

# Amplificazione RealTime PCR. Estrazione proteine totali (Esercitazione n° 10)

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

20 Aprile 2018

## 1 Sommario

### 1.1 Scopo

Questa esperienza ha come scopo quello di amplificare un cDNA tramite la PCR real time. Inoltre vediamo l'estrazione delle proteine e la loro quantificazione al Qubit 3.

### 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. Pargonando due campioni diversi e' possibile stabilire il rapporto tra le quantita' iniziali della sostanza. Per rendere il campione fluorescente si utilizza una sonda composta da una colorante fluorescente (Responser) e da un Quencer che assorbe l'energia della fluorescenza. La sonda si lega tra i due primer del gene. Quando la sonda viene degradata (dall'attivita' esonucleasica della TAQ-polimerasi) il Quencer e il Responser si separano, in questo modo il Responser e' libero di emettere la fluorescenza che e' quindi misurabile.

## 2 Strumenti e materiali utilizzati

- Guanti in lattice
- 2xProvette Eppendorf (1.5mL)
- Assay tube (500ul)
- Micropipette (100-1000 e 2-200 microlitri )

- Qubit 3 (per quantificare le proteine)

### 3 Soluzioni utilizzate

- cDNA
- Pellet cellulare per l'estrazione delle proteine
- RIPA buffer
- Working solution
- 
- miniprep del pUC18
- cellule competenti
- LB liquido

### 4 Procedimento

#### 4.1 Amplificazione RealTime PCR

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

Reagente	Concentrazione	$\mu$ l/pozzetto	$\mu$ l 2 pozzetti
MasterMix	2X	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Sonda TaqMal	20X	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1X	7 $\mu$ l	14 $\mu$ l
cDNA	1X	2 $\mu$ l	4 $\mu$ 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 termociclatore:

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

- Attendere il completamento ed analizzare i dati raccolti

## 4.2 Estrazione delle proteine

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

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

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

## 4.3 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 190ul di Working Solution in un AssayTube da 500ul
- Aggiungere 10ul di proteine, invertire il tubo 10 volte e centrifugare brevemente
- Lasciare la miscela al buio per 15'
- Leggere l'emissione del fluoroforo

## 5 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 e' possibile verificare la soglia di fluorescenza.

Quantificazione Proteine: La concentrazione ottenuta per le nostre proteine e' 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.



Figure 1: Risultati della quantificazione delle proteine.