

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
3 Restrizione DNA	8
3.1 Materiali e composti utilizzati	8
3.2 Protocollo	8

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 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\w)**
- **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 μ L) 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 μ L 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 %

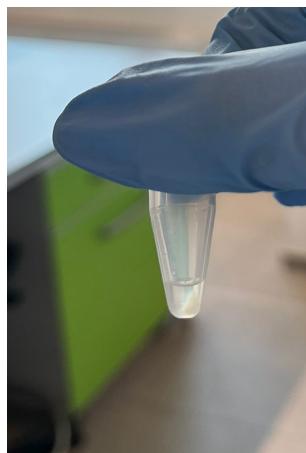


Figura 14:
Rimozione etanolo 100 %



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
- 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

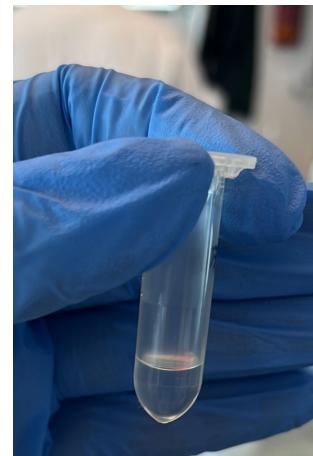


Figura 21:
Recupero della fase acquosa



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

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 H₂O
 - 10 µL di DNA
 - 2,5 µL di buffer 10X
 - 1 µL di *EcoR I*
 - controllo negativo (senza enzima)
 - 12,5 µL di H₂O
 - 10 µL di DNA
 - 2,5 µL di buffer 10X

I componenti vanno aggiunti in ordine decrescente del volume.

2. Vortexare e centrifugare le due soluzioni
3. Lasciare le soluzioni a digerire per 1–2 h a 37 °C

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 H₂O, 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

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

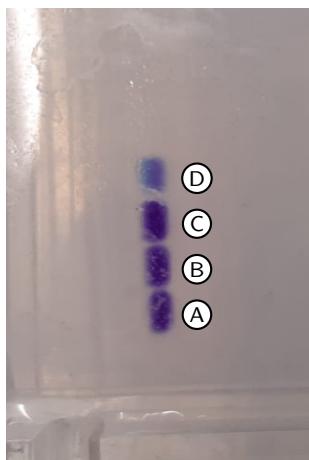


Figura 25:
Piastra di agarosio -
A DNA con enzima
B DNA senza enzima
C RNA
D Marker