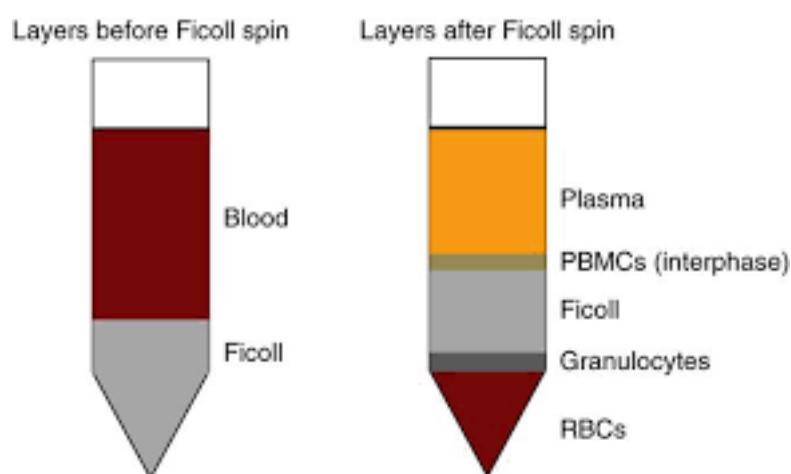


Figure 10: Falcon con sangue pre e post centrifuga

3.2 Materiali utilizzati

- Guanti in lattice
- Provette Eppendorf (1.5 mL)
- Falcon da 15 ml
- Falcon da 50ml

- Camera di Burker
- Centrifuga
- Micropipetta 100 - 1000 μ l

3.3 Soluzioni utilizzate

- PBS
- Tripsina
- Wash Buffer (terreno di coltura contenente FBS)
- FBS
- Ficoll

3.4 Procedimento

3.4.1 Preparazione della sospensione cellulare

1. Eliminare il terreno di coltura
2. Lavare le cellule con 20 ml di PB; eliminare il liquido di lavaggio
3. Ripetere il lavaggio con ulteriori 20 ml di PBS; eliminarlo
4. Addizionare 5 ml di tripsina; lasciare incubare per 5' a 37°C. La tripsina permette di staccare le cellule in modo non meccanico
5. Addizionare alla tripsina 15 ml di Wash Buffer (terreno di coltura con FBS)
6. Centrifugare a 300 g per 10' RT
7. Risospendere in 50 ml di Wash Buffer
8. A 5 ml di sospensione aggiungere ulteriori 5 ml di Wash Buffer portando ad un volume di 10 ml totali

3.4.2 Allestimento separazione su gradiente

1. Diluire il PBS 10X e prelevarne 50 ml 1X in una falcon da 50 ml
2. Aliquotare su una Falcon da 15 ml 4 ml di Ficoll
3. Stratificare molto lentamente, mediante l'utilizzo di una Pasteur monouso, la sospensione di cellule; bisogna far attenzione a non agitare per non compromettere la stabilità della deposizione su Ficoll
4. Centrifugare per 30' a 800 g RT senza accelerazione né freno
5. Dopo la centrifuga si ottiene una separazione su gradiente che isolerà le cellule formando un anello in base alla loro densità. Otteniamo nel nostro caso solo una fase, ma nel caso del sangue si vedrebbero diverse fasi che rappresentano le varie componenti

6. Prelevare l'anello di cellule formatosi tra il Ficoll e il liquido si sospensione cellulare facendo particolare attenzione in quanto è un passaggio delicato. Prelevato l'anello spostarlo in una Falcon da 15 ml
7. Riempire per decantazione la Falcon di PBS portandolo a un volume finale di 15 ml
8. Centrifugare a 400g per 10'; finita la centrifuga scartare il surnatante e risospendere il pellet di cellule
9. Aggiungere per decantazione ulteriore PBS e portarlo a un volume di 10 ml
10. Centrifugare nuovamente a 400 g per 10'; finita la centrifuga scartare di nuovo il surnatante e risospendere in 1ml di PBS con la micropipetta da 100 μ
11. Spostare infine su una eppendorf da 1.5 ml

3.4.3 Conta cellulare su camera contaglobuli di Burker

1. Diluire le cellule 1:10 in μ finali su nuova eppendorf
2. Montare la camera di Burker



Figure 11: Burker

3. Riempire i due pozzetti della camera per capillarità mediante l'utilizzo di una pipetta da 200 μ l. Capiamo che la camera è piena quando da sotto il copri-vetrino uscirà una goccia.

4. Contare le cellule comprese all'interno del quadrato che presenta come bordo 3 righe.

3.5 Risultati e Conclusioni

Il numero di cellule da noi trovate è 92. Un numero così elevato è stato ottenuto per la non diluizione specificata precedentemente.

Il totale delle cellule diluite si sarebbe ottenuto con questa formula :

$$[cellule] = (num.cellule) * (fatt.diluzione) * (fatt.moltiplicativocamera)$$

Nel nostro caso il fattore moltiplicativo della camerà è 10000.