

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Informatica
Corso di laurea in Bioinformatica

Relazioni di Laboratorio di Biologia Molecolare

Docenti

Stefano Capaldi
Matteo Ballottari
Nico Betterle ♥

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 spettrofotoscopia 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	14
A Preparazione del terreno LB solido	14
B Preparazione delle cellule competenti	14
6 Trasformazione delle cellule di <i>E. coli</i> DH5α e BL21	16
6.1 Materiali e composti utilizzati	16
6.2 Protocollo	16
7 PCR su colonia – Colony PCR	18
7.1 Materiali e composti utilizzati	18
7.2 Protocollo	18
8 Preparazione dei componenti per la procedura 9	20
8.1 Materiali e composti utilizzati	20
8.2 Protocollo	20
A Sterilizzazione delle beute da 500 mL	21
B Preparazione del terreno LB	21
C Preparazione del tampone dei lisi batterica	21
D Preparazione del tampone Triton	22
E Preparazione del preinoculo BL21–LHCSR	22

9 Espressione eterologa di proteine e loro purificazione	24
9.1 Materiali e composti utilizzati	24
9.2 Protocollo	24
A Purificazione LHC	24
9.3 Purificazione GFP	25
10 Elettroforesi SDS – Page denaturante	28

1 Minipreparazione del DNA plasmidico

1.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Provetta Eppendorf:** si intende una provetta monouso, generalmente in plastica, da centrifuga della dimensione variabile dai 250 µL ai 2,0 mL.
- **Micropipette:** strumento utilizzato per trasferire piccole o piccolissime quantità di liquidi, nell'ordine dei microlitri (µL). Normalmente vengono utilizzate micropipette che consentono il prelievo di 1,000–100 µL, 100–10 µL e 10–1 µL. Sono composte da un blocco principale e dai puntali. Le micropipette funzionano con puntali monouso in materiale plastico.
- **Vortex:** è un dispositivo comunemente utilizzato nei laboratori di bioscienze (chimica, biochimica, microbiologia) atto a miscelare liquidi in piccole fiale o provette.
- **Centrifuga:** è un'apparecchiatura impiegata per accelerare la separazione tra corpi aventi differente densità mediante l'uso della forza centrifuga
- **Freezer:** dispositivo che serve per tenere i campioni a una temperatura minore di 0 °C

Composti utilizzati

- **Cultura 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 (CH₃COO⁻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.
- **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 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 (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

1 MINIPREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO



Figura 10:
Aggiunta cloroformio



Figura 11:
Recupero fase
superiore DNA

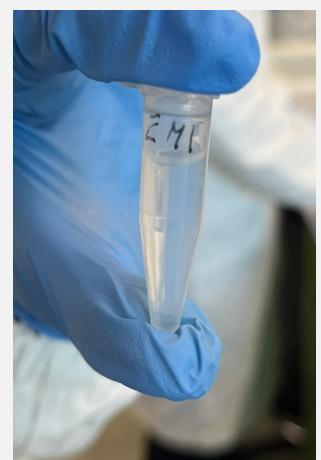


Figura 12:
Aggiunta di
etanolo 100 %



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

- **Mortaio e pestello:** un utensile utilizzato per pestare, ridurre in polvere e mescolare sostanze solide

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 % v/v**
- **Acqua distillata**

2.2 Protocollo

1. Triturare le foglie in un mortaio (*lisi meccanica*) versando azoto liquido fino a ottenere una polvere.

NOTE

La lisi di una cellula vegetale non può avvenire esclusivamente attraverso l'utilizzo di agenti chimici, a causa della presenza della parete cellulare.

Inoltre, 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 usato 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 spettrofotoscopia UV

INFORMAZIONE

Generalmente quando si vuole quantificare una sostanza e si decide di utilizzare lo spettrofotometro, si inserisce la sostanza in una cuvetta. Una cuvetta è un recipiente a forma rettangolare con il lato corto di 1 cm e realizzata da diversi materiali a seconda della lunghezza d'onda di esercizio. Se lavoriamo nel range degli UV, le cuvette sono di quarzo.

Una cuvetta può contenere diversi millilitri di campione. Nel nostro caso, per eseguire l'analisi, dovremmo diluire il nostro campione in un solvente ed eseguire l'analisi. Però avendo delle quantità molto piccole questo fa sì che la diluizione provochi dei risultati non corretti.

Per questo motivo sono stati inventati degli spettrofotometri che lavorano con quantità nell'ordine dei microlitri. Questo è il caso dei nanodrop, lo strumento che abbiamo utilizzato per la quantificazione.

Si misurerà la concentrazione del pUC18 (soluzione preparata nella [sezione 1](#)) e dell'RNA:

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

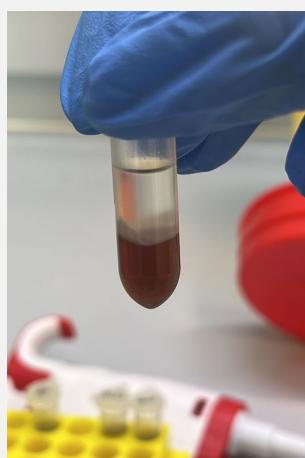


Figura 20:
Centrifugazione
soluzione



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

- **Vaschetta di corsa:** è un contenitore dove viene posizionato il gel di agarosio contenente i campioni ricoperto dal buffer di corsa. Possiede due elettrodi, uno positivo e uno negativo, alle estremità della vaschetta, i quali durante l'elettroforesi verranno collegati a un generatore. Questo permette la creazione del campo elettrico utile per la migrazione delle molecole.

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

NOTE

I componenti vanno aggiunti in ordine decrescente di volume per minimizzare le perdite e migliorare la miscelazione dei componenti della soluzione.

2. Vortexare e centrifugare entrambe le 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



Figura 25:
Soluzione DNA senza
enzima



Figura 26:
Soluzione DNA con
enzima



Figura 27:
Soluzione di agarosio
(prima del riscaldamento)

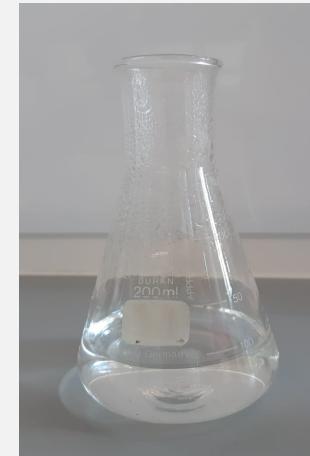


Figura 28:
Soluzione di agarosio
(dopo del riscaldamento)



Figura 29:
Aggiunta di SyberSafe



Figura 30:
Vaschetta piena

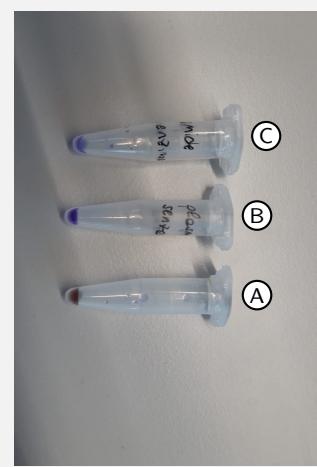


Figura 31:
Campioni inseriti nei
pozzetti –
A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA

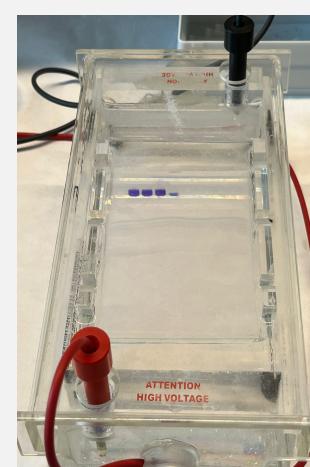


Figura 32:
Strumento per
l'elettrofesi

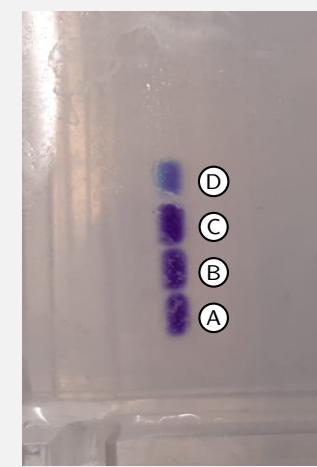


Figura 33:
Piastra di agarosio –
A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA
D Marker

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'eletroferesi

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](#)).

La banda **A** indica il marker, il quale contiene diversi pezzi di DNA a lunghezze diverse note. Questo ci permette di determinare a vista d'occhio la lunghezza del DNA dei campioni.

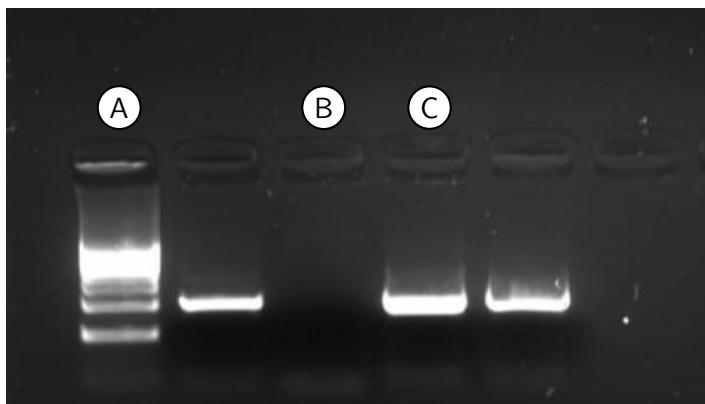


Figura 34:
Campioni sottoposti a PCR
su gel di agarosio visti agli UV

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

- **Triptone:** fornisce amminoacidi essenziali come peptidi e peptoni ai batteri in crescita
- **Estratto di lievito:** fornisce una sovrabbondanza di composti organici utili per la crescita batterica
- **Cloruro di sodio (NaCl):** fornisce ioni sodio utili per l'equilibrio osmotico e per il trasporto
- **Kanamicina (KAN):** antibiotico aminoglicosidico che uccide i batteri impedendo loro di sintetizzare le proteine di cui hanno bisogno per vivere
- **Cloramfenicolo (CAF):** antibiotico ad azione batteriostatica inibendo la sintesi proteica
- **Ampicillina (AMP):** antibiotico della famiglia delle penicilline. Uccide i batteri interferendo con la formazione della loro parete e provocandone la rottura
- **IPTG¹:** analogo chimico del galattosio che non può essere idrolizzato dall'enzima β -galattosidasi. È un induttore di attività dell'*E.Coli lac operon* che agisce legando e inibendo il represso *Lac*.
- **X-gal²:** è utilizzato per indicare quando una cellula esprime l'enzima β -galattosidasi. L'X-gal viene scisso dalla β -galattosidasi producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo. Quest'ultimo viene ossidato in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un composto blu insolubile.
- **Cellule DH5α:** sono cellule ingegnerizzate di *E. coli*. Sono caratterizzate da tre mutazioni: *recA1*, *endA1* che favoriscono l'inserimento del plasmide e *lacZΔM15* che consente lo screening del bianco blu. Le cellule sono competenti e spesso vengono utilizzate per la trasformazione con cloruro di calcio per inserire il plasmide desiderato.
- **Cellule BL21:** sono una linea cellulare batterica comunemente utilizzata in biologia molecolare e ingegneria genetica. Sviluppata per esprimere proteine ricombinanti in modo efficiente. Presenta una mutazione nel gene che codifica per la proteina *endonucleasi di restrizione I*. Esistono delle varianti come BL21(DE3), che esprimono anche la proteina T7 RNA polimerasi sotto il controllo di un promotore inducibile. Questa caratteristica permette l'espressione controllata del gene d'interesse mediante l'aggiunta di IPTG, un induttore del promotore T7.

¹Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside

²bromo-cloro-indolil-galattopiranoside

5.2 Protocollo

A 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

NOTE

Sulla bottiglia attaccare un pezzo di nastro adesivo da autoclave. Questo tipo di nastro si colora di nero se la sterilizzazione è avvenuta con successo.

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. Prelevare 25 mL della soluzione autoclavata e inserirli 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 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 µg/mL di AMP 1000X (25 µL).
2. Aggiungere 80 µg/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.

B Preparazione delle cellule competenti

1. Sotto cappa biologica, prelevare con pipette sierologiche:

- 5 mL di una coltura di cellule DH5α
- 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 e poi eliminare il surnatante
3. Risospendere le cellule in 0,8 mL di buffer 1.
4. Trasferire sotto cappa le due soluzioni in Eppendorf da 2 mL.
5. Incubare in ghiaccio per 15 min.
6. Centrifugare 5 min a 3000 g a 4 °C e poi eliminare sotto cappa il surnatante.
7. Risospendere le cellule in 0,4 mL di buffer 2.
8. Congelare in azoto liquido.
9. 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:
Bottiglia contenente il
terreno LB



Figura 36:
Termociclatore

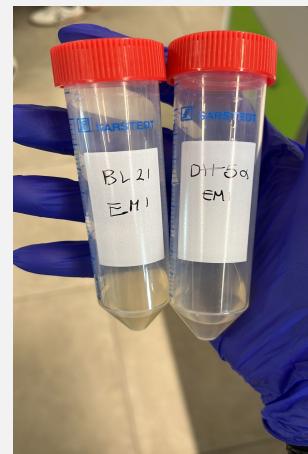


Figura 37:
Provette contenenti
cellule DH5α e BL21



Figura 38:
Cellule con buffer I nel
ghiaccio



Figura 39:
Cellule DH5α con
buffer 2



Figura 40:
Cellule BL21 con
buffer 2

6 Trasformazione delle cellule di *E. coli* DH5 α e BL21

6.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Incubatore:** è una camera riscaldata, isolata, utilizzata per coltivare e mantenere colture microbiologiche o cellulari. Mantiene la temperatura a livelli stabili e generalmente la temperatura ideale di funzionamento è fissata a 37°C. La superficie del macchinario sulla quale si appoggiano le provette continua a muoversi per tutta la durata del processo per evitare che le colture si depositino.

Composti utilizzati

- **Soluzione pUC18-mix:** è un vettore di clonaggio ampiamente utilizzato per la clonazione di frammenti di DNA. Contiene una serie di elementi funzionali importanti, come:
 - un'origine di replicazione che permette alla cellula ospite di replicare il plasmide
 - un gene di resistenza agli antibiotici, come l'ampicillina. Questo gene di resistenza viene utilizzato per la selezione delle cellule batteriche che hanno incorporato con successo il plasmide durante il processo di clonaggio.
- **Soluzione LHCSR:** Si tratta di una famiglia di proteine coinvolte nella fotosintesi delle alghe e delle piante. Fanno parte del complesso antenna fotosintetico e svolgono un ruolo chiave nell'adattamento delle piante agli ambienti luminosi ad alta intensità, proteggendo il sistema fotosintetico dallo stress ossidativo.

6.2 Protocollo

1. Sotto la cappa biologica, prelevare 100 μ L di ciascun tipo di cellule competenti, preparate nell'[sezione 5](#), e inserirli in 2 Eppendorf.
2. Aggiungere 1 μ L di plasmide a entrambe le soluzioni:
 - pUC18-mix per le cellule DH5 α
 - LHCSR per le cellule BL21
3. Mescolare agitando e tenere in ghiaccio per 20 – 30 min
4. Effettuare lo shock termico immersendo la provetta nel bagno termostatato a 42 °C per 1 minuto e poi raffreddare velocemente in ghiaccio per 5 minuti.

SHOCK TERMICO

Lo *shock termico* è necessario per permettere il passaggio del plasmide all'interno delle cellule batteriche: il cambiamento repentino della temperatura apre dei pori all'interno della membrana cellulare.

5. Aggiungere 200 μ L di terreno LB liquido.

NOTE

Il terreno utilizzato contiene un antibiotico, che permette la crescita solo delle cellule che contengono il plasmide, e di conseguenza, le cellule che non contengono il plasmide, muoiono.

Il plasmide introdotto nelle cellule permetterà di esprimere la resistenza all'antibiotico.

6. Incubare a 37 °C per circa un'ora.

NOTE

Il batterio per esprimere la resistenza ha bisogno di tempo e per questo viene effettuata questa operazione.

7. Piastrare sotto cappa biologica:

- 100 μ L di cellule DH5 α sulla piastra di LB contenente ampicillina (AMP), X-gal e IPTG.
- 150 μ L di cellule BL21 sulla piastra di LB contenente KAN e CAF.

8. Utilizzare spatoline sterili per omogenizzare lo strato di cellule batteriche sopra la piastra. Tenere la piastra semiaperta in modo da velocizzare l'assorbimento da parte del gel.

9. Lasciare a 37 °C per tutta la notte o a temperatura ambiente per tutto il weekend.



Figura 41:
Cellule DH5 α e BL21
con aggiunta di
plasmidi



Figura 42:
Aggiunta di terreno
LB liquido



Figura 43:
Piastra con la coltura
batterica

7 PCR su colonia – Colony PCR

7.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Termociclatore:** descritto [sezione 4.1](#). In questo caso il programma utilizzato è il seguente:
 - **Denaturazione iniziale:** 3 min a 95 °C
 - **Amplificazione** per 28 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:** 1 min a 72 °C

Composti utilizzati

- **PCR mix:** è una miscela per PCR ottimizzata e pronta all'uso contenente la *TAQ polimerasi*, il buffer per PCR, MgCl₂ e dNTPs. La Mix contiene tutti i componenti per la PCR, a eccezione dei primers e del DNA stampo.

7.2 Protocollo

NOTE

Durante l'esperienza sono state utilizzare e piastre preparate nell'[esperienza 6](#), le quali presenteranno colonie blu e colonie bianche.

Le colonie si presentano di due colorazioni diverse a seconda della presenza dell'inserito o meno nella cellula. L'inserito impedisce la trascrizione della β-galattosidasi, la quale non metabolizzando l'X-gal non produce il 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo che è il responsabile della colorazione blu delle cellule.

Procedura operativa:

1. Prendere due provette da PCR e inserire 20 µL di acqua sterile in ognuna
2. Con la punta di una pipetta toccare una colonia bianca e dissolverla nella provetta contenente acqua. Ripetere la stessa operazione per la colonia blu.
3. Prendere due nuove provette da PCR e inserirci 15 µL di PCR mix (verde) in ciascuna
4. Aggiungere 5 µL di ciascuna colonia al PCR mix
5. Mescolare vortexando le due soluzioni
6. Inserire le provette nel termociclatore e far partire la PCR
7. Una volta finita la PCR, inserire i campioni sul gel di corsa (precedentemente preparato come descritto in [3.2.B](#))
8. Alla fine, vedere il gel allo spettrofotometro UV

I risultati attesi prevedono la presenza di due bande:

- Una molto sottile e bassa (poche basi) che rappresenta il plasmide vuoto delle colonie blu.
- Una più spessa e alta (tante basi perché l'inserto è grande) che rappresenta il plasmide con l'inserto delle colonie bianche.

8 Preparazione dei componenti per la procedura 9

8.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- **Beuta da 500 mL**
- **Ansa:** è uno strumento utilizzato per prelevare e inoculare piccole quantità di microbi o colture microbiche.
- **Tubi da batteriologia:** contenitori utilizzati per la coltura e la crescita di microrganismi. Sono realizzati in vetro o plastica resistente agli agenti chimici e autoclavabili per garantire la sterilità.

Composti utilizzati

- **Triptone:** Descritto a pagina [13](#)
- **Estratto di lievito:** Descritto a pagina [13](#)
- **Cloruro di sodio (NaCl):** Descritto a pagina [13](#)
- **Saccarosio:** ha una funzione di stabilizzazione per le proteine.
- **Tris³ (pH 8):** utilizzato per preparare soluzioni tampone a diversi valori di pH, fornendo una condizione stabile per reazioni enzimatiche, colture cellulari, elettroforesi su gel e altre applicazioni che richiedono un controllo rigoroso del pH
- **EDTA⁴:** è un agente chelante, il che significa che forma complessi stabili con ioni metallici, in particolare con ioni di metalli bivalenti
- **Triton X-100:** Il Triton è un detergente che va a legare i lipidi.
- **β-mercaptopetanolo** è un agente riduttore capace di rompere di ponti disolfuro delle cisteine.
- **Tris-HCl⁵ (pH 7.5):** è un tampone chimico ampiamente utilizzato in laboratori scientifici per regolare e mantenere il pH delle soluzioni. È composto da due componenti principali: il Tris e l'acido cloridrico (HCl)
- **Ampicillina:** Descritta a pagina [13](#).

8.2 Protocollo

Le seguenti operazioni servono come preparazione alla procedura [9](#).

³tris-idrossimetil aminometano

⁴acido etilendiamminotetraacetico

⁵tris-idrossimetil aminometano cloridrato

A Sterilizzazione delle beute da 500 mL

La coltura di *Escherichia coli* verrà fatta crescere in una beuta di Pirex. Per essere sicuri che crescerà solo l'*Escherichia coli* bisogna sterilizzare la beuta nel seguente modo:

1. Tagliare un foglio di alluminio di grandezza sufficiente a coprire l'apertura della beuta.
2. Prendere una beuta di vetro Pirex da 500 mL e coprirla l'apertura con l'alluminio.
3. Attaccare al foglio di alluminio un pezzo di scotch da autoclave
4. Sterilizzare la beuta in autoclave a 120 °C per 20 min

B Preparazione del terreno LB

1. Pesare 10 g di triptone in una vaschetta da laboratorio e versarlo in un becher.
2. Pesare 5 g di estratto di lievito in una vaschetta da laboratorio e versarlo nel becher.
3. Pesare 5 g di cloruro di sodio in una vaschetta da laboratorio e versarlo nel becher.
4. Aggiungere 0,9 L di acqua distillata e mescolare fino alla solubilizzazione delle polveri.
5. Versare la soluzione in un cilindro e aggiungere acqua distillata fino a 1 L di volume.
6. Trasferire in una bottiglia e chiuderla.
7. Mettere la bottiglia in autoclave a 120 °C per 20 min

Il terreno risultante non dovrà presentare un aspetto torbido.

C Preparazione del tampone dei lisi batterica

Preparazione di 25 mL di tampone di lisi avente composizione:

- 50 mM di Tris a pH 8
- 25 % m/V di saccarosio
- 1 mM di EDTA

Procedimento

1. Calcolare la massa da pesare del saccarosio tramite la proporzione $25 : 100 = x : 25$, ottenendo 6,25 g da pesare, i quali vengono inseriti in un tubo Falcon da 50 mL.
2. Aggiungere acqua distillata fino a raggiungere i 3/4 dei 25 mL del volume finale.
3. Chiudere la Falcon e agitare fino allo scioglimento del saccarosio.
4. Calcolare il volume da prelevare di Tris ed EDTA, usando la formula di diluizione $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$:
 - Tris da stock 1 M si ottiene 1,25 mL
 - EDTA da stock 0,5 M si ottiene 50 µL

D Preparazione del tampone Triton

Preparazione di 25 mL di tampone Triton avente composizione:

- 0,5% m/V di Triton X-100
- 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 1 mM di β -mercaptoetanolo

Procedimento

1. Calcolare la massa da pesare di Triton tramite la proposizione $25 : 100 = x : 0,5$, ottenendo 0,125 g, i quali vengono inseriti in un tubo Falcon da 50 mL usando una pipetta monouso che ha un collo più grande a causa della viscosità del liquido
2. Aggiungere acqua distillata fino a raggiungere i 3/4 dei 25 mL di volume finale.
3. Calcolare il volume da prelevare di β -mercaptoetanolo e di Tris-HCl, usando la formula di diluizione $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$:
 - β -mercaptoetanolo da stock 1 mM si ottiene 2,5 μ L
 - Tris-HCl da stock 1 mM si ottiene 0,5 mL
4. Aggiungere acqua distillata fino a raggiungere 25 mL di volume.

Il tampone Triton viene utilizzato per pulire i corpi di inclusione.

E Preparazione del preinoculo BL21 – LHCSR

ATTENZIONE

Durante la preparazione del preinoculo, lavorare sempre sotto cappa biologica e tutto il materiale utilizzato deve essere sterile per non inquinare la preparazione

1. Trasferire 3 mL di terreno LB sterile in una provetta da preinoculo.
2. Aggiungere 3 μ L di ampicillina 1000X.

NOTE

L'aggiunta di ampicillina serve per non far rilasciare il plasmide inserito dai batteri perché rende necessaria l'espressione dei geni del plasmide per la resistenza all'antibiotico.

3. Prelevare una singola colonna dalla piastra con un'ansa sterile e trasferirla nel terreno liquido.
4. Incubare in agitazione a 37°C.

NOTE

L'agitazione dell'incubazione serve per l'ossigenazione del terreno che favorisce la crescita batterica. Questo è permesso dai tubi da batteriologia che hanno due step di chiusura della provetta. Il primo step permette l'areazione della provetta mentre il secondo step chiude la provetta completamente.

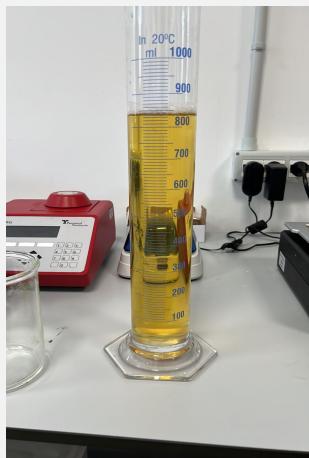


Figura 44:
Soluzione di terreno
LB



Figura 45:
Tampone Triton e di
lisi batterica



Figura 46:
Preinoculo
BL21 - LHCSR

9 Espressione eterologa di proteine e loro purificazione

9.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

Composti utilizzati

- **Tampone di Lisi:**
 - 50 mM Tris pH 8
 - 25 % saccarosio
 - 1 mM EDTA
- **Tampone Detergente:**
 - 200 mM NaCl
 - 1 % acido deossicolico
 - 1 % NONIDET P-40
 - 20 mM Tris pH 7,5
 - 2 mM EDTA
 - 10 mM β -mercaptoetanolo
- **Tampone Triton:**
 - 0,5 % m/V di Triton X-100
 - 20 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 1 mM di β -mercaptoetanolo
- **Tampone di Ricostituzione:**
 - 50 mM HEPES⁶ pH 8,
 - 12,5 % saccarosio,
 - 2 % LDS⁷,
 - 5 mM acido 6-aminocaproico
 - 1 mM benzamidina

9.2 Protocollo

A Purificazione LHC

1. Pesare una provetta Falcon da 150 mL e annotare il peso.

NOTE

Noi abbiamo preparato tre provette Falcon da 50 mL e le abbiamo usate come soluzioni a parte fino al punto 5, dove prima di aggiungere il lisozima le abbiamo unite tutte in una.

2. Prelevare 50 mL di coltura batterica e inserirli nella Falcon.
3. Centrifugare a 4350 g per 5 min
4. Eliminare il surnatante e ripesare la provetta contenente il pellet.
5. Il pellet pesato viene risospeso in 0,8 mL/g di tampone di lisi preparato precedentemente.
6. Aggiungere una spatola di lisozima e Lasciare a temperatura ambiente per 20–25 min

INFORMAZIONE

La quantità di lisozima aggiunta aumenta la velocità di esecuzione.

⁶acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]etansolfonico

⁷dodecil sulfato di litio

- Aggiungere 10 µL di *DNAsi* e 10 mM MgCl₂

Abbiamo calcolato la quantità di prelievo di MgCl₂ tramite la formula di diluizione:

$$\begin{aligned} V_i \cdot C_i &= V_f \cdot V_i \\ x \cdot 1 \text{ M} &= 0,56 \text{ mL} \cdot 0,01 \text{ M} \\ \text{MgCl}_2 &\rightarrow \frac{0,56 \text{ mL} \cdot 0,01 \text{ M}}{1 \text{ M}} = 5,6 \mu\text{L} \end{aligned}$$

- Incubare per 10 min a temperatura ambiente.
- Aggiungere 1 mL/g di tampone detergente (0,7 mL).
- Centrifugare per 10 min a 12 000 g in modo da precipitare i corpi di inclusione.
- Lavare il pellet con tampone Triton: 1 mL/g.

NOTE

Il lavaggio viene effettuato per rimuovere i contaminanti batterici e isolare i corpi di inclusione.

- Centrifugare per 10 min a 12 000 g in modo da precipitare i corpi di inclusione.
- Lavare i corpi di inclusione in 500 µL di H₂O per togliere eventuali residui di Triton.
- Centrifugare per 10 minuti a 12 000 g in modo da precipitare i corpi di inclusione.
- Solubilizzare i corpi di inclusione nel tampone di ricostituzione. Al fine di evitare la formazione di schiuma, risospendere il pellet in 200 µL di acqua e aggiungere 200 µL di tampone di ricostituzione 2x. Il tampone di ricostituzione contiene un detergente talmente forte da scogliere i corpi di inclusione.

9.3 Purificazione GFP

- Pesare un tubo Falcon da 50 mL e annotare il peso.
- Prelevare 50 mL di coltura batterica e inserirli nella Falcon.
- Centrifugare a 4350 g per 5 min
- Recuperare il terreno e ripesare la provetta.
- Il pellet pesato viene risospeso in 0,8 mL/g di tampone di lisi.
- Aggiungere una spatola di lisozima (stock 50 mg/mL).
- Far riposare in ghiaccio per 20 s.
- Aggiungere 10 µL di *DNAsi* (stock 20 mg/mL). Questo enzima viene utilizzato per degradare il DNA.

9. Aggiungere 10 mM MgCl₂ (stock 1 M). È il cofattore della *DNasi* che ne permette il funzionamento.
10. Incubare per 10 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugare per 10 min a 12 000 g.
12. Recuperare il surnatante.

	Tara Falcon	Coltura	Pellet	Tampone di Lisi
LHC	12.7675 g	13.0227 g	0.2552 g	0.20416 mL
	12.5282 g	12.7336 g	0.2054 g	0.16432 mL
	12.5312 g	12.7628 g	0.2316 g	0.18528 mL
GFP	12.69 g	12.9907 g	0.3007 g	0.24056 mL

Tabella 1: Dati sperimentali



Figura 47:
Soluzioni di LHC e
GFP



Figura 48:
Pellet LHC e GFP

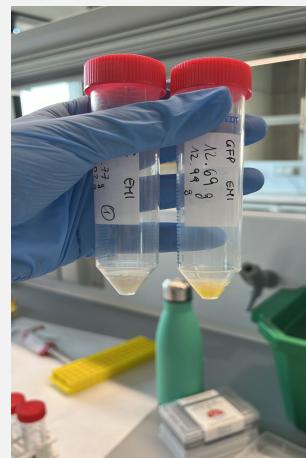


Figura 49:
Aggiunta di buffer di
lisi

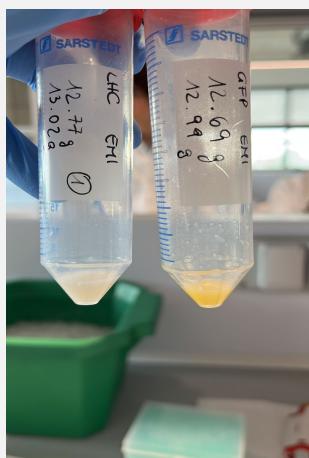


Figura 50:
Aggiunta di lisozimi
phantom



Figura 51:
LHC con aggiunta di
 $MgCl_2$ e $DNAse$



Figura 52:
LHC – primo lavaggio
con Triton



Figura 53:
GFP surnatante (a
sinistra) e precipitato



Figura 54:
Risospensione nel
tampone di
ricostituzione

10 Elettroforesi SDS – Page denaturante