

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

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
2.3 Quantificazione del DNA e RNA mediante spettroscopia UV	6
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	9
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
5.1 Materiali e composti utilizzati	13
5.2 Protocollo	13
5.3 Preparazione del terreno LB solido	13
5.4 Preparazione delle cellule competenti	14

1 Minipreparazione 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 disattivare la *DNAse* 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 sì 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 μ L di Soluzione I al pellet batterico ([Figura 5](#))
2. Mescolare la soluzione tramite il vortex
3. Aggiungere 200 μ L 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 μ L 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 (800 µL) 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

1 MINIPREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO



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

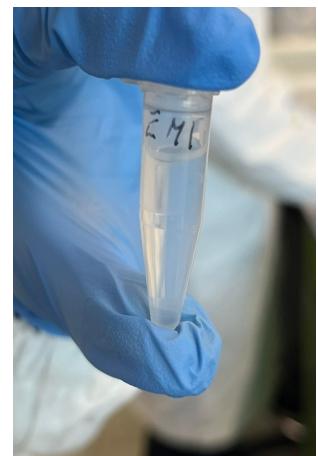


Figura 12:
Aggiunta di
etanolo 100 %



Figura 13:
Centrifuga dopo
aggiunta di etanolo 100 %

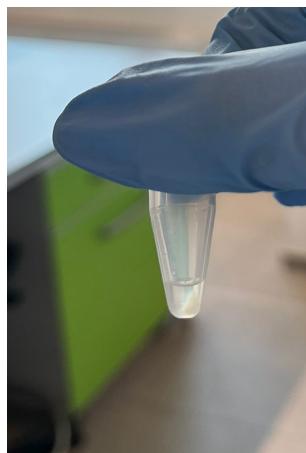


Figura 14:
Rimozione etanolo 100 %



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:** ha il compito di separare le componenti proteiche e il DNA dalla nostra soluzione
- **Isopropanolo:** ha il compito di far precipitare l'RNA
- **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. Centrifugare a 12 000 g per 15 min a 4°C . La centrifugazione permette di ottenere 3 fasi:
 - una *fase organica* di colore 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 sotto cappa chimica, trasferendola in una nuova provetta.
9. Aggiungere 0,5 ml di isopropanolo per mL di TRIZOL usati e mescolare.
10. Lasciar riposare a in freezer a -20°C per 20 min
11. Centrifugare 12 000 g per 10 min a 4°C . Dopo la centrifugazione l'RNA sarà presente come corpo di fondo.
12. Rimuovere la fase acquosa sotto 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 in 50 – 100 μL di acqua distillata e vortexare

Ora la soluzione ottenuta si può conservare per usi futuri.

2.3 Quantificazione del DNA e RNA mediante spettroscopia UV

Si misurerà la concentrazione del pUC18 ([sezione 1](#))

1. Depositare una goccia (2 μL) 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 μL) 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})

Congelare l'RNA non diluito e il plasmide pUC18.



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:** garantisce le condizioni di reazione ottimali per gli enzimi di restrizione
- **DNA**
- ***EcoR I*:** enzima di restrizione
- **DNA ladder:** miscela di frammenti di DNA di varie dimensioni note che, separandosi durante la corsa elettroforetica, creano una scala di valutazione per il dimensionamento approssimativo gli amplificati.
- **Agarosio:** componente base per i gel di corsa
- **TAE 50X:** tampone che viene utilizzato sia per la polimerizzazione dell'agarosio sia per il tampone di corsa. È composto da Trisacetato ed EDTA. Quest'ultimo è un chelante che sequenza ioni Mg^{2+} presenti in soluzione per inibire l'attività degli enzimi DNAsi
- **SyberSafe:** è un colorante altamente sensibile per la visualizzazione del DNA in gel di agarosio o acrilammide. È stato formulato per essere un'alternativa meno pericolosa al bromuro di etidio che può utilizzare la luce blu o l'eccitazione UV.
- **Sample Buffer:** colorante per osservare la corsa dei campioni sul gel di agarosio

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 ([Figura 26](#))
 - 11,5 μ L di H_2O
 - 10 μ L di DNA
 - 2,5 μ L di buffer 10X
 - 1 μ L di *EcoR I*
- controllo negativo – senza enzima ([Figura 25](#))
 - 12,5 μ L di H_2O
 - 10 μ L di DNA
 - 2,5 μ L 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 aggiungere acqua distillata fino a raggiungere il volume di 80 mL. Infine versare il tutto nella beuta contenete agarosio ([Figura 27](#))
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 ([Figura 28](#))
5. Una volta raffreddata, aggiungere 3 µL di SyberSafe e mescolare ([Figura 29](#))
6. Versare la soluzione nella vaschetta (precedentemente preparata con lo scotch) e nel caso si formano delle bolle romperle ([Figura 30](#))
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 ([Figura 32](#)) e ricoprirla con 250 mL di buffer di corsa
2. Aggiungere ai campioni da inserire 5 µL di Sample Buffer
3. Inserire i campioni nei pozzetti ([punto 33](#)), 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, il nostro marker
5. Impostare il voltaggio della corsa tra 90–100 V e lanciare la corsa elettroforetica
6. Una volta finita la corsa, guardare il gel agli UV, per constatare se la digestione è avvenuta

3 RESTRIZIONE DNA

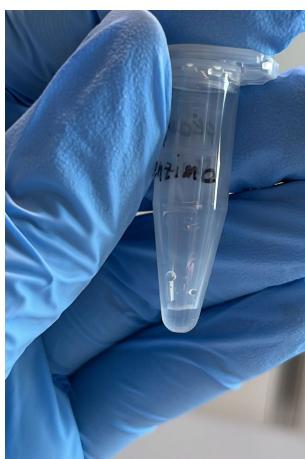


Figura 25:
Soluzione DNA
senza enzima



Figura 26:
Soluzione DNA
con enzima



Figura 27:
Soluzione di agarosio
(prima del riscaldamento)

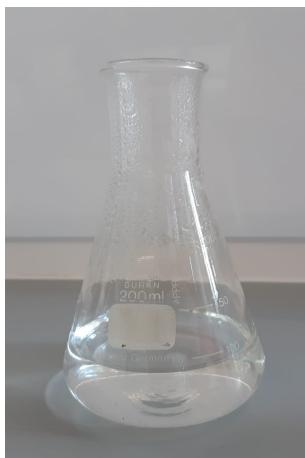


Figura 28:
Soluzione di agarosio
(dopo del riscaldamento)

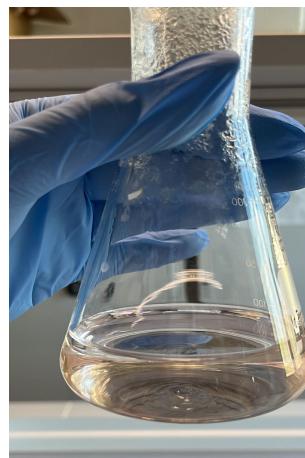


Figura 29:
Aggiunta di SyberSafe



Figura 30:
Vaschetta piena

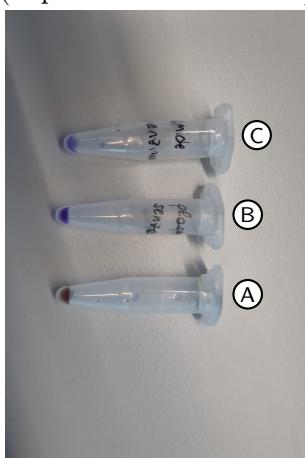


Figura 31:
Campioni inseriti nei
pozzetti -
A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA

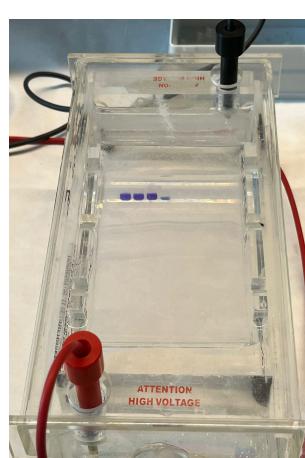


Figura 32:
Strumento per
l'elettrofesi

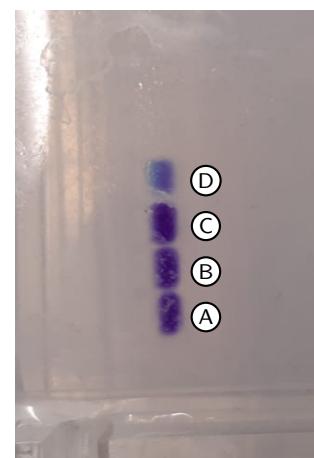


Figura 33:
Piastra di agarosio –
A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA
D Marker

4 Reazione a catena della polimerasi – PCR

4.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Termociclato:** strumento che viene utilizzato per la PCR. È costituito da una griglia, dove vengono 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 evapi. 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
- **MgCl₂:** gli ioni magnesio Mg²⁺ sono il cofattore della TAQ polimerasi
- **Primer FOR:** denominato forward in quanto è complementare al filamento 3' → 5'
- **Primer REV:** denominato reverse in quanto è complementare al filamento 3' → 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 sì 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:

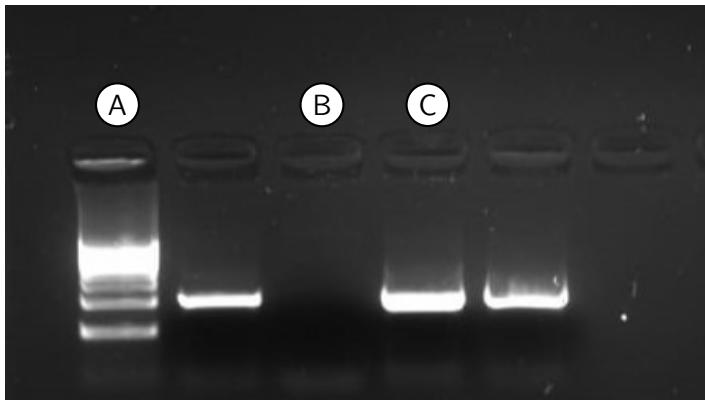
- 12,5 µL di H₂O sterile
- 2 µL di buffer TAQ (10X)
- 1 µL di MgCl₂ 50 mM
- 1 µL di primer FOR 25 mM
- 1 µL di primer REV 25 mM
- 1 µL di dNTPs 10 mM
- 1 µL di DNA plasmidico

- 0,5 µL di TAQ polimerasi

In totale avremo una soluzione di 20 µL

2. Inserire la soluzione nel termociclato 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 con successo sarà presente una banda unica ([Fig. 34.C](#)) altrimenti non si presenterà nessuna banda. 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

5.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Autoclave:** è un dispositivo utilizzato per svolgere il processo di sterilizzazione delle attrezzature (Figura 36), mediante vapore saturo a 121 °C a 1 bar, per una durata che varia a seconda della dimensione del carico e del suo contenuto.

La temperatura a cui opera è stata scelta per eliminare la maggior parte dei microorganismi comuni. Il tempo di attesa eccede i 20 min a causa delle fasi di riscaldamento e raffreddamento dell'autoclave.

Composti utilizzati

-

5.2 Protocollo

5.3 Preparazione del terreno LB solido

1. Inserire nella bottiglia:

- 0,5 g di triptone
- 0,25 g di estratto di lievito
- 0,25 g di NaCl
- 0,75 g di agar batteriologico
- 50 mL di acqua distillata

NOTA

Sulla bottiglia attaccare un pezzo di nastro adesivo da autoclave. Questo tipo di nastro ti indica se la sterilizzazione è avvenuta o meno a seconda se si è colorato di nero.

2. Sterilizzare la bottiglia in autoclave a 120 °C per 20 min.

ATTENZIONE: Il tappo della bottiglia deve essere allentato per evitare che esploda.

3. Aspettare che la soluzione si raffreddi.

4. Dividere la soluzione autoclavata in due da 25 mL (una in una falcon sterile) per la preparazione delle piastre:

- A) Piastra con kanamicina (KAN) e cloramfenicolo (CAF)

1. Aggiungere 25 µL di CAF 1000X .
2. Aggiungere 25 µL di KAN 1000X.
3. Mescolare bene.
4. Versare in una piastra petri.

- B) Piastra con ampicillina (AMP), IPTG, X-gal. L'IPTG induce l'espressione della β -galattosidasi, mentre l'X-gal si colora di blu in presenza di questo enzima.
1. Aggiungere 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di ampicillina 1000X (25 μL).
 2. Aggiungere 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di X-gal (25 μL).
 3. Aggiungere 0,5 mM IPTG (25 μL).
 4. Mescolare
 5. Versare il terreno in una piastra
5. Lasciare le due piastre semiaperte sotto la cappa biologica fino a quando l'agar non si sarà solidificato.
 6. Chiuderle e conservarle a 4 °C.

5.4 Preparazione delle cellule competenti

1. Sotto cappa biologica, prelevare con pipette sierologiche:
 - 5 mL di una coltura di cellule DH5 α
 - 5 mL di BL21 (OD₆₀₀ tra 0,3–0,4)trasferire in 2 provette Falcon sterili da 50 mL
2. Centrifugare 5 min a 3000 g a 4 °C
3. Eliminare il surnatante
4. Risospendere le cellule in 0,8 mL di buffer 1.
5. Trasferire sotto cappa le due soluzioni in eppendorf da 2 mL.
6. Incubare in ghiaccio 15 min.
7. Centrifugare 5 min a 3000 g a 4 °C
8. Eliminare sotto cappa il surnatante.
9. Risospendere le cellule in 0,4 mL di buffer 2.
10. Congelare in azoto liquido.
11. Conservare a –80 °C.

Le cellule competenti sono trattate con CaCl₂ che altera la parete cellulare dei batteri rendendola attrattiva per il DNA.



Figura 35



Figura 36:
Termociclatore



Figura 37

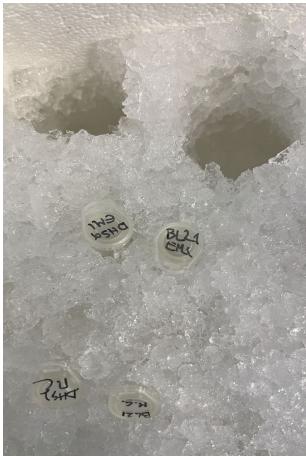


Figura 38



Figura 39



Figura 40