UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Informatica
Corso di laurea in Bioinformatica

Relazioni di Laboratorio di Biologia Molecolare

Docente
Prof. Stefano Capaldi

Studenti
Elisa Biasi
Irene Greco
Mattia Frigiola

Anno Accademico 2022-2023

Indice

1 Miniprepazione del DNA plasmidico **1**
1.1 Materiali e composti utilizzati 1
1.2 Protocollo 1
A Preparazione del campione 1
B Depurazione del campione 1
C Trattamento con fenolo-cloroformio 2
D Conservazione del DNA plasmidico 2

2 Estrazione dell'RNA con TRIzol **5**
2.1 Materiali e composti utilizzati 5
2.2 Protocollo 5

3 Restrizione DNA **8**
3.1 Materiali e composti utilizzati 8
3.2 Protocollo 8
A Preparazione della reazione di digestione 8
B Preparazione del gel di agarosio 8
C Elettroforesi 9

4 Reazione a catena della polimerasi – PCR **11**
4.1 Materiali e composti utilizzati 11
4.2 Protocollo 11
A Preparazione ed esecuzione della PCR 11

5 Preparazione di terreno LB solido **13**

1 Miniprepazione del DNA plasmidico

1.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- Pipette Eppendorf da 1,5 e 2,5 mL
- Propipette
- Vortex
- Centrifuga
- Freezer

Composti utilizzati

- **Coltura batterica** di batteri resistenti alla amoxicillina (antibiotico)
- **Soluzione I**: soluzione contenente EDTA, composto chelante che ha il compito di di disattivare la *DNAsi* tramite la sottrazione degli ioni magnesio Mg^+
- **Soluzione II**: contenente NaOH e SDS (Laurilsolfato di sodio). L'NaOH provoca la rottura delle cellule, la denaturazione e precipitazione delle molecole di DNA mentre SDS provoca la denaturazione delle proteine tramite la rottura dei legami intermolecolari tra cui legami a idrogeno e interazioni idrofobiche
- **Soluzione III**: contenente acetato di potassio ($CH_3COO^-K^+$), il quale riporta il lisato cellulare a pH che consente la rinaturazione del DNA plasmidico ma non di quello cromosomico a causa delle dimensioni maggiore
- **Soluzione fenolo:cloroformio**: miscela di fenolo saturo e cloroformio in rapporto 1:1. Essendo che è una soluzione molto volatile si aggiunge isoamilico, il quale crea una fase al disopra della soluzione riducendo la possibilità di evaporare.
- **Soluzione di etanolo** (100 e 70 % v\v)
- **Soluzione di TE**: contenete Tris ed EDTA

1.2 Protocollo

A Preparazione del campione

1. Prelevare 1,5 mL di coltura batterica sotto la cappa biologica (Figura 1 e 2).

2. Centrifuga per 30 secondi la cultura per far si che si creino due fasi: la fase liquida contenente il terreno di coltura (Figura 4), che verrà eliminata, e la fase solida, ovvero il pellet batterico, dove sono contenuti i nostri batteri (Figura 3)

B Depurazione del campione

1. Aggiungere 100 µL di Soluzione I al pellet batterico (Figura 5)

2. Mescolare la soluzione tramite il vortex

3. Aggiungere 200 µL di Soluzione II e mescolare capovolgendo la provetta 2 o 3 volte. In questa fase, la soluzione alcalina provoca la lisi delle cellule e la denaturazione e precipitazione del DNA batterico (Figura 6)

4. Aggiungere 150 µL di Soluzione III dopo 2 – 3 min dalla Soluzione II e mescolare capovolgendo la provetta 2 o 3 volte.

5. Centrifuga per 5 min in modo che i residui cellulari e il DNA cromosomico precipitino (Figura 7). Prelevare la frazione liquida e travasarla in una nuova provetta (Figura 8)

La soluzione ottenuta non contiene DNA plasmidico puro perché contaminato da proteine, oltre a essere stato molto diluito durante le fasi precedenti. Per la purificazione dalle proteine si esegue un trattamento con fenolo-cloroformio.

C Trattamento con fenolo-cloroformio

1. Aggiungere 1 volume (500 µL) di fenolo-cloroformio per estrarre le proteine (Figura 10).
2. Centrifuga la soluzione per 3 min, si creeranno due fasi: quella inferiore composta da fenolo-cloroformio e quella superiore con il DNA plasmidico
3. Recuperare la fase acquosa contenente il DNA plasmidico (Figura 11)
4. Aggiungere 2 volumi di etanolo 100 % (Figura 12)
5. Mettere la soluzione ottenuta in freezer a −20 °C per favorire la precipitazione del DNA e poi centrifugare per 5 min (Figura 13). Si ottiene un precipitato biancastro contenente il DNA plasmidico
6. Rimuovere la fase alcolica all'interno della cappa chimica (Figura 14)
7. Lavare il precipitato con etanolo 70 % per eliminare i sali presenti e centrifugare per 5 min
8. Rimuovere completamente l'etanolo prima con una micropipetta e poi facendo seccare all'aria per far evaporare eventuali residui

D Conservazione del DNA plasmidico

1. Per risospendere il DNA plasmidico, aggiungere 50 µL di TE pH 8 per evitare la degradazione del DNA da parte delle DNAsi (Figura 15)
2. Conservare la soluzione concentrata di DNA plasmidico a −20 °C

Figura 1:
Prelevamento della coltura batterica

Figura 2:
Coltura batterica

Figura 3:
Batteri Precipitati

Figura 4:
Batteri senza terreno

Figura 5:
Aggiunta Soluzione I

Figura 6:
Aggiunta soluzione II

Figura 7:
Centrifuga Soluzione III

Figura 8:
DNA e proteine di scarto

Figura 9:
DNA plasmidico in soluzione

Figura 10:
Aggiunta cloroformio

Figura 11:
Recupero fase superiore DNA

Figura 12:
Aggiunta di etanolo 100 %

Figura 13:
Centrifuga dopo aggiunta di etanolo 100 %

Figura 14:
Rimozione etanolo 100 %

Figura 15:
DNA plasmidico in soluzione di TE

2 Estrazione dell'RNA con TRIzol

2.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- Provetta Eppendorf
- Mortaio e pestello
- Propipette
- Vortex
- Freezer

Composti utilizzati

- **Foglie verdi**
- **Azoto liquido**: liquefazione dell'azoto gassoso a temperatura di $-196\,°C$. Lo utilizziamo per facilitare la rottura delle pareti cellulari vegetali
- **TRIzol**: Soluzione di fenolo e tiocianato di gauanidinio, che ha il compito di denaturare le cellule e dissolvere i componenti cellulari ma di mantenere integro il DNA
- **Cloroformio**
- **Isopropanolo**
- **Etanolo 70 %**
- **Acqua distillata**

2.2 Protocollo

1. La lisi di una cellula vegetale non può avvenire esclusivamente attraverso l'utilizzo di agenti chimici, a causa della presenza della parete cellulare. Triturare le foglie in un mortaio (lisi meccanica) versando azoto liquido fino a ottenere una polvere. La bassa temperatura impedisce agli enzimi di degradare il DNA.

2. Trasferire circa 100 mg di campione (1 – 2 spatole) all'interno di una provetta Eppendorf da 2 mL.

3. Sospendere i tessuti triturati in TRIzol (1 ml per 50 – 100 mg di tessuto) e vortexare per 10 sec.

4. Lasciar riposare il composto a temperatura ambiente per 5 min per assicurare la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici.

5. Aggiungere 0,2 mL di cloroformio per ml di TRIzol usati.

6. Vortexare per 15 sec e lasciar riposare per 15 min a temperatura ambiente.

7. Centrifuga per 15 min a 4 °C. La centrifugazione permette di ottenere 3 fasi:

   - una *fase organica* rosso scuro/marrone contenente proteine e lipidi
   - un'*interfase* contenente DNA genomico precipitato
   - una *fase acquosa* superiore contenente l'RNA

8. Separare la fase acquosa da quella organica nella cappa chimica.

9. Aggiungere 0,5 ml d'isopropanolo per mL di TRIzol usati e mescolare.
10. Lasciar riposare a in freezer a $-20\,°C$ per 20 min
11. Centrifugare per 10 min a 4 °C. L'RNA precipita.
12. Rimuovere la soluzione acquosa sotto la cappa chimica e aggiungere 1 ml di etanolo 70 % per mL di TRIzol usato.
13. Vortexare il campione e centrifugare per 5 min a 4 °C.
14. Svuotare la fase liquida e far asciugare all'aria per 10 min
15. Risospendere il composto 50 – 100 µL di acqua distillata.
16. Vortexare

Figura 16:
Foglie macinate

Figura 17:
Aggiunta di TRIzol

Figura 18:
Soluzione dopo vortex

Figura 19:
Aggiunta cloroformio

Figura 20:
Centrifugazione soluzione

Figura 21:
Recupero della fase acquosa

Figura 22:
Aggiunta del 2-propanolo

Figura 23:
RNA precipitato

Figura 24:
Aggiunta di etanolo 70 %

3 Restrizione DNA

3.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- Provetta Eppendorf
- Propipetta
- Vortex
- Centrifuga
- vaschetta di corsa

Composti utilizzati

- **Buffer 10X**
- **DNA**
- ***EcoR I***
- **Agarosio**
- **TAE 50X**
- **SyberSafe**
- **Sample Buffer**
- **DNA ladder**

3.2 Protocollo

A Preparazione della reazione di digestione

1. Preparare in due Eppendorf da 1,5 mL due campioni, i quali sono:
   - plasmide digerito
     - 11,5 µL di H_2O
     - 10 µL di DNA
     - 2,5 µL di buffer 10X
     - 1 µL di *EcoR I*
   - controllo negativo (senza enzima)
     - 12,5 µL di H_2O
     - 10 µL di DNA
     - 2,5 µL di buffer 10X

   I componenti vanno aggiunti in ordine decrescente di volume.
2. Vortexare e centrifugare le due soluzioni
3. Lasciare le soluzioni a digerire per 1 – 2 h a 37 °C

B Preparazione del gel di agarosio

1. Pesare con una beuta 0,6 g di agarosio sulla bilancia tecnica
2. In cilindro mettere 1,6 mL di TAE 50X e poi portare a volume di 80 mL con H_2O, versare il tutto nella beuta contenete agarosio

3. Riscaldare in microonde la soluzione preparata senza farla bollire
4. Aspettare qualche minuto che si raffreddi oppure velocizzare il processo mettendo la beuta sotto acqua corrente
5. Una volta raffreddata, aggiungere 3 µL di SyberSafe e mescolare
6. Versare la soluzione nella vaschetta (precedentemente preparata con lo scotch). Nel caso si formano delle bolle romperle
7. Aspettare che il gel si solidifichi, dopo di ciò rimuovere il pettinino

C Elettroforesi

1. Inserire la vaschetta nello strumento per la corsa elettroforetica e ricoprirla con 250 mL di buffer di corsa (TAE 1X)
2. Aggiungere ai campioni da inserire 5 µL di Sample Buffer
3. Inserire i campioni nei pozzetti, corrispondenti a:
   - 25 µL di DNA digerito
   - 25 µL di DNA non digerito
   - 25 µL di RNA totale
4. Nell'ultimo pozzetto, aggiungere 5 µL di DNA ladder
5. Impostare il voltaggio della corsa tra 90 – 100 V
6. Una volta finita la corsa, guardare il gel agli UV, per constatare se la digestione è avvenuta

Figura 25:
Soluzione DNA
senza enzima

Figura 26:
Soluzione DNA
con enzima

Figura 27:
Soluzione di agarosio
(prima del riscaldamento)

Figura 28:
Soluzione di agarosio
(dopo del riscaldamento)

Figura 29:
Aggiunta di SyberSafe

Figura 30:
Vaschetta piena

Figura 31:
Campioni inseriti nei
pozzetti -

A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA

Figura 32:
Strumento per
l'elettroferesi

Figura 33:
Piastra di agarosio –

A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA
D Marker

4 Reazione a catena della polimerasi – PCR

4.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Termociclatore:** strumento che viene utilizzatore per la PCR. È costituito da una griglia, dove vengano appoggiate le provette, che si scalda a temperature diverse a seconda della fase del ciclo di replicazione mentre il coperchio possiede una temperatura maggiore per evitare che la soluzione evapori. I cicli di riscaldamento, per il protocollo attuale, sono i seguenti:
  - **Denaturazione iniziale:** 3 min a 95 °C
  - **Amplificazione** per 35 cicli, ogni ciclo si divide in:
    - **Denaturazione**: 30 sec a 95 °C
    - **Ibridazione**: 30 sec a 55 °C
    - **Estensione**: 60 sec a 72 °C
  - **Estensione finale:** 5 min a 72 °C

Composti utilizzati

- **Buffer TAQ (10X):** buffer necessario per mantenere il pH stabile e per costituire l'ambiente adatto alla reazione
- **$MgCl_2$**: gli ioni magnesio Mg^{2+} sono il cofattore della TAQ polimerasi
- **Primer FOR**: denominato forward in quanto è complementare al filamento $3' \to 5'$
- **Primer REV**: denominato reverse in quanto è complementare al filamento $3' \to 5'$
- **dNTPs**: sono i nucleotidi che devono essere polimerizzati
- **DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000 basi**
- ***TAQ polimerasi***: denominata anche *DNA polimerasi termostabile* perché la sua temperatura ottimale è di 75 – 80 °C. Viene utilizzata nella PCR per questa sua caratteristica in quanto per far si che il DNA venga amplificato è necessaria una temperatura di 94 °C

4.2 Protocollo

A Preparazione ed esecuzione della PCR

1. In una Eppendorf da 250 µL aggiungere:
   - 12,5 µL di H_2O sterile
   - 2 µL di buffer TAQ (10X)
   - 1 µL di $MgCl_2$ 50 mM
   - 1 µL di primer FOR 25 mM
   - 1 µL di primer REV 25 mM
   - 1 µL di dNTPs 10 mM
   - 1 µL di DNA plasmidico

- 0,5 µL di TAQ polimerasi

In totale avremo una soluzione di 20 µL

2. Inserire la soluzione nel termociclatore e avviare la PCR
3. Una volta finiti tutti i cicli della PCR, tenere a 12 °C il campione fin quando non lo si recupera
4. Preparare il gel di agarosio (la preparazione del gel è descritta in 3.2.B)
5. Inserire il campione nel gel e far partire l'elettroferesi

Per verificare che la PCR sia venuta con successo, prima di tutto, far correre il campione sottoposto a PCR sul gel di agarosio e poi guardare agli UV il gel. Se la PCR è venuta sarà presente una banda unica altrimenti non si presenterà nessuna banda (Fig. 34.C). L'insuccesso della procedura può essere rimandata alla non aggiunta di una delle componenti della soluzione iniziale, durante la sua preparazione (Fig. 34.B).

A) Marker

B) PCR avvenuta con insuccesso

C) PCR avvenuta con successo

Figura 34:
Campioni sottoposti a PCR
su gel di agarosio visti agli UV

5 Preparazione di terreno LB solido

Figura 35

Figura 36

Figura 37

Figura 38

Figura 39

Figura 40