

RELAZIONI DI LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE

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

June 15, 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 :

Prima di entrare in un laboratorio, bisogna come prima cosa, adeguarsi del materiale necessario per poter eseguire i vari lavori in tutta **sicurezza e praticità**, per questo abbiamo bisogno di munirci sei seguenti strumenti:

1. In primis : guanti in lattice



Figure 1: Guanti in lattice usa e getta da laboratorio con lo scopo di proteggere le mani da agenti di vario tipo, principalmente dannosi alla pelle, oppure per proteggere i materiali utilizzati.

2. Camice:



Figure 2: Camice bianco da laboratorio, utilizzato in tutti i laboratori per esigenze di igiene e pulizia.

3. Cappa biologica:



Figure 3: La cappa biologica o cappa a flusso laminare, è una cappa utilizzata in ambito biologico per la protezione di chi maneggia elementi biologici, ed elimina la possibilità di contaminazioni crociate, consentendo un lavoro in condizioni di sterilità.

4. Cappa chimica:



Figure 4: La cappa biologica o cappa aspirante, è un apparecchio utilizzato nei laboratori per proteggere l'operatore da eventuali vapori derivati da reazioni chimiche.

5. Provette Eppendorf :



Figure 5: provetta Eppendorf, di dimensione variabile, da 250 µL ai 2mL, utilizzate come provette monouso per piccole quantità di liquido. Utili nella centrifugazione.

6. Provette Falcon :

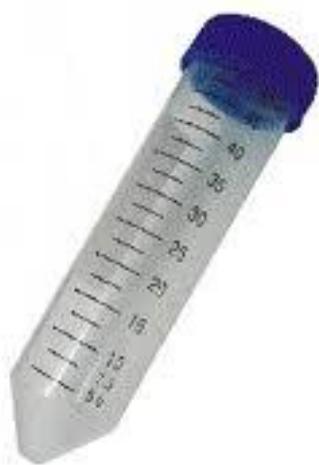


Figure 6: la provetta falcon, così come quella eppendorf è un oggetto usa e getta, poichè non possono essere sterilizzate ad alte temperature, sono però abbastanza resistenti alle basse temperature(per motivi di conservazione a lungo termine di campioni biologici). Anche queste possono contenere del materiale atto per le esperienze, sono più capacitive delle provette eppendorf.

7. Beuta:



Figure 7: la beuta è un recipiente con base tronco-conica e collo cilindrica usato nei laboratori. Ne esistono di varie dimensione, solitamente vanno da una capacità di 10mL fino anche ad 1L. La forma particolare, ne consente la minimizzazione delle perdite di evaporazione e la possibilità di agitarne il contenuto senza spanderlo.

8. Bottiglia da laboratorio:



Figure 8: La bottiglia da laboratorio è un recipiente per le soluzioni che necessitano di un tappo per non far disperdere i gas durante le varie reazioni.

9. pipette:

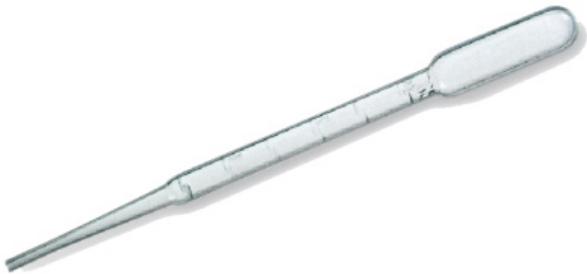


Figure 9: La pipetta è uno strumento da laboratorio, con il quale si possono prelevare determinate quantità di liquido. Sono poco precise nella misurazione delle quantità, per questo esistono le micropipette o le micropipette elettroniche.

10. Micropipette e puntali:



Figure 10: Le micropipette ed i relativi puntali dietro, sono delle tipologie di pipette, però con la capacità precisiva più alta rispetto alle precedenti. Quelle usate in laboratorio da noi, consentono il prelievo di 1000 μL -100 μL , 200 μL -20 μL , 10 μL -0.5 μL .

11. Microscopio ottico:



Figure 11: Il microscopio ottico è un tipo di miscroscopio che sfrutta la luce con lunghezza d'onda dal vicino infraroso all'ultravioletto, coprendo tutto lo spettro visibile. E' il microscopio più semplice e antico della storia. Consente di ingrandire l'immagine di un campione illuminato con luce nell'intervallo spettrale del visibile, per mezzo di lenti

12. Vasca per l'elettroforesi:

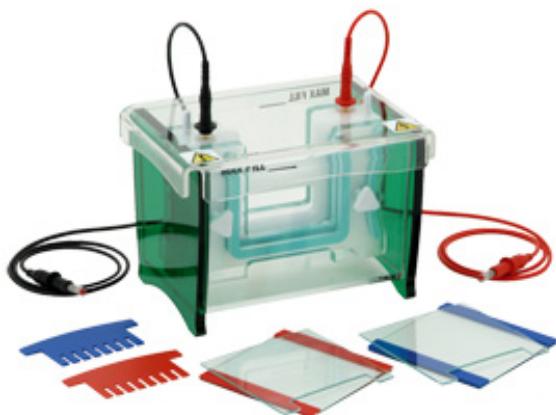


Figure 12: Serve per l'appunto per l'elettroforesi, tecnca per analizzare e separare acidi nucleici, sfruttando cariche presenti nelle molecole di DNA e RNA per farle migrare.

RELAZIONI:

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 tagliano 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 tagliano 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 tagliano 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 perché 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, ma 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 che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi).

Il principio di funzionamento dell'elettroforesi consiste nel movimento di particelle caricate negativamente, DNA, 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.

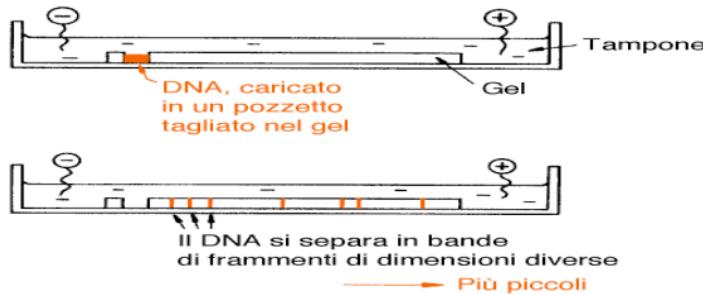


Figure 13: Elettroforesi su GEL

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 restrizione EcoR I
- Acqua
- Buffer 10X(digestione)
- TAE 50X
- SyberSafe
- Marker (DNA Ladder)

1.2 Procedimento

1.2.1 Restruzione del DNA

1. prelevare 10 µL di pUC18 e metterli in una nuova eppendorf ed altri 11.5 µL da mettere in un’ulteriore eppendorf per effettuare 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 H₂O, successivamente 2.5 µL di buffer 10X ed infine 1 µL del nostro enzima di restruzione EcoR I.
3. Portare la eppendorf contenente la reazione ad una temperatura di 37°C (Temperatura ottimale per l’enzima di restruzione EcoR I) per 1-2 ore, in 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 78.4 ml di H₂O in 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 soluzione ad una temperatura prossima all’ebollizione. Andremo quindi a scaldare il tutto all’interno di un forno a microonde, prestando attenzione che la soluzione non bolla per più di qualche secondo.
3. Una volta estratta la beuta, facendo attenzione al calore, la si mescola fino a che non si otterrà una soluzione omogenea in contenuto e colore.



Figure 14: Mescolamento della soluzione con agarosio

4. Una volta che la soluzione risulta omogenea e la sua temperatura è calata, si va ad aggiungere 5 μL di SyberSafe. Questo serve come intercalante che si va a legare alla doppia elica e sottoposto a raggi UV si rende visibile grazie alla sua fluorescenza.
5. Andiamo a versare la soluzione nella vaschetta apposita che, solidificandosi, ne prende la forma. Bisogna inserire il pettine all'interno della vaschetta, finchè il gel non ha ancora solidificato. In questo modo si creeranno i pozzetti dove si andrà a mettere il contenuto delle due eppendorf preparate in precedenza una volta che il gel risulterà solidificato.

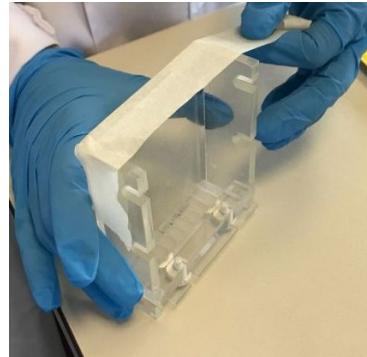


Figure 15: Vaschetta per solidificazione del gel di agarosio

6. Non appena il gel si sarà solidificato, porlo nella vaschetta togliendo il pettine.
7. Aggiungere 250 ml di buffer di corsa(TAE 1X) fino al livello indicato.
8. Caricare all'interno dei pozzetti le varie soluzioni 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.

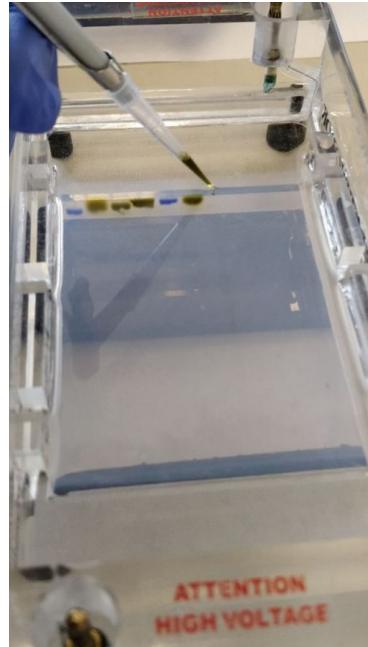


Figure 16: Fase di caricamento dei pozzetti

Il Marker è un composto da una miscela di frammenti lineari di DNA con dimensioni note che migrano nel gel in prevedibile. In questo modo, è possibile confrontare il campione con il marker, determinando approssimativamente la lunghezza del frammento.

Il Loading buffer è un colorante con velocità di migrazione nota, aggiunto ai composti inseriti nei pozzetti in modo da poter seguire l'andamento dell'elettroforesi.



Figure 17: Divisione delle bande colorate (Loading buffer)

9. Caricati i pozzetti chiudere la scatola per l'elettroforesi ed azionare la corrente, aspettando il tempo necessario affinchè bande risultino ben separate.
10. Finita la corsa elettroforetica, prendere il gel e metterlo su una piastra che emana raggi UV. Coprire con una lastra di vetro che non permetta la fuoriuscita dei raggi UV, in modo da non danneggiare gli occhi. Avviare la macchina che emette radiazioni UV, in modo da vedere le bande dove il DNA è localizzato. Confrontandolo con le bande del marker, si può capire la lunghezza dei vari frammenti.

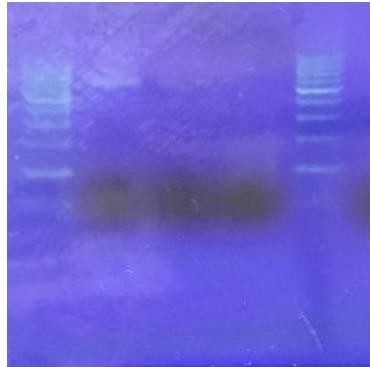


Figure 18: Fluorescenza del SyberSafe (DNA)

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 pozzi di queste e la successiva fluorescenza data dai raggi UV.

Abbiamo compreso poi il processo di digestione tramite gli enzimi di restrizione, nel nostro caso l'enzima EcoR I.

Andando a guardare l'immagine risultante dalla fluorescenza, possiamo notare come nei nostri pozzi, la quantità di DNA è molto bassa rispetto al marker (all'interno del primo pozzetto e del sesto pozzetto). Confrontando con le bande del marker possiamo capire all'incirca le dimensioni dei nostri frammenti.

2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 Sommario

2.1.1 Scopo

In questa esperienza di laboratorio eseguiamo la PCR, una tecnica che fa uso della DNA polimerasi con lo scopo di amplificare un frammento di DNA ed ottenere così un ampio numero di copie.

2.1.2 Cenni teorici

La PCR è composta da una serie di cicli (con temperature e tempistiche differenti) che si svolgono in uno specifico macchinario chiamato **termociclatore**, che permette di eseguire questi cicli in maniera automatica. Per effettuare la PCR inoltre prepareremo un gel di agarosio 0,8% su cui avverrà la corsa elettroforetica.

2.1.3 Materiali utilizzati

- Eppendorf
- Micropipette
- Forno microonde
- Vaschetta per Elettroforesi
- Lampada UV
- Beuta

2.1.4 Soluzioni utilizzate

- H₂O sterile
- Buffer TAQ 10X
- MgCl₂
- Primer FOR
- Primer REV
- DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000bp
- TAQ polimerasi

2.2 Procedimento

2.2.1 Preparazione PCR

Prendiamo una eppendorf da 250 μ l in cui bisogna aggiungere (Attenzione a non contaminare):

- 12 μ l H₂O sterile
- 2 μ l buffer TAQ (10X)
- 1 μ l MgCl₂ (50mM)

Passo	Temperatura	Tempo	Numero d
Denaturazione Iniziale	94 °C	5 min	1
Denaturazione	94 °C	30 s	
Annealing	56 °C	30 s	35
Estensione	72 °C	1.5 min	
Estensione Finale	72 °C	10 min	1

Figure 19: Cicli termociclatore

- 1 μ l Primer FOR (25 μ M)
 - 1 μ l Primer REV (25 μ M)
 - 1 μ l dNTPs (10 mM)
 - 1 μ l DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000 bp
 - 1 μ l TAQ polimerasi
- Totale 20 μ l

Il mix ottenuto nella eppendorf viene inserito nel termociclatore.

2.2.2 Preparazione gel di agarosio 0,8%

Passiamo alla preparazione del gel di Agarosio 0,8% per la corsa elettroforetica. Pesiamo le seguenti quantità per un gel allo 0,8% in una beuta:

- 0,6 g di agarosio
- 1,6 ml TAE 50X
- 78,4 ml H₂O

Totale 80 ml

1. Scaldare nel forno a microonde la beuta con i componenti facendo attenzione a non portare ad ebollizione, mescolando ogni tanto per sciogliere bene.
2. Aggiungere 5 μ l di SyberSafe.
3. Mescolare e versare nell'apposita vaschetta usando il pettine per creare i pozzetti.
4. A gel solidificato togliere il pettine e aggiungere 250 ml di buffer di corsa (TAE 1X).
5. Preparato il gel nella camera per l'elettroforesi caricare nei pozzetti la soluzione preparata in precedenza dopo che il termociclatore ha terminato il lavoro.
6. Avviare la corsa elettroforetica.
7. Finita la corsa elettroforetica, con l'ausilio di una lampada UV, osservare il risultato ottenuto.

2.3 Risultati e Conclusioni

Controllando la fluorescenza possiamo capire l'efficacia della replicazione ottenuta. Confrontando il pozzetto caricato da noi con un secondo pozzetto dove è presente un marker possiamo capire se la PCR ha replicato il nostro frammento di DNA o anche altri frammenti aspecifici.



Figure 20: Risultato della PCR

3 Preparazione di: terreno LB solido, cellule competenti e piastre LB-agar

3.1 Sommario

3.1.1 Scopo

Quest'esperienza in laboratorio si divide in tre fasi: Una prima fase che consiste nella preparazione del terreno di cultura dove andranno a crescere le nostre cellule batteriche; Una seconda fase consistente nella preparazione delle cellule competenti; E infine l'ultima fase consiste nella preparazione delle piastre di LB-agar, dove andremo a mettere il terreno e infine dove cresceranno i nostri batteri.

3.1.2 Cenni teorici

Colture batteriche

All'interno dei laboratori, i ceppi che comunemente si usano sono dei ceppi che derivano dal batterio di *E.coli*, che è un batterio gram negativo non patogeno, che viene selezionato e modificato. A seconda del genotipo, cioè con mutazioni su particolari geni o introduzione di geni estranei, vengono utilizzati per diversi scopi, però in generale si possono dividere in questo modo:

- Ceppi di propagazione, atti al clonaggio o alla propagazione di plasmidi;
- Ceppi di espressione, atti ad esprimere le proteine ricombinanti.

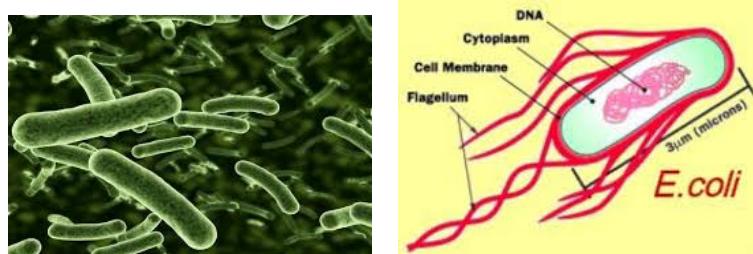


Figure 21: vista al microscopio del batterio di *Escherichia coli* (destra) e suddivisione di questo batterio (sinistra)

Terreni di cultura

I terreni di cultura, sono le soluzioni solide o liquide contenenti sostanze nutritive su cui è possibile crescere delle cellule eucariotiche (come *E.coli*) e procariotiche. Una possibile suddivisione può essere:

Stato fisico	<p>-LIQUIDI: componenti sciolti in acqua e sterilizzati; usati per crescita delle cellule; espressione di proteine ricombinanti ecc..</p> <p>-SOLIDI: possono essere naturalmente tali (terreno alla patata) o vengono solidificati per aggiunta di un agente gelificante (agar, gelatina). selezioni di cloni mediate isolamento di singole colonie, propagazione delle colonie o della linea cellulare</p>
Costituzione chimica	<p>-MINIMI: Per la crescita dei soli batteri autotrofi. Gli elementi essenziali (N, C, S, P) sono presenti come sali inorganici in composizione e quantità note.</p> <p>-SINTETICI(Definiti) : nota la formulazione chimica di ogni ingrediente; le singole sostanze di cui il batterio necessita sono presenti in quantità note.</p> <p>-COMPLESSI: Ignota l'esatta composizione chimica delle sostanze nutritive (estratto di carne di bue, cuore, cervello, ecc.), benché chimicamente non definite. Comprendono la maggior parte dei terreni usati in laboratorio. in questa sezione c'è il terreno LB(Luria Bertani medium). Questi terreni sono utilizzati per la crescita di cellule e per l'espressione di proteine ricombinanti non modificate.</p>
Funzione	<p>-ARRICCHIMENTO(ELETTIVI): la specie microbica di interesse vi cresce in un tempo assai più breve rispetto ad altre specie microbiche.</p> <p>-SELETTIVI: Contengono sostanze batteriostatiche (sali biliari, NaCl) a concentrazione nota che inibiscono o rallentano lo sviluppo di molte specie microbiche.</p> <p>Utilizzati per isolare specifici microrganismi da campioni altamente contaminati.</p> <p>-DIFFERENZIALI: Contengono sostanze indicatrici di particolari reazioni biochimiche che avvengono nel terreno stesso.</p> <p>Usati per la identificazione di specifici microrganismi.</p>

Piastra agar

Una **piastra Agar** è un disco di Petri sterile che contiene nutrienti di crescita (tipicamente agar + nutrienti) usati per coltivare micro-organismi o piccole piante. componenti di crescita selettivi, si possono aggiungere agli altri come per esempio antibiotici.

3.1.3 Materiali utilizzati

- Guanti in lattice
- Micropipette (100-1000 e 2-200 microlitri)
- Bottiglia da laboratorio
- Piastre di Petri
- Forno a micronde
- provetta Falcon da 50mL
- provetta eppendorf 2mL

3.1.4 Soluzioni utilizzate

- Soluzione Buffer I:
 1. RbCl 12 g/l (0.6g)
 2. MnCl*4H₂O 9.9 g/l (0.49g)
 3. 1.5 ml di una soluzione di KAc 1M a pH 7.5

4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/l (0.075g)
5. Glicerolo 150 g/l (7.5g)
6. Si porta a pH 5.8 con HAc, si porta a volume (50ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana a pori di 0.22 250 μL sotto cappa.

- Soluzione Buffer II:

1. 0.4 ml di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
2. RbCl 1.2 g/l (0.025g)
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11 g/l (0.22g)
4. Glicerolo 150 g/l (3g)
5. Si porta a volume (20ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 250 μL sotto cappa.

3.2 Procedimento

3.2.1 Preparazione del terreno LS-solido

La composizione del terreno LB(Luria-Bertani) medium è di :

- 1% Tryptone
- 0.5% Estratto di lievito
- 0.5% inattaccabile
- 1.5% Agar batteriologico

Per la preparazione di questo terreno bisogna eseguire questi passaggi:

1. Pesare le quantità necessarie cioè prendere: 0.5g di tryptone, 0.25g di estratto di lievito, 0.025g di NaCl e 0.75g di agar batteriologico e metterle in una beuta portando a volume 50mL con acqua distillata.
2. Attaccare alla mia bottiglia da laboratorio un autoclave, cioè un pezzo di scotch ma che si va a marcire quando la sua temperatura raggiunge i 100°C, questo serve per sapere se la nostra bottiglia, una volta inserita nella chiusura autoclave raggiunge la temperatura adatta per la nostra reazione.
3. Porare la Bottiglia all'interno dell' autoclave, cioè una macchina che è molto simile al funzionamento di una pentola a pressione, nella quale il contenuto delle bottiglie potrà raggiungere la giusta temperatura per la reazione.



Figure 22: Autoclave

3.2.2 Preparazione delle cellule competenti

1. Prelevare sotto cappa biologica 5 mL di una coltura di cellule i E. coli DH5a ed OD 600 di 0.3-0.4 e trasferirli in una provetta Falcon da 50 mL sterile;
2. Portare la provetta Falcon con le cellule di E.coli all'interno della centrifuga, e centrifugare per 5 minuti a 3000 g, a 4°C;
3. Prelevare la falcon centrifugata ed eliminare il surnatante, semplicemente rovesciando il contenuto. Le nostre cellule staranno ancorate in fondo alla provetta Falcon raggruppate, formando un pellet;
4. Risospendere le cellule in 0.8mL di buffer I;
5. Trasferire il contenuto in una provetta eppendorf da 2mL sotto cappa biologica;
6. Incubare in ghiaccio per 15 minuti;
7. Passati i 15 minuti si riprende la provetta eppendorf e la si fa centrifugare per 5 minuti a 3000g a 4°C;
8. Andare sotto cappa bilogica per eliminare il surnatante e risospendere le cellule in 400 µL di buffer II
9. Congelare in N₂ liquido e conservare a -80°C, questo passaggio viene effettuato con N₂ liquido perchè il passaggio di temperatura deve avvenire molto velocemente per garantire che le nostre cellule diventino competenti;

3.2.3 Preparazione delle piastre di LB-agar

Una volta che le bottiglie all'interno dell'autoclave sono state tolte, si prendono senza farle raffreddare troppo perchè senò la miscela si solidifica ed andando sotto cappa biologica aggiungiamo 100 100 µg/ml di ampicillina (50 µL dello stock 1000X). Una volta mescolato abbastanza, Si versa il terreno dalle bottiglie alle due pistre di Petri, Lasciandole aperte sotto cappa fino a che l'agar non solidifica. Una volta che l'agar si è solidificato si conservano a 4°C.

3.3 Risultati e Conclusioni

Durante questa esperienza, abbiamo capito come preparare un terreno di coltura batterico, spcialemtn un terreno solido LB, contenente ampicillina, che nella prossima esperienza capiremo a cosa serve; Abbiamo preparato poi delle cellule competenti, in grado di poter integrare del materiale genetico proveniente da un ambiente extracellulare; Ed infine abbiamo perparato una piastra di Petri con il nostro terreno mixato in precedenza.

4 Trasformazione delle cellule di escherichia coli xl1 blue

4.1 Sommario

4.1.1 Scopo

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

4.1.2 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, 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 copie contenenti molti plasmidi ingegnerizzati di nostro interesse.

4.2 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

4.3 Soluzioni utilizzate

- Miniprep del pUC18
- Cellule competenti
- LB liquido

4.4 Procedimento

1. Diluire la nostra miniprep del pUC18 (descritta nell'esperienza numero 1) in acqua pura in misura 1:10 quindi prelevare $1\mu\text{l}$ di miniprep del pUC18 e $9\mu\text{l}$ di acqua pura tramite una micropipetta e inserire le due componenti in una nuova provetta eppendorf da 2 ml. Questa diluizione è necessaria per avere un totale di $10\mu\text{l}$.
2. Prelevare in un *ambiente biologicamente sterile* (sotto cappa biologica) 100 microlitri di cellule competenti e metterli in una provetta eppendorf da 2 ml. Lavorando in un ambiente sterile si garantisce la protezione da agenti inquinanti derivanti dall'esterno.
3. Aggiungere $1\mu\text{l}$ della miniprep, diluita con acqua al passo n° 1, all'interno della eppendorf contenente le cellule competenti. In questo modo si forma una soluzione sia di cellule batteriche che di plasmidi, che dovranno poi entrare all'interno delle cellule.
4. Agitare la soluzione per far sì che i plasmidi si distribuiscano in modo uniforme.
5. Incubare la provetta contenente la soluzione in ghiaccio per una trentina di minuti in modo che la temperatura si abbassi gradualmente di qualche grado e che i plasmidi si vadano a legare sulla membrana della cellula batterica.
6. Attendere 30' in modo che la temperatura della soluzione contenente cellule e plasmidi si è abbassata e stabilizzata.
7. Ora linea teorica i plasmidi sono ancorati alle membrane delle cellule dove dovranno poi essere incorporati.
8. A questo punto effettuare 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 (la tempistica è importante poichè se si lascia il tutto ad una temperatura elevata per troppo tempo le cellule batteriche potrebbero morire). Questa operazione è di cruciale importanza, infatti fa in modo che sulle membrane delle cellule batteriche di E.coli si *aprano dei pori*, permettendo il passaggio del DNA esogeno (plasmide) all'interno formando così una **cellula trasformata**. Un altro metodo per 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 tecnica è che può essere applicata anche a cellule eucariotiche.



Figure 23: Bagno termostatico e immersione in ghiaccio

- Passato un minuto prendere la eppendorf e rimetterla in ghiaccio per altri 5 minuti, favorendo il *rallentamento del metabolismo cellulare*.
- Aggiungere del nutriente LB liquido all'interno della provetta, e incubarla a 37°C per 1 ora. In questo modo la cultura batterica si accresce e si esprime la **resistenza all'antibiotico** (ampicillina, codificata dal gene contenuto all'interno del plasmide). Una volta messo sul terreno di LB-amp, questo ci permette di sapere se il nostro plasmide è stato effettivamente incorporato all'interno della cellula batterica o no.

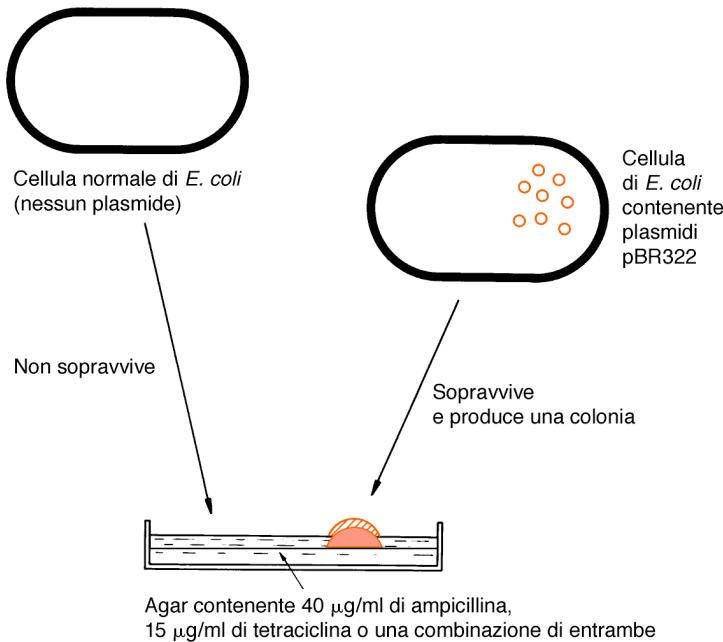


Figure 24: Colonie con il plasmide integrato resistono al terreno con ampicillina

- Piastrare 150-200 microlitri della sospensione delle cellule su di una piastra di LB-amp, distribuendole con una bacchetta di vetro a forma di 'L' su tutta la superficie. Metterle poi ad una temperatura di 37°C per una notte a crescere.

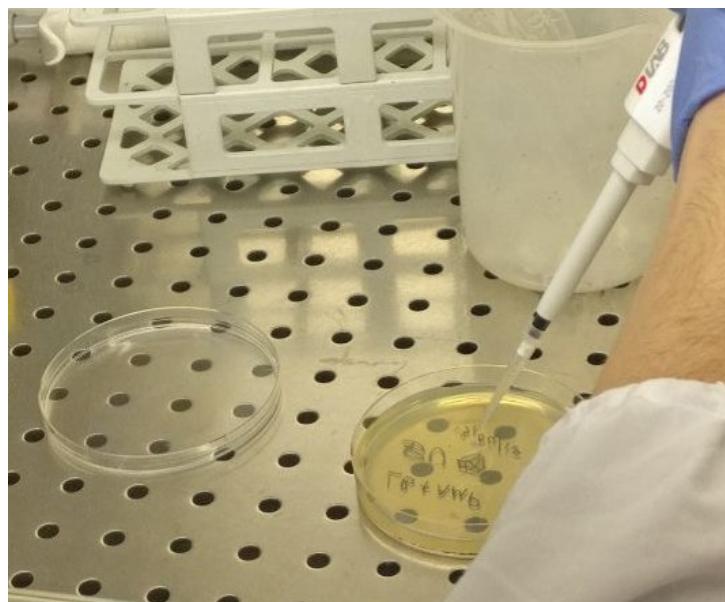


Figure 25: Piastraggio delle cellule di *E. Coli* su terreno LB-Amp

4.5 Risultati e Conclusioni

Tramite questa procedura abbiamo potuto inserire all'interno delle nostre cellule batteriche di E.coli i plasmidi pUC18 rendendole competenti, permettendoci così di clonare od esprimere i geni di interesse.

5 Amplificazione RealTime PCR. Estrazione proteine totali

5.1 Sommario

5.1.1 Scopo

In questa esperienza vediamo due procedimenti:

- Amplificazione di un cDNA tramite la PCR real time.
- L'estrazione delle proteine e la loro quantificazione al Qubit 3.

5.1.2 Cenni teorici

La PCR real time è una particolare PCR che ci permette di amplificare e contemporaneamente quantificare il DNA in tempo reale osservando la fluorescenza ad ogni iterazione. Per rendere il campione fluorescente si utilizza una sonda composta da un colorante fluorescente (Responser) e da un Quencer che assorbe l'energia della fluorescenza. La sonda si lega tra i due primer (forward e reverse) del gene. Quando la sonda viene degradata (dall'attività esonucleasica della TAQ-polimerasi) il Quencer e il Responser si separano. In questo modo il Responser è libero di emettere fluorescenza che risulta visibile e misurabile.

5.1.3 Strumenti e materiali utilizzati

- Guanti in lattice
- Provette Eppendorf (1.5ml)
- Assay tube (500 μ l)
- Micropipette (100-1000 e 2-200 μ l)
- Qubit 3 (per quantificare le proteine)

5.1.4 Soluzioni utilizzate

- cDNA
- Pellet cellulare per l'estrazione delle proteine
- RIPA buffer (soluzione tampone utilizzata per l'estrazione di proteine da cellule di mammifero)
- Working solution

5.2 Procedimento

5.2.1 Amplificazione RealTime PCR

- Prendere il cDNA dall'esperienza precedente
- Utilizzare questa quantità di reagenti per un volume finale di 40 μ l diviso in due pozzetti da 20 μ l:

Reagente	Concentrazione	μ l/pozzetto	μ l 2 pozzetti
MasterMix	2X	10 μ l	20 μ l
Sonda TaqMal	20X	1 μ l	2 μ l
H ₂ O	1X	7 μ l	14 μ l
cDNA	1X	2 μ l	4 μ l

- Aliquotare ogni reagente in un'eppendorf da 1,5ml.
- Spostare ogni reazione nei pozzetti (appoggiarsi al bordo per essere più precisi)
- Sigillare con l'adesivo ottico
- Centrifugare brevemente
- Avviare la reazione di amplificazione

Questi sono i parametri del termociclato:

Parametro	Incubazione UNG	Attivazione polimerasi	PCR (40 cicli)	
	Hold	Hold	Denaturazione	Annealing/estensione
Temperatura	50C	95C	95C	60C
Tempo (mm:ss)	02:00	10:00	00:15	01:00

- Attendere il completamento ed analizzare i dati raccolti

5.2.2 Estrazione delle proteine

- Risospendere il pellet cellulare in 100ul di RIPA Buffer addizionato di inibitori di proteasi con la diluizione:

Reagente	Concentrazione	Quantità	
RIPA buffer	1X	96ul	
Inibitori	25X	4ul	Il buffer di lisi serve a rompere le cellule.
TOT = 100 μ l			

- Incubare per 45' in ghiaccio
- Centrifugare per 40" a 4°C
- Prelevare il surnatante (contenente le proteine) in una nuova eppendorf
- Conservare in ghiaccio

5.2.3 Quantificazione proteine con Qubit 3

- Preparare la Working Solution, che servirà sia per la taratura dello strumento che per la misurazione della quantità di proteine. Nel nostro caso lo strumento era già stato tarato, quindi dalla tabella escludiamo le 3 dosi per la taratura.

Reagente	Quantità 1 dose	Quantità 10 dosi
Qubit protein reagent	1ul	10ul
Qubit protein buffer	199ul	1990ul
	TOT = 200ul	TOT = 200ul

- Aliquotare 190 μ l di Working Solution in un AsseyTube da 500 μ l
- Aggiungere 10 μ l di proteine, invertire il tubo 10 volte e centrifugare brevemente
- Lasciare la miscela al buio per 15'
- Leggere l'emissione del fluoroforo



Figure 26: Risultati della quantificazione delle proteine.

5.3 Risultati e Conclusioni

- RealTime PCR: Come risultato abbiamo osservato un grafico con una curva di amplificazione con le quantità ad ogni ciclo. Abbiamo visto che ha un andamento logaritmico. Tracciando una linea orizzontale è possibile verificare la soglia di fluorescenza.
- Quantificazione Proteine: La concentrazione ottenuta per le nostre proteine è di 436 ng/ul. Visto che eravamo partiti con una quantità di 100ul, e 10ul sono stati utilizzati per la quantificazione, moltiplicando per 90ul possiamo ottenere la quantità totale di proteine del nostro campione.

6 SEPARAZIONE CELLULARE SU GRADIENTE DI FICOLL

6.1 Sommario

6.1.1 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.

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

6.1.2 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:

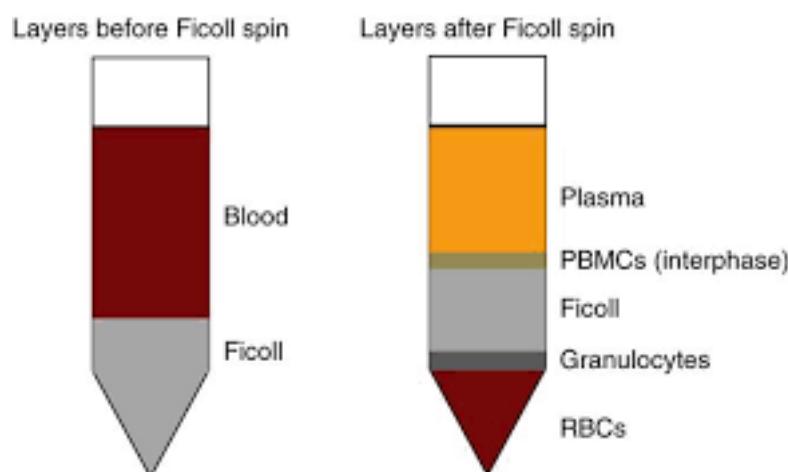


Figure 27: Falcon con sangue pre e post centrifuga

6.2 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

6.3 Soluzioni utilizzate

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

6.4 Procedimento

6.4.1 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

6.4.2 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

6.4.3 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 28: 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.

6.5 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 :

$$[cellule] = (\text{num.cellule}) * (\text{fatt.diluzione}) * (\text{fatt.moltiplicativocamera})$$

Nel nostro caso il fattore moltiplicativo della camerà è 10000.