

Contents

1	Miniprep - Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina	4
1.1	Introduzione - Contesto	4
1.2	Obiettivo	4
1.3	Strumentazione	4
1.4	Soluzioni e reagenti	4
1.5	Procedura	5
1.6	Conclusioni	7
2	Estrazione dell RNA totale con TRIzol e Quantificazione	8
2.1	Introduzione - Contesto	8
2.2	Obiettivo	8
2.3	Strumentazione	8
2.4	Soluzioni e reagenti	8
2.5	Procedura	9
2.6	Conclusioni	11
3	Spettrometria di un campione di RNA totale	12
3.1	Introduzione	12
3.2	Analogie e diversità dei due strumenti	12
3.3	Interpretazione dei dati	12
3.4	Registrazione del bianco	12
4	Restrizione del DNA ed analisi elettroforetica	13
4.1	Introduzione	13
4.1.1	Tecniche e tecnologie utilizzate	13
4.1.2	Informazioni generali sull'enzima EcoRI	13
4.2	Obiettivo	13
4.3	Strumentazione e reagenti (digestione enzimatica)	14
4.4	Strumentazione e reagenti (gel elettroforesi)	14
4.5	Procedura per digestione del DNA	15
4.6	Procedura preparazione Gel Elettroforesi	16
4.7	Preparazione della corsa elettroforetica	17
4.8	Osservare il gel nel transilluminatore	17
4.9	Come interpretare l'analisi	17
5	Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
5.1	Principio di funzionamento	18
5.2	Obiettivo	18
5.3	Strumentazione	18
5.3.1	Il termociclatore	18
5.4	Soluzioni e altre sostanze	18
5.5	Procedimento	19
5.6	Programma termociclatore	19
5.7	Risultati attesi	19
5.8	Un'evoluzione della PCR: RealTime-qPCR	20
5.8.1	Che problema risolve RT-qPCR	20
5.8.2	Principio di funzionamento semplificato	20
5.8.3	Cenni Storici: La strada che ha portato allo sviluppo della RealTime-qPCR	20
6	Preparazione di terreno LB solido	21
6.1	Introduzione	21
6.2	Composizione del terreno LB solido	21
6.3	Obiettivo	21
6.4	Strumentazione e reagenti	21
6.5	Procedura	21

7	Preparazione di cellule competenti	22
7.1	Introduzione	22
7.2	Buffer utilizzati	22
7.3	Procedura	23
7.4	Linee guida generali per la preparazione di tamponi	23
8	Preparazione piastre per trasformazione batterica	24
8.1	Introduzione	24
8.2	Approfondimento su Piastra con Kan/Caf	24
8.3	Approfondimento su Piastra con Amp/IPTG/Xgal	24
8.4	Obiettivo	25
8.5	Procedura	25
8.6	Conclusioni	25
9	Trasformazione cellule competenti	26
9.1	Introduzione	26
9.2	Approfondimento tecnica blue-white screening	26
9.3	Obiettivo	27
9.4	Procedura	27
9.5	Conclusioni	27
10	Colony PCR	28
10.1	Introduzione	28
10.2	Obiettivo	28
10.3	Procedura	28
10.4	Conclusioni	28
11	Mantenimento di colture cellulari di mammifero	29
11.1	Introduzione	29
11.2	Cellule HEK293T e relazione con T-antigene SV40	29
11.3	Cos'è un plasmide taggato e a cosa serve	29
11.4	Obiettivo	30
11.5	Strumenti e soluzioni	30
11.6	Procedura: Preparazioni	31
11.7	Procedura: Preparazione terreno di coltura completo (5mL)	31
11.8	Procedura	31
11.9	Conclusioni	31
12	Estrazione di proteine da cellule di mammifero	32
12.1	Introduzione	32
12.2	Obiettivo	32
12.3	Strumentazione	32
12.4	Soluzioni e reagenti	32
12.5	Procedura	33
13	Elettroforesi SDS-PAGE e Western Blot	34
13.1	Introduzione	34
13.1.1	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	34
13.1.2	Western Blot	35
13.2	Obiettivo	35
13.3	Fasi dell'esperimento	35
13.4	Strumentazione	36
13.5	Soluzioni e reagenti	36
13.6	Procedura: Corsa elettroforetica (Fase I)	37
13.7	Procedura: Western Blot (Fase II)	37
13.8	Procedura: Rilevamento del segnale (Fase III)	38
13.9	Elettroforesi SDS-PAGE seguito da Western Blot	39

13.10Cromatografia di affinità	39
13.11ICC (Immunocitochimica)	39

1 Miniprep - Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina

1.1 Introduzione - Contesto

Questa procedura, sviluppata negli anni '70, si è diffusa rapidamente grazie alla sua capacità di fornire DNA plasmidico puro e pronto per numerose applicazioni, come la clonazione, la trasformazione batterica o il sequenziamento. I plasmidi, piccoli anelli di DNA autonomamente replicanti, sono i veicoli ideali per trasportare geni di interesse e manipolare l'informazione genetica a scopi sperimentali o industriali.

1.2 Obiettivo

L'esperimento mira a estrarre il DNA plasmidico in forma pura, separandolo da componenti cellulari come proteine, RNA e DNA genomico al fine di ottenere un campione adatto a successive analisi molecolari.

1.3 Strumentazione

- Micropipette e puntali sterili
- Provette Eppendorf (1.5-2 ml)
- Centrifuga da banco
- Vortex
- Congelatore o ghiaccio secco

1.4 Soluzioni e reagenti

- Soluzione I: per risospendere il pellet batterico (spesso contiene Tris, EDTA e glucosio)
- Soluzione II: per la lisi cellulare (NaOH e SDS, potente detergente)
- Soluzione III: tampone di neutralizzazione (acetato di potassio, a pH acido)
- Etanolo 100% o isopropanolo: per precipitare il DNA
- Etanolo 70%: per lavaggi finali
- Tampone TE (Tris-EDTA): per la risospensione del DNA plasmidico
- RNAasi (opzionale): per degradare eventuale RNA contaminante

1.5 Procedura

1. Raccogli circa 1,5 ml di coltura batterica fresca, cresciuta preferibilmente overnight.

- Centrifuga per 30 secondi a 12.000 rpm
- Capovolgi il tubo ed elimina il supernatante.

Accorgimento: È preferibile utilizzare una coltura batterica in fase esponenziale (12-16h e non oltre 24h) in quanto:

- Le cellule vitali presentano una maggiore concentrazione di plasmide.
- Una coltura stazionaria o in declino presenta una maggiore concentrazione di enzimi degradativi

2. Centrifuga e rimozione supernatante

Obiettivo: Separare le cellule dal terreno di coltura, concentrandole nel pellet.

- Centrifuga per 30 secondi a 12.000 rpm.
- Capovolgi il tubo ed elimina il supernatante.

3. Risospensione in Soluzione I

- Aggiungi 100 µl di Soluzione I al pellet batterico e mischia usando il puntale di una pipetta o un vortex.

Accorgimento: in questa fase le cellule sono ancora integre, quindi è possibile mixare vigorosamente senza rischiare di romperle; tuttavia, è preferibile evitare la formazione di bolle, poiché potrebbe impattare sugli step successivi.

Perché: la Soluzione I contiene un tampone (Tris) che stabilizza il pH, EDTA che chela i cofattori metallici delle nucleasi (proteggendo così il DNA) e glucosio che mantiene la tonicità e la stabilità delle cellule.

4. Lisi cellulare

Obiettivo: rompere la membrana cellulare e denaturare proteine e acidi nucleici, generando un lisato cellulare viscoso e biancastro.

- Aggiungi 200 µl di Soluzione II al campione e mescola delicatamente capovolgendo il tubo due o tre volte.

Accorgimento: mescola lentamente e con cautela; evita l'uso del vortex per non rompere meccanicamente le molecole di DNA plasmidico, che in questa fase sono particolarmente fragili.

Perché: l'SDS solubilizza le membrane e le proteine, mentre NaOH denatura DNA genomico e plasmidico.

5. Neutralizzazione rapida

Obiettivo: Neutralizzare la soluzione alcalina per permettere la rinaturazione selettiva del DNA plasmidico.

- Aggiungi 150 µl di soluzione III e mescola delicatamente capovolgendo due o tre volte la provetta, evitando l'uso del vortex.

Accorgimento: La Soluzione III contiene acetato di potassio a pH acido, che abbassa rapidamente il pH del lisato. Questo consente solo al DNA plasmidico (corto e superavvolto) di rinaturarsi selettivamente.

Criticità: Esegui questa operazione entro 2-3 minuti dall'aggiunta della Soluzione II. Un intervallo più lungo favorisce la rinaturazione anche del DNA genomico, riducendo la selettività e la purezza del DNA plasmidico.

6. Centrifugazione per separazione del surnatante

Obiettivo: Separare il pellet (residui cellulari, DNA genomico e proteine precipitate) dal surnatante contenente il DNA plasmidico.

- Centrifuga la provetta a massima velocità (14.000 rpm) per 5 minuti.
- Trasferisci il surnatante in una nuova provetta, evitando di disturbare il pellet.

Accorgimento: Non prelevare più di 500 µl di surnatante per facilitare le fasi successive di precipitazione con etanolo.

7. Precipitazione del DNA con etanolo/isopropanolo e incubazione a freddo

Obiettivo: Concentrare e isolare il DNA plasmidico dal surnatante, formando un pellet visibile.

- Aggiungi al surnatante 2 volumi di etanolo 100% oppure 0.6 volumi di isopropanolo.
- Capovolgi delicatamente la provetta per favorire il contatto del DNA con l'alcol.
- Incuba a -20°C per circa 20 minuti per facilitare la formazione del pellet.

Perché: L'alcol riduce la solubilità del DNA, favorendone la precipitazione e la formazione del pellet. L'isopropanolo può essere preferito perché richiede volumi minori, ma entrambi gli alcoli funzionano efficacemente.

Perché (basse temperature): Le basse temperature riducono la solubilità degli acidi nucleici negli alcoli, favorendo la formazione di un pellet più compatto e visibile.

8. Centrifugazione a 12000g per 5 minuti

Obiettivo: Separare i detriti cellulari dal surnatante contenente il DNA plasmidico.

- Centrifuga a 12.000g per 5 minuti.
- Osserva la formazione di un pellet bianco sul fondo della provetta.

Criticità: Un pellet mucillaginoso o vischioso può indicare contaminazione da polisaccaridi o RNA, che potrebbe compromettere la purezza del DNA plasmidico.

9. Rimozione del supernatante e lavaggio con etanolo 70% v/v

Obiettivo: Eliminare residui di sali e impurità idrosolubili dal pellet di DNA plasmidico per ottenere un campione più puro e privo di contaminanti.

- Rimuovi con cautela il supernatante.
- Aggiungi 500 µl di etanolo al 70% v/v e capovolgi delicatamente la provetta per lavare il pellet.

10. Rimozione completa dell'etanolo e asciugatura all'aria

Obiettivo: Eliminare completamente l'etanolo residuo dal pellet di DNA plasmidico per garantire un'adeguata risospensione.

- Rimuovi l'etanolo con cautela senza disturbare il pellet.
- Lascia il tubetto aperto all'aria per circa 10 minuti.

Criticità: Tracce residue di etanolo possono precipitare nuovamente il DNA plasmidico, rendendolo difficile da risospendere e quindi riducendo la resa finale.

11. Risospensione del DNA plasmidico in tampone TE pH 8.0

Obiettivo: Riprendere il pellet di DNA plasmidico dopo il lavaggio, solubilizzandolo in un tampone adatto alla conservazione e alla successiva manipolazione.

- Aggiungi circa 50 µl di tampone TE (Tris-EDTA) pH 8.0 al pellet di DNA plasmidico.
- Mescola delicatamente o pipetta su e giù per favorire la risospensione completa del DNA.

Perché: Il tampone TE protegge il DNA dalla degradazione grazie all'EDTA, che chela ioni metallici (ad esempio Mg^{2+}) necessari per l'attività delle DNasi. Il pH 8.0 è ottimale per la stabilità del DNA e la prevenzione dell'attività nucleasica.

12. Conservazione a 4 °C

Obiettivo: Conservare il DNA plasmidico in modo sicuro e stabile, minimizzando il rischio di degradazione.

Perché: Conservare il DNA a basse temperature rallenta l'attività enzimatica delle DNasi e altri enzimi potenzialmente contaminanti, proteggendo l'integrità del campione.

Perché (in acqua a -20 °C): In assenza di EDTA, le DNasi possono degradare il DNA anche a 4 °C; per questo, il DNA disciolto in acqua deve essere conservato a -20 °C per disattivare o rallentare drasticamente le nucleasi.

1.6 Conclusioni

L'esperimento di miniprep ha permesso di ottenere DNA plasmidico in forma pura, pronto per successive esperienze. La procedura, basata sulla lisi alcalina e la neutralizzazione selettiva, ha garantito la separazione del DNA plasmidico da contaminanti cellulari. Questo protocollo consente, se eseguito correttamente, di ottenere DNA plasmidico idoneo a clonazione, trasformazione batterica e sequenziamento.

2 Estrazione dell'RNA totale con TRIzol e Quantificazione

2.1 Introduzione - Contesto

La manipolazione dell'RNA richiede una particolare attenzione, poiché si tratta di una molecola estremamente instabile e soggetta a degradazione da parte delle RNasi. Per questo motivo, le procedure di estrazione dell'RNA devono essere svolte rapidamente, in condizioni controllate e utilizzando reagenti capaci di inattivare le nucleasi. Il metodo TRIzol¹ rappresenta una soluzione efficace per ottenere RNA totale² da campioni cellulari, poiché combina la lisi cellulare, la denaturazione delle proteine e la separazione delle fasi in un unico passaggio, garantendo un'alta resa e una buona qualità dell'RNA.

2.2 Obiettivo

Ottenere un estratto di RNA totale, privo di contaminazioni proteiche o genomiche, che possa essere utilizzato per successive esperienze.

2.3 Strumentazione

- Mortaio e pestello
- Micropipette e puntali
- Eppendorf
- Centrifuga
- Spettrofotometro a cuvetta
- Spettrofotometro nanodrop

2.4 Soluzioni e reagenti

- TRIzol (Fenolo + Guanidina isocianato)
- Azoto liquido
- Cloroformio
- 2-propanolo
- Etanolo 70%
- DEPC (DiEthyl PyroCarbonate)

¹Reagente a base di fenolo e guanidina isotiocianato che consente di isolare RNA, DNA e proteine in un singolo passaggio.

²Insieme di tutte le molecole di RNA presenti in una cellula o in un tessuto, comprese mRNA, tRNA, rRNA e RNA non codificanti.

2.5 Procedura

1. Polverizzare le foglie con azoto liquido

Obiettivo: Ridurre in polvere le foglie in polvere e trasferire in eppendorf

- Raffredda il mortaio con l'azoto liquido, lasciando evaporare l'azoto in eccesso.
- Aggiungi i pezzi di foglia e tritali usando il pestello.
- La polvere ottenuta va trasferita in due provette Eppendorf da 2 ml, utilizzando una spatola pre-raffreddata.

Perché: L'azoto liquido congela rapidamente le foglie, impedendo che diventino pastose e facilitando la frantumazione in una polvere fine.

Accorgimento: Usa una spatola pre-raffreddata per trasferire la polvere. In caso contrario, la polvere potrebbe attaccarsi alla spatola a causa dell'elevato cambio di temperatura.

Criticità: Non aspettare troppo a lungo dopo la frantumazione, poiché l'RNA può iniziare a degradarsi a temperatura ambiente. Lavora in modo rapido e in un ambiente freddo.

2. Aggiungere TRIzol (1000 μ l ogni 50mg di tessuto) e agitare per 30 secondi.

3. Attendere 5min

Obiettivo: Durante questo tempo, la miscela appare come una sospensione omogenea e torbida, senza fasi separate. Questo passaggio consente alle molecole di RNA di liberarsi dalle proteine e di rimanere in soluzione.

Perché: Questo riposo facilita la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici, favorendo l'isolamento selettivo dell'RNA nella fase acquosa successiva.

4. Aggiungere 0.2 ml di cloroformio poi vortexare per 30s.

- Aggiungere 0.2 ml di cloroformio (1:5 con il TRIzol).
- Vortexare per 30s

Perché: Il cloroformio, un solvente organico non polare, induce la separazione della miscela in tre fasi ben distinte: la fase organica (inferiore) che contiene i lipidi e altre molecole idrofobe, la fase intermedia con i detriti cellulari e le proteine denaturate, e la fase acquosa (superiore), dove si concentrano le molecole idrofile come l'RNA.

Perché il DNA non è nella stessa fase dell'RNA? I frammenti di RNA sono 3 o 4 ordini di grandezza più corti di quelli di DNA.

L'RNA è più solubile in acqua e ha gruppi OH più esposti.

Il DNA, più lungo e complesso, tende a precipitare o restare nella fase intermedia o organica

Criticità: Lavorare sotto cappa in quanto il cloroformio è tossico.

5. Attendere e poi centrifugare

Obiettivo: Ottenere una separazione netta delle tre fasi, in particolare una visibile fase acquosa contenente l'RNA totale

- Attendere 15min evitando di movimentare il campione per un ordinamento parziale e visibile delle fasi
- Centrifugare 15min 12000 giri a 4°C per ottenere una separazione netta

6. Separazione dell'RNA e precipitazione con 2-propanolo

Obiettivo: Precipitare l'RNA dalla fase acquosa ottenendo un pellet visibile.

- Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta.
- Aggiungere 0.5 ml di 2-propanolo (1:2 con TRIzol) e agitare delicatamente.

Perché: Il 2-propanolo favorisce le interazioni elettrostatiche tra i gruppi fosfato dell'RNA (negativi) e i sali positivi in soluzione. Questa neutralizzazione delle cariche rende l'RNA meno solubile, provocandone la precipitazione come pellet visibile dopo la centrifugazione.

Perché: Sia 2-propanolo che etanolo fanno precipitare gli acidi nucleici riducendone la solubilità in acqua. Il 2-propanolo, grazie alla sua polarità leggermente inferiore e alla struttura più idrofoba, è più "aggressivo" perché interagisce meno con l'acqua e forza la precipitazione dell'RNA in modo più rapido ed efficace. L'etanolo è più delicato e adatto per i lavaggi finali.

7. Attesa al freddo e centrifugazione finale

Obiettivo: Ottenere un pellet compatto di RNA attraverso la precipitazione e la successiva centrifugazione.

- Lasciare il campione a -20 °C per 30 minuti.
- Centrifugare a 12.000 g per 15 minuti a 4 °C.

8. Lavaggio con etanolo 70%

Obiettivo: Rimuovere sali e impurità residue dal pellet di RNA, migliorandone la purezza.

- Rimuovere il surnatante e aggiungere 1 ml di etanolo 70% per ogni ml di TRIZOL usato.
- Vortexare brevemente il campione.

Perché: L'etanolo 70% reidrata il pellet (riespetto al 2-propanolo) e rimuove i contaminanti idrosolubili, lasciando l'RNA più pulito per le successive analisi.

9. Centrifugazione finale

Obiettivo: Raccogliere l'RNA in un pellet compatto dopo il lavaggio con etanolo.

- Centrifugare a 12.000 g per 5 minuti a 4 °C.

Accorgimento: Mantenere la temperatura bassa per preservare l'integrità dell'RNA e minimizzare l'attività delle RNAsica.

10. Asciugatura del pellet

Obiettivo: Eliminare i residui di etanolo senza lasciare asciugare eccessivamente l'RNA, preservandone la stabilità.

- Lasciare il pellet all'aria per circa 10 minuti, evitando di asciugarlo completamente.

Criticità: Se l'etanolo non viene rimosso completamente, può compromettere la qualità dell'RNA. Tuttavia, un'asciugatura eccessiva rischia di danneggiare o degradare l'RNA.

11. Risospensione finale

Obiettivo: Solubilizzare l'RNA in un ambiente privo di nucleasi per conservarlo in modo sicuro e stabile.

- Aggiungere circa 100 μ l di acqua DEPC al pellet.
- Risospendere accuratamente il pellet mediante pipettaggio o agitazione delicata.

Perché: L'acqua DEPC è priva di RNasi e protegge l'RNA da eventuale degradazione enzimatica, garantendone la stabilità per le successive analisi.

2.6 Conclusioni

Il protocollo di estrazione dell'RNA con TRIZOL ha permesso di isolare RNA totale di buona qualità e quantità dalle cellule vegetali. I passaggi fondamentali — come la lisi in ambiente acido, la separazione delle fasi e la successiva precipitazione con 2-propanolo — hanno garantito l'eliminazione delle proteine e del DNA genomico, arricchendo la frazione acquosa di RNA puro. I lavaggi con etanolo e l'utilizzo di acqua DEPC hanno ulteriormente migliorato la purezza e la stabilità dell'RNA, minimizzando il rischio di degradazione.

3 Spettrometria di un campione di RNA totale

3.1 Introduzione

In questa esperienza, viene analizzato il campione di RNA totale estratto da cellule vegetali mediante il metodo TRIzol. La spettrometria rappresenta un passaggio fondamentale per valutare la qualità e la concentrazione dell'RNA isolato, informazioni indispensabili per eventuali applicazioni successive, come la retrotrascrizione o la PCR.

Due metodi di spettrofotometria vengono utilizzati:

- Spettrofotometria a cuvetta
- Spettrofotometria nanodrop

3.2 Analogie e diversità dei due strumenti

Entrambi gli strumenti forniscono un'analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA. Lo spettrofotometro a cuvetta utilizza un volume maggiore (normalmente 1 ml) e può essere più preciso per campioni diluiti o con contaminanti. È più indicato per campioni con abbondanza di RNA e per misurazioni tradizionali. Il nanodrop, invece, richiede solo 1-2 μ l di campione, è più rapido e pratico, e consente misurazioni su campioni limitati. Tuttavia, la sua accuratezza può essere leggermente inferiore per campioni molto sporchi o molto diluiti.

3.3 Interpretazione dei dati

Lo spettrofotometro a cuvetta fornisce i valori di assorbanza a diverse lunghezze d'onda, in particolare:

- **A₂₆₀**: misura l'assorbanza dell'RNA. Viene utilizzata per calcolare la concentrazione applicando la legge di Lambert-Beer³.
- **A₂₈₀**: misura la presenza di proteine contaminanti, poiché le proteine assorbono fortemente a questa lunghezza d'onda.
- **A₂₃₀**: misura la presenza di composti organici e sali (come fenolo e guanidina).

Rapporti chiave per la purezza:

- **A₂₆₀/A₂₈₀ \approx 2.0**: indica RNA puro, privo di contaminazione proteica.
- **A₂₆₀/A₂₃₀ \geq 2.0**: indica assenza significativa di composti organici e sali.

Valori inferiori a questi rapporti suggeriscono la presenza di contaminanti e la necessità di ulteriori purificazioni.

3.4 Registrazione del bianco

Prima di procedere alla misurazione dei campioni, è fondamentale effettuare la registrazione del bianco, detta anche taratura o calibrazione dello strumento. Questa procedura consiste nella misura dell'assorbanza di una cuvetta contenente esclusivamente il solvente o il tampone utilizzato per la risospensione dell'RNA (ad esempio acqua DEPC o tampone TE).

Scopo: La registrazione del bianco consente di eliminare dall'assorbanza misurata i contributi dovuti al solvente e alla cuvetta stessa, garantendo che i valori ottenuti siano riferiti esclusivamente all'RNA presente nel campione.

³La legge di Lambert-Beer afferma che l'assorbanza (A) è proporzionale alla concentrazione (c) e alla lunghezza del cammino ottico (l), secondo la relazione: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$.

4 Restrizione del DNA ed analisi elettroforetica

4.1 Introduzione

4.1.1 Tecniche e tecnologie utilizzate

- Selezione di una porzione di DNA con enzimi di restrizione

La restrizione del DNA è una tecnica fondamentale della biologia molecolare che sfrutta enzimi chiamati *enzimi di restrizione* per tagliare il DNA in punti specifici. Questi enzimi riconoscono e clivano sequenze particolari, producendo frammenti di dimensioni definite. In questo esperimento utilizzeremo l'enzima di restrizione EcoRI, che taglia il DNA plasmidico pUC18 in corrispondenza dei suoi siti di riconoscimento. L'uso di un controllo negativo (campione non trattato) ci permetterà di confrontare la digestione completa con il DNA intatto.

- Gel elettroforesi (per un controllo qualitativo)

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica che permette di separare le molecole di DNA in base alle loro dimensioni e al loro stato conformazionale. In un campo elettrico, le molecole di DNA cariche negativamente migrano verso il polo positivo. Tuttavia, la migrazione non dipende solo dalla lunghezza del frammento, ma anche dallo stato topologico: le molecole superavvolte (supercoiled), aperte circolarmente o lineari hanno velocità di migrazione differenti, anche a parità di lunghezza. Questo è particolarmente importante per analizzare plasmidi e frammenti di restrizione.

4.1.2 Informazioni generali sull'enzima EcoRI

EcoRI è un enzima di restrizione di tipo II, estratto da *Escherichia coli*, che taglia il DNA a doppio filamento in corrispondenza di una sequenza palindromica specifica: 5'-GAATTC-3'. Il taglio avviene tra la guanina e la adenina, generando estremità coesive (sticky ends) con un breve tratto di singolo filamento. L'azione di EcoRI è altamente specifica e dipende dalle condizioni ottimali di temperatura e cofattori ionici (ad esempio Mg^{2+}).

4.2 Obiettivo

Lo scopo dell'esperienza è la di digestione di DNA plasmidico pUC18 con l'enzima EcoRI poi verificare l'efficacia della taglio mediante elettroforesi su gel di agarosio confrontando il prodotto della reazione con pUC18 originale (controllo negativo).

4.3 Strumentazione e reagenti (digestione enzimatica)

Strumentazione:

- Micropipette e puntali
- Eppendorf
- Beuta
- Falcon
- Vortex

Soluzioni e reagenti:

- enzima di restrizione EcoRI
- Buffer specifico per EcoRI
- DNA plasmidico pUC18

4.4 Strumentazione e reagenti (gel elettroforesi)

Strumentazione:

- Vaschette elettroforetiche
- Transilluminatore⁴
- Microonde

Soluzioni e reagenti:

- TAE 50X⁵
- SyberSafe⁶
- Gel d'agarosio
- DNA ladder⁷

⁴Dispositivo che emette luce UV o blu per visualizzare i frammenti di DNA nel gel dopo la colorazione.

⁵Tampone concentrato (Tris-Acetato-EDTA) da diluire per l'elettroforesi. Mantiene stabile il pH e garantisce la conduzione elettrica durante la corsa del gel.

⁶Colorante fluorescente che si lega al DNA e RNA, consentendo la visualizzazione dei frammenti nel gel sotto luce UV o blu. È più sicuro e meno tossico rispetto al bromuro d'etidio.

⁷Mix di frammenti di DNA di dimensioni note, usato come marcatore per confrontare e stimare la lunghezza dei frammenti di DNA separati nel gel.

4.5 Procedura per digestione del DNA

1. Preparazione della miscela di digestione

Obiettivo: Preparare la reazione di digestione con l'enzima EcoRI per tagliare il DNA plasmidico pUC18.

- 10 μ l di pUC18
- 1 μ l di EcoRI (enzima di restrizione)
- 2.5 μ l di buffer 10X
- 11.5 μ l di H₂O

Criticità: L'acqua va aggiunta per prima e l'enzima per ultimo per ridurre al minimo il rischio di denaturazione dell'enzima e garantire la sua attività.

Perché: L'enzima EcoRI taglia specificamente le sequenze riconosciute, frammentando il DNA plasmidico in siti precisi.

2. Preparazione del controllo negativo (senza enzima)

Obiettivo: Preparare un controllo negativo per verificare la specificità dell'azione dell'enzima EcoRI.

- 10 μ l di pUC18
- - (nessun enzima)
- 2.5 μ l di buffer 10X
- 12.5 μ l di H₂O

Perché: Il controllo negativo permetterà di verificare che eventuali modifiche al DNA plasmidico siano dovute solo all'azione dell'enzima EcoRI e non ad altri fattori.

3. Incubazione delle reazioni

Obiettivo: Favorire l'azione dell'enzima EcoRI sul DNA plasmidico e garantire la massima efficienza di taglio.

- Incubare entrambe le provette (digestione e controllo) a 37 °C per 1-2 ore.

Accorgimento: Evitare sbalzi di temperatura o mescolamenti eccessivi durante l'incubazione, per non danneggiare l'enzima o il DNA.

Perché: La temperatura di 37 °C è ottimale per l'attività dell'enzima EcoRI, assicurando un taglio efficiente e specifico del DNA plasmidico.

4.6 Procedura preparazione Gel Elettroforesi

1. Preparazione della soluzione di agarosio

Obiettivo: Preparare un gel di agarosio allo 0.8% per l'analisi elettroforetica dei campioni.

- Pesare 0.6 g di agarosio e aggiungere 1.6 ml di TAE 50X.
- Aggiungere acqua distillata fino a 80 ml.
- Scaldare la miscela a microonde (in una beuta) senza far bollire, mescolando di tanto in tanto per sciogliere completamente l'agarosio.

Accorgimento: Sciogliere bene l'agarosio, evitando la formazione di grumi o la fuoriuscita del liquido.

2. Aggiunta del colorante

- Lasciare raffreddare leggermente la soluzione di agarosio.
- Aggiungere 4 μ l di SyberSafe, mescolare accuratamente.

Perché: Il SyberSafe lega gli acidi nucleici e consente la loro visualizzazione sotto luce UV o LED.

Criticità: Il SyberSafe deve essere aggiunto quando la soluzione di agarosio è ancora fluida ma non eccessivamente calda, poiché temperature troppo alte potrebbero compromettere la stabilità del colorante, riducendo l'efficienza di legame al DNA e la fluorescenza per la successiva analisi.

3. Colatura del gel

Obiettivo: Preparare un gel uniforme e senza bolle pronto per la separazione elettroforetica.

- Versare la soluzione di agarosio nella vaschetta di corsa, senza pettinino.
- Lasciare solidificare il gel a temperatura ambiente.
- Quando il gel è solido o quasi, aggiungere il pettinino per formare i pozzetti
- Coprire il gel TAE 1x

Accorgimento: Colare il gel senza il pettinino per evitare la formazione di bolle intorno ai denti e assicurare pozzetti regolari e ben formati. Inserire il pettinino solo dopo che la soluzione di agarosio si è raffreddata leggermente o si è completamente solidificata.

Perché: Il TAE “dentro” al gel serve a stabilizzare la struttura del gel e mantenere un ambiente idoneo durante la formazione del gel stesso, mentre quello “fluido” nella vaschetta serve a garantire la conduzione elettrica e a stabilizzare il pH durante la corsa elettroforetica.

4.7 Preparazione della corsa elettroforetica

Obiettivo: Caricare i campioni nei pozzetti, alimentare la vaschetta, ottenere una buona separazione dei vari frammenti di acidi nucleici.

- Preparare i campioni:
 - 25 μ l di pUC18 digerito + 5 μ l di Sample Buffer
 - 25 μ l di pUC18 non digerito + 5 μ l di Sample Buffer
 - 25 μ l di RNA totale + 5 μ l di Sample Buffer (Vedi esperienza "Estrazione RNA Totale con TRIzol")
 - 5 μ l di DNA ladder (marcatore di pesi molecolari)
- Caricare i campioni nei pozzetti.
- Cablare l'alimentatore alla vaschetta ed impostare il voltaggio dell'alimentatore tra 90 e 100 V.
- Lasciare correre per il tempo necessario a ottenere una buona separazione.

Accorgimento: Se la corsa elettroforetica viene lasciata procedere troppo a lungo, i frammenti di DNA o RNA più piccoli potrebbero migrare fuori dal gel, mentre quelli più grandi potrebbero risultare distorti o sovrapposti. Questo comprometterebbe la qualità e l'interpretazione dei risultati.

4.8 Osservare il gel nel transilluminatore

Obiettivo: Osservare e documentare la separazione dei frammenti di DNA o RNA nel gel dopo l'elettroforesi.

- Posizionare il gel sul transilluminatore (UV o LED).
- Accendere la lampada e regolare la luminosità per ottenere la migliore visibilità dei frammenti.
- Osservare e fotografare i pattern di bande ottenute, confrontandoli con il DNA ladder caricato.

Criticità: Non osservare direttamente la luce UV, utilizzare sempre la copertura protettiva del transilluminatore per evitare danni agli occhi.

4.9 Come interpretare l'analisi

Come interpretare la migrazione dei frammenti?

Vi è una relazione tra [dimensione, forma] degli acidi nucleici e velocità nel gel di agarosio.

- **Dimensione degli acidi nucleici:** i frammenti più piccoli migrano più velocemente nel gel e si trovano più lontano dal pozzetto di caricamento. I frammenti più grandi, invece, si muovono più lentamente e si localizzano più vicino all'origine.
- **Topologia del DNA:** frammenti aventi la stessa lunghezza possono migrare in modo diverso a seconda della loro struttura topologica:
 - *Forme supercoiled* (superavvolte) migrano più velocemente perché sono più compatte.
 - *Forme lineari* migrano a una velocità intermedia.
 - *Forme nicked o circolari rilassate* (aperti) migrano più lentamente poiché occupano più spazio nella matrice del gel.
- **Confronto con il ladder:** la scala di riferimento (DNA ladder) aiuta a stimare le dimensioni dei frammenti campione, confrontandone la distanza di migrazione.

5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.1 Principio di funzionamento

La PCR è una tecnica di amplificazione enzimatica *in vitro* del DNA. Si basa sull'uso di:

- **Primer:** brevi sequenze di DNA complementari alle regioni di interesse, che fungono da punto di innesco per la sintesi.
- **Taq polimerasi:** enzima termostabile che estende i primer lungo la sequenza stampo.

La reazione si svolge in cicli di denaturazione, appaiamento (annealing) e allungamento (estensione), generando un'esponenziale aumento delle copie del frammento target. Questa tecnica consente di ottenere un'amplificazione *specific*a ed *esponenziale* di un frammento di DNA, anche da un campione iniziale minimo

5.2 Obiettivo

Amplificazione di un inserto di DNA plasmidico (*GPR3*) di circa 1000 bp mediante la tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction).

5.3 Strumentazione

- Micropipette (da 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l) e puntali sterili
- Eppendorf (da 250 μ l)
- Termociclatore

5.3.1 Il termociclatore

Il termociclatore è uno strumento che automatizza i cicli di riscaldamento e raffreddamento necessari per la PCR. In pochi secondi, può portare la temperatura del campione dai 95°C della denaturazione, ai 55°C dell'annealing, fino ai 72°C dell'estensione, ripetendo questi cicli decine di volte in modo preciso e riproducibile. In questo modo, il termociclatore garantisce l'amplificazione efficiente e selettiva del DNA.

A cosa serve la piastra riscaldata appoggiata sui tappini delle eppendorf?

La piastra riscaldata del termociclatore mantiene il tappo dei tubi a una temperatura leggermente superiore rispetto alla reazione. Questo accorgimento previene la formazione di condensa e assicura che il volume della miscela rimanga costante.

Perché la piastra riscaldata previene la condensa?

La condensa si forma quando il vapore acqueo caldo tocca una superficie più fredda, trasformandosi in goccioline. La piastra riscaldata mantiene la parte superiore del tubo alla stessa temperatura o leggermente superiore rispetto al mix di reazione, evitando la condensazione e assicurando la stabilità del volume e delle concentrazioni.

5.4 Soluzioni e altre sostanze

- 27 μ l H₂O sterile
- 4 μ l buffer TAQ 10X
- 2 μ l MgCl₂ 50 mM
- 2 μ l Primer FOR (25 μ M)
- 2 μ l Primer REV (25 μ M)
- 2 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (*GPR3*)
- 0.5 μ l Taq polimerasi (solo per la reazione PCR+)

5.5 Procedimento

1. In un eppendorf da 250 μl preparare la seguente mix:

- 27 μl H₂O sterile
- 4 μl buffer TAQ (10X)
- 2 μl MgCl₂ (50 mM)
- 2 μl Primer FOR (25 μM)
- 2 μl Primer REV (25 μM)
- 2 μl dNTPs (10 mM)
- 1 μl DNA plasmidico (GPR3)

Volume totale: 40 μl .

2. Mescolare bene la miscela.

3. Prelevare 20 μl e trasferirli in un nuovo eppendorf:

- Aggiungere 0.5 μl di Taq polimerasi \rightarrow reazione **PCR+**.
- Il restante mix sarà usato come controllo negativo (**PCR-**), senza Taq polimerasi.

4. Caricare i campioni nel termociclatore e impostare il programma di amplificazione.

Criticita: Aggiungere prima l'acqua sterile e per ultima la Taq polimerasi per garantire la corretta miscelazione e preservare l'attività enzimatica.

5.6 Programma termociclatore

Step	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	95°C	3 minuti
Amplificazione (35 cicli)		
Denaturazione	95°C	30 secondi
Annealing	55°C	30 secondi
Estensione	72°C	60 secondi
Estensione finale	72°C	5 minuti

Table 1: Ciclo termico del programma di PCR

Criticità: Anche minime contaminazioni possono compromettere i risultati della PCR, portando a falsi positivi o amplificazioni indesiderate.

5.7 Risultati attesi

Al termine del ciclo di amplificazione, il prodotto della PCR (circa 1000 bp) verrà analizzato mediante corsa su gel di agarosio per confermare la presenza e la dimensione attesa dell'amplificato.

Dal punto di vista quantitativo, la PCR amplifica in maniera *esponenziale*: ad ogni ciclo teoricamente il numero di copie raddoppia. Dopo 35 cicli, il numero di copie finali può teoricamente raggiungere un fattore di amplificazione di $2^{35} \approx 3.4 \times 10^{10}$ volte rispetto al numero di copie iniziali. Tuttavia, nella pratica, l'efficienza reale di amplificazione si attesta solitamente tra il 80–90%, portando comunque a un incremento di milioni a miliardi di copie a partire da poche copie iniziali.

5.8 Un'evoluzione della PCR: RealTime-qPCR

5.8.1 Che problema risolve RT-qPCR

La PCR tradizionale permette di amplificare frammenti specifici di DNA, ma fornisce solo un risultato qualitativo finale: la presenza o assenza del target. Tuttavia, in molti ambiti, come la diagnostica, la ricerca clinica e la quantificazione di cariche virali, è fondamentale non solo rilevare la presenza del target ma anche misurare la sua quantità in modo preciso e riproducibile. La real time-qPCR, o PCR quantitativa in tempo reale, nasce quindi dall'esigenza di:

- Monitorare la quantità di DNA amplificato durante ogni ciclo di amplificazione agevolmente (automaticamente).
- Evitare passaggi post-PCR (come la corsa su gel di agarosio), che richiedono tempo e possono introdurre errori.
- Ottenere dati quantitativi e riproducibili per studi di espressione genica, cariche virali e analisi di polimorfismi.

5.8.2 Principio di funzionamento semplificato

La real time-qPCR utilizza sonde a doppia etichetta chiamate **sonde TaqMan™**, queste sonde sono brevi filamenti di acidi nucleici che contengono:

- Un **reporter fluorescente**, che emette fluorescenza quando eccitato.
- Un **quencher**, una molecola che "spegne" la fluorescenza del reporter se in prossimità.

All'inizio, la sonda è intatta e la fluorescenza del reporter è "spenta" dal quencher grazie al fenomeno di trasferimento di energia (*Förster Resonance Energy Transfer*, o FRET). Durante la fase di estensione della PCR, la Taq polimerasi degrada la sonda ibridata al DNA target grazie alla sua attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$. Questo degrada la sonda e separa il reporter dal quencher. Il risultato è un aumento della fluorescenza emessa, proporzionale alla quantità di DNA amplificato in ogni ciclo. In questo modo, la real time-qPCR consente di misurare in tempo reale e con elevata sensibilità l'andamento dell'amplificazione e la quantità di DNA presente nel campione.

5.8.3 Cenni Storici: La strada che ha portato allo sviluppo della RealTime-qPCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ha rivoluzionato la ricerca e la diagnostica clinica fin dalla sua invenzione negli anni '80, permettendo la replicazione esponenziale di specifici frammenti di DNA. Tuttavia, la PCR tradizionale forniva i risultati solo al termine della reazione, rendendo impossibile una quantificazione diretta del materiale amplificato.

La strada verso la realizzazione della real time-qPCR è stata lunga e ricca di scoperte. Già negli anni '50, Arthur Kornberg aveva isolato la DNA polimerasi, ma la sua instabilità alle alte temperature ne limitava l'uso nella PCR. La svolta arrivò con la scoperta, nel 1965, del batterio *Thermus aquaticus* da parte di Thomas Brock e Hudson Freeze: l'enzima Taq polimerasi isolato da questi batteri era termostabile e rivoluzionò l'amplificazione del DNA.

Nel 1983, Kary Mullis ideò la PCR, introducendo tre fasi cicliche fondamentali — denaturazione, annealing e estensione — rese automatizzabili grazie all'avvento dei termociclatori negli anni '80. Mentre la PCR tradizionale migliorava la quantità di DNA amplificato, rimaneva la sfida di misurare in modo accurato e in tempo reale la quantità di DNA prodotto.

Negli anni '90, gruppi di ricerca come quello di immunologi del Fox Chase Cancer Center svilupparono la qPCR (quantitative PCR), limitando il numero di cicli per restare nel range lineare dell'amplificazione e ottenere dati quantitativi. Tuttavia, i metodi richiedevano ancora interventi manuali e l'uso di materiali radioattivi, rendendoli poco adatti alla diagnostica di routine.

Il salto definitivo si ebbe nel 1996 con il primo sistema commerciale di real time-qPCR (ABI PRISM 7700), che integrava la chimica TaqMan™. Grazie a sonde fluorescenti e alla tecnologia FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), la real time-qPCR permetteva di monitorare la fluorescenza emessa durante ogni ciclo di amplificazione, fornendo così una misura diretta e continua della quantità di DNA prodotto. Questo sistema, unendo la specificità e la sensibilità della PCR tradizionale con la possibilità di quantificare in tempo reale, ha reso la real time-qPCR uno strumento indispensabile per la diagnostica molecolare e la ricerca scientifica. La pandemia di COVID-19 ha infine consacrato questa tecnica come il "gold standard" per la rilevazione di agenti infettivi su scala globale.

6 Preparazione di terreno LB solido

6.1 Introduzione

La preparazione del terreno LB solido è un passaggio fondamentale per la crescita di *Escherichia coli* su piastre. Il terreno LB (Luria-Bertani) fornisce una fonte ricca di nutrienti e supporta la crescita di colonie batteriche isolate.

6.2 Composizione del terreno LB solido

- 1% tryptone: miscuglio di peptidi e amminoacidi derivato dalla digestione parziale della caseina (una proteina del latte)
- 0.5% estratto di lievito (yeast extract): fornisce vitamine, nucleotidi e altri fattori di crescita essenziali.
- 0.5% NaCl: mantiene l'equilibrio osmotico e la stabilità ionica della soluzione (previene plasmolisi e lisi osmotica).
- 1.5% agar batteriologico: solidificante derivato da alghe, consente la formazione di piastre solide per la crescita delle colonie.

Nota: Le percentuali indicate (es. 1% tryptone) rappresentano concentrazioni in peso/volume (w/v): ad esempio, 1% w/v equivale a 1 g di triptone disciolto in 100 mL di acqua distillata. Non sono già soluzioni, ma polveri che vanno disciolte manualmente nella preparazione del terreno.

6.3 Obiettivo

Lo scopo di questa esperienza è preparare 50 mL di terreno LB solido sterile per l'uso in piastre Petri e la successiva crescita di batteri.

6.4 Strumentazione e reagenti

Reagenti:

- Tryptone
- Estratto di lievito
- NaCl
- Agar batteriologico
- Acqua distillata

Strumentazione:

- Bilancia analitica
- Becher
- Bacchetta di vetro o magnete per agitazione
- Bottiglia in vetro (o Pirex) adatta per autoclave
- Autoclave

6.5 Procedura

1. Pesare le quantità necessarie per 50 mL di terreno LB solido:
 - 0.5 g di tryptone
 - 0.25 g di estratto di lievito
 - 0.25 g di NaCl
 - 0.75 g di agar batteriologico
2. Aggiungere i componenti in un becher e mescolare con 50 mL di acqua distillata fino a completa dissoluzione.
3. Trasferire la soluzione in una bottiglia adatta per l'autoclave.
4. Attaccare un pezzetto di nastro da autoclave alla bottiglia per indicare l'avvenuta sterilizzazione.
5. Sterilizzare la soluzione in autoclave a 121 °C per 15-20 minuti.
6. Lasciare raffreddare leggermente la soluzione prima dell'uso o versare nelle piastre Petri in condizioni sterili.

7 Preparazione di cellule competenti

7.1 Introduzione

La preparazione delle cellule competenti è un passaggio fondamentale per rendere i batteri capaci di assorbire DNA plasmidico durante la trasformazione. In questo protocollo verranno usate le linee batteriche *DH5α* e *BL21*.

Insight: Differenze tra (*DH5α* e *BL21*)?

I due ceppi di *Escherichia coli* hanno scopi distinti nelle tecniche di biologia molecolare:

- **DH5α**: è un ceppo ottimizzato per il *clonaggio* e la propagazione di plasmidi. È molto efficiente nella trasformazione e ha mutazioni (*recA1*, *endA1*) che riducono la degradazione del DNA estraneo e aumentano la stabilità dei plasmidi e la mutazione *lacZΔM15* che permette il processo di blue-white screening.
- **BL21**: è un ceppo usato per l'*espressione di proteine ricombinanti*. Ha mutazioni che inattivano le proteasi intracellulari, permettendo la produzione su larga scala di proteine eterologhe senza che vengano degradate.

7.2 Buffer utilizzati

Buffer 1 (50 mL) – *Buffer di preparazione*

- RbCl 12 g/L (0.6 g)
- MnCl₂·4H₂O 9.9 g/L (0.49 g)
- 1.5 mL di una soluzione di KAc 1 M a pH 7.5
- CaCl₂·2H₂O 1.5 g/L (0.075 g)
- Glicerolo 150 g/L (7.5 g)

Portare a pH 5.8 con HAc, portare a volume (50 mL) con acqua milliQ e filtrare con membrana 0.22 μm sotto cappa.

Buffer 2 (20 mL) – *Buffer di stabilizzazione*

- 0.4 mL di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
- RbCl 1.2 g/L (0.025 g)
- CaCl₂·2H₂O 11 g/L (0.22 g)
- Glicerolo 150 g/L (3 g)

Portare a volume (20 mL) con acqua milliQ e filtrare con membrana 0.22 μm sotto cappa.

Perché usare due buffer diversi?

Sia il **Buffer 1** (Preparazione) che il **Buffer 2** (Stabilizzazione) sono formulati per preparare e proteggere le cellule durante la trasformazione, ma svolgono ruoli distinti e complementari.

- **Similitudini**: Entrambi contengono RbCl, CaCl₂ e glicerolo. Questi componenti aiutano a:
 - Mantenere l'integrità della membrana cellulare.
 - Stabilizzare la cellula in condizioni di stress osmotico.
- **Differenze**:
 - Il **Buffer 1** ha un pH più acido e contiene anche MnCl₂ e KAc. Questo lo rende ideale per la fase iniziale: “ammorbidisce” la membrana e la rende più permeabile al DNA, facilitandone l'entrata.
 - Il **Buffer 2** ha un pH più neutro (stabilizzato dal tampone MOPS) e contiene più CaCl₂. Serve nella fase finale per stabilizzare la membrana e proteggere le cellule durante il congelamento e la trasformazione.

Insieme, questi due buffer creano un equilibrio tra **permeabilizzazione** (fase iniziale) e **stabilizzazione** (fase finale), fondamentale per ottenere cellule competenti efficienti e vitali.

7.3 Procedura

1. Prelevare in sterilità con pipette sierologiche 5 mL di una coltura di cellule DH5 α e 5 mL di BL21 ad OD₆₀₀ di 0.3–0.4 e trasferirli in due provette Falcon da 15 mL sterili.
2. Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4 °C ed eliminare il surnatante.
3. Per ciascuna linea cellulare, risospendere dolcemente le cellule in 0.8 mL di **buffer 1** e trasferire la sospensione in eppendorf da 2 mL sotto cappa.
4. Incubare in ghiaccio per 15 minuti.
5. Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4 °C.
6. Eliminare sotto cappa il surnatante e risospendere le cellule in 400 μ L di **buffer 2**.
7. Congelare in azoto liquido e conservare a –80 °C.

Accorgimento: Lavorare sempre sotto cappa per evitare contaminazioni e garantire la sterilità.

Insight: La dicitura OD₆₀₀ si riferisce alla **densità ottica (Optical Density) misurata a 600 nm**. È un metodo rapido e **indiretto** per stimare la concentrazione delle cellule batteriche in coltura: più alta è l'OD₆₀₀, maggiore è la densità cellulare. Questo parametro è particolarmente utile per controllare la fase di crescita della coltura e regolare i tempi di inoculo o di raccolta.

Nel contesto della preparazione di cellule competenti, l'OD₆₀₀ **ideale** è compreso tra **0.3 e 0.4**. In questa fase (*fase esponenziale di crescita*), le cellule sono metabolicamente attive e le membrane sono più “plastiche” e predisposte alla trasformazione. Raccogliere le cellule a questo punto garantisce un’alta efficienza di trasformazione e cellule vitali.

7.4 Linee guida generali per la preparazione di tamponi

I tamponi (o buffer) sono soluzioni che mantengono stabile il pH durante le esperienze biologiche. La scelta e la preparazione accurata del tampone sono fondamentali per garantire la buona riuscita delle reazioni e la vitalità delle cellule.

- **pH desiderato:** Scegliere un tampone il cui pK_a è vicino al pH target (entro 1 unità) per assicurare la massima capacità tamponante.
- **Compatibilità con enzimi o cellule:** Verificare che il tampone non interferisca con i cofattori o la reazione biologica. Ad esempio, l'EDTA chela i metalli e inibisce enzimi che richiedono Mg²⁺.
- **Forza ionica e osmolarità:** Per esperimenti con cellule vive, è importante che il tampone sia isotonico (ad esempio con aggiunta di NaCl) per evitare danni osmotici come lisi o plasmolisi.
- **Concentrazione del tampone:** In genere si utilizzano tamponi a concentrazione compresa tra 10 e 100 mM, evitando concentrazioni troppo elevate che potrebbero creare effetti collaterali.
- **Purezza e sterilità:** Preparare la soluzione con acqua milliQ o distillata e filtrare per rimuovere contaminanti che potrebbero compromettere la reazione o la crescita cellulare.

Insight: La mole è un’unità fondamentale in chimica e rappresenta 6.022×10^{23} particelle. La concentrazione millimolare (mM) rappresenta un millesimo di mole per litro e si usa per misurare in modo preciso la quantità di sostanza disciolta, particolarmente utile in biologia molecolare.

Insight: L’acqua MilliQ è un tipo di acqua ultrapura prodotta da un sistema di purificazione. (ad esempio i sistemi *Milli-Q* di Merck Millipore). Ha una resistività molto elevata (18.2 M Ω -cm), indice della sua purezza estrema. È priva di sali, ioni, contaminanti organici e particelle. In biologia molecolare e in chimica analitica, l’acqua MilliQ è fondamentale per evitare interferenze nelle reazioni enzimatiche e garantire la massima affidabilità e riproducibilità dei risultati.

8 Preparazione piastre per trasformazione batterica

8.1 Introduzione

Le piastre di LB-agar arricchite con antibiotici e indicatori cromogenici sono fondamentali per la selezione e il riconoscimento dei batteri trasformati con plasmidi contenenti geni di resistenza o reporter come *lacZ*. In questa sezione viene spiegato come preparare due tipologie di piastre: **Piastra con Kan/Caf** e **Piastra con Amp/IPTG/Xgal**.

8.2 Approfondimento su Piastra con Kan/Caf

La **Piastra con Kan/Caf** contiene **kanamicina** e **cloramfenicolo** come antibiotici selettivi. Questi antibiotici inibiscono la crescita dei batteri che non contengono il plasmide con i geni di resistenza corrispondenti. Le colonie che crescono su queste piastre possiedono un plasmide che conferisce resistenza a entrambi gli antibiotici. Questa strategia è utile per la selezione di cloni trasformati in esperimenti di clonaggio o in espressioni in cui è richiesta la selezione multipla.

Insight: La **kanamicina** è un antibiotico aminoglicosidico che si lega alla subunità 30S del ribosoma batterico, bloccando la sintesi proteica e causando la morte cellulare. Il gene di resistenza *kanR* codifica un enzima che inattiva la kanamicina.

Insight: Il **cloramfenicolo** agisce legandosi alla subunità 50S del ribosoma batterico, inibendo la formazione del legame peptidico durante la traduzione. La resistenza è mediata dall'enzima cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT), che acetila e inattiva l'antibiotico.

8.3 Approfondimento su Piastra con Amp/IPTG/Xgal

La **Piastra con Amp/IPTG/Xgal** combina la selezione antibiotica (ampicillina) con un sistema cromogenico.

- **Ampicillina:** seleziona i batteri trasformati contenenti il plasmide con il gene di resistenza.
- **IPTG:** è un induttore del promotore *lac*, stimolando l'espressione del gene *lacZ* codificante la β -galattosidasi.
- **X-gal:** substrato cromogenico che, in presenza di β -galattosidasi, produce un composto blu.

Le colonie che esprimono β -galattosidasi appaiono blu, mentre quelle che contengono un inserto nel gene *lacZ* (interruzione) restano bianche.

Insight: L'**ampicillina** è un antibiotico β -lattamico che inibisce la sintesi della parete cellulare batterica. Il gene di resistenza *bla* codifica l'enzima β -lattamasi, che scinde l'anello β -lattamico dell'ampicillina e la inattiva.

Insight: Gli antibiotici β -lattamici sono una famiglia ampia e fondamentale in medicina e biologia molecolare. Comprendono:

- **Penicilline** (es. ampicillina, amoxicillina)
- **Cefalosporine** (diverse generazioni, es. cefalexina, ceftriaxone)
- **Carbapenemi** (es. imipenem, meropenem)
- **Monobattami** (es. aztreonam)

Tutti questi antibiotici condividono una qualche forma più o meno elaborata dell'anello β -lattamico, essenziale per bloccare gli enzimi responsabili della sintesi della parete batterica.

Perché la selezione multipla?

La **selezione multipla** con due antibiotici (es. Kan/Caf) permette di selezionare batteri che contengono plasmidi con entrambi i geni di resistenza, aumentando la **stringenza della selezione** e riducendo i falsi positivi.

Questa strategia è utile anche per:

- Garantire che l'intero plasmide (con più cassette geniche) sia mantenuto intatto.
- Plasmidi **shuttle**, progettati per replicarsi e funzionare in due organismi diversi (es. batteri e lieviti) grazie a origini di replicazione e geni di resistenza specifici per ciascun ospite.

8.4 Obiettivo

Preparare piastre LB-agar supplementate con antibiotici e substrati cromogenici per la successiva trasformazione e selezione dei batteri DH5 α .

Reagenti:

- Bilancia analitica
- Becher
- Bacchetta di vetro o magnete per agitazione
- Microonde
- Falcon
- Piastre Petri
- Pipette e puntali
- Cappa a flusso laminare

Strumentazione:

- LB-agar solido
- Soluzioni stock di antibiotici:
 - Kanamicina 1000X
 - Cloramfenicolo (CAF) 1000X
 - Ampicillina 1000X
- Soluzioni di:
 - IPTG 0.5 mM
 - X-gal 80 $\mu\text{g/mL}$
- Acqua milliQ

8.5 Procedura

1. Sciogliere il terreno LB-agar (se già solidificato) nel microonde o su piastra riscaldante.
2. Lasciare raffreddare leggermente e, sotto cappa, trasferire 25 mL in una Falcon sterile.
3. Aggiungere 25 μL di CAF 1000X e 25 μL di Kan 1000X. Mescolare e versare in una piastra Petri (**Piastra con Kan/Caf**).
4. Ai rimanenti 25 mL aggiungere:
 - 25 μL di Ampicillina (dallo stock 1000X)
 - 25 μL di IPTG 0.5 mM
 - 25 μL di X-gal 80 $\mu\text{g/mL}$Mescolare bene e versare in un'altra piastra Petri (**Piastra con Amp/IPTG/Xgal**).
5. Lasciare le piastre semi-aperte sotto cappa fino a completa solidificazione dell'agar.
6. Chiudere e conservare le piastre a 4 °C.

8.6 Conclusioni

Le piastre preparate con antibiotici e substrati cromogenici sono pronte per la selezione dei batteri trasformati. La **Piastra con Kan/Caf** permette la selezione di plasmidi con geni di resistenza alla kanamicina o cloramfenicolo, mentre la **Piastra con Amp/IPTG/Xgal** consente sia la selezione con ampicillina sia la rivelazione di colonie “blue/white” per il gene *lacZ*. Questa preparazione garantisce un ambiente selettivo e cromogenico essenziale per esperimenti di clonaggio e trasformazione.

9 Trasformazione cellule competenti

9.1 Introduzione

La trasformazione batterica è una tecnica fondamentale della biologia molecolare che permette l'introduzione di plasmidi ricombinanti all'interno delle cellule ospiti. In questa esperienza, la trasformazione è stata effettuata sulle cellule competenti *Escherichia coli* DH5 α utilizzando il plasmide pUC18-mix.

Il plasmide contiene geni di resistenza agli antibiotici e il sistema cromogenico *lacZ α* necessario per la selezione tramite blue-white screening. Questo approccio consente di identificare rapidamente i batteri che hanno integrato il plasmide ricombinante con l'inserito corretto, sfruttando sia la resistenza antibiotica sia il cambiamento cromogenico indotto dalla scissione di X-gal.

La tecnica si basa su una combinazione di fasi: incubazione a freddo, shock termico per facilitare l'ingresso del plasmide, e infine crescita in terreno selettivo per identificare i cloni trasformati e distinguere quelli ricombinanti.

9.2 Approfondimento tecnica blue-white screening

La tecnica del **blue-white screening** è un metodo rapido ed efficace per identificare colonie batteriche che contengono plasmidi ricombinanti con l'inserito desiderato. Essa sfrutta il gene *lacZ α* , che codifica la subunità α della β -galattosidasi. Questo gene è presente nel plasmide e complementa una porzione mancante (*lacZ ω*) nel cromosoma del batterio ospite, ripristinando così l'attività dell'enzima.

Dopo la trasformazione, alcuni batteri integrano il plasmide, mentre altri no.

- I batteri che non hanno integrato alcun plasmide vengono eliminati perché non possiedono il gene di resistenza agli antibiotici e quindi non sopravvivono sulle piastre contenenti antibiotico.
- I batteri che hanno integrato il plasmide possiedono il gene di resistenza e quindi formano colonie.

Tuttavia, c'è un'ulteriore distinzione: alcuni plasmidi integrati potrebbero essere “vuoti” (senza inserto), mentre altri contengono l'inserito del gene di interesse. È qui che entra in gioco il concetto di “**insertional inactivation**”.

Insertional inactivation significa che l'inserito del gene di interesse viene clonato all'interno del gene *lacZ α* .

- **Plasmide vuoto (senza inserto):** il gene *lacZ α* è intatto e funziona. L'enzima β -galattosidasi viene prodotto e scinde il substrato cromogenico **X-gal**, generando un composto blu \Rightarrow **colonie blu**.
- **Plasmide con inserto:** l'inserito interrompe il gene *lacZ α* , inattivandolo. L'enzima β -galattosidasi non viene prodotto e l'X-gal non viene scisso \Rightarrow **colonie bianche**.

Questa distinzione visiva permette di selezionare rapidamente le colonie “bianche” (con inserto) e distinguere i cloni ricombinanti corretti, risparmiando tempo e risorse nella verifica del clonaggio. La combinazione di antibiotico (per selezione positiva) e sistema cromogenico (per la distinzione tra plasmide vuoto e ricombinante) è una tecnica potente e versatile.

9.3 Obiettivo

Effettuare la trasformazione delle cellule competenti DH5 α con il plasmide pUC18-mix e selezionare i cloni ricombinanti attraverso la tecnica del blue-white screening.

Reagenti:

- pUC18-mix (plasmide da trasformare)
- Cellule competenti DH5 α
- Terreno LB liquido (LB-Agar)
- Piastra petri con LB-Amp-Xgal-IPTG (vedi sezione precedente)

Strumentazione:

- Micropipette e puntali
- Eppendorf
- Bagno termostato (42 °C)
- Ghiaccio
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a 37 °C

9.4 Procedura

1. Trasferire 100 μ L di cellule competenti DH5 α in una eppendorf sterile sotto cappa.
2. Aggiungere 1 μ L di plasmide pUC18-mix e mescolare delicatamente.
3. Incubare la sospensione in ghiaccio per 20-30 minuti.
4. Effettuare lo shock termico immergendo la provetta nel bagno a 42 °C per 1 minuto.
5. Raffreddare rapidamente in ghiaccio per 5 minuti.
6. Aggiungere 200 μ L di terreno LB liquido e incubare a 37 °C per circa 1 ora (per esprimere la resistenza agli antibiotici).
7. Piastrare 100 μ L della sospensione sulle piastre LB-Amp-Xgal-IPTG e incubare a 37 °C overnight (o a temperatura ambiente per tutto il weekend).

Perché lo shock termico?

Lo **shock termico** consiste in un rapido riscaldamento a 42 °C seguito da un raffreddamento in ghiaccio. Questa sequenza crea un gradiente termico che favorisce l'ingresso e mantenimento del plasmide.

- **Effetto della temperatura alta (42 °C):** aumenta la fluidità della membrana plasmatica e temporaneamente la sua permeabilità, facilitando il passaggio del DNA plasmidico all'interno delle cellule.
- **Effetto del raffreddamento rapido in ghiaccio:** aiuta a "sigillare" la membrana e stabilizzare la struttura cellulare, evitando la fuoriuscita del materiale interno e consolidando l'ingresso del plasmide.

Perché incubare in LB liquido per 1 ora prima della piastratura?

Dopo la trasformazione, le cellule hanno bisogno di periodo di **recupero** in un terreno senza antibiotico (LB liquido) per iniziare a esprimere i geni di resistenza (ad es. β -lattamasi per l'ampicillina). Questo step evita di selezionare cellule che non hanno ancora avuto tempo di produrre l'enzima e quindi morirebbero prematuramente se piastate subito su un terreno contenente antibiotico.

9.5 Conclusioni

L'esperimento di trasformazione delle cellule DH5 α ha permesso di ottenere colonie resistenti agli antibiotici, distinguendo visivamente i cloni ricombinanti (colonie bianche) da quelli non ricombinanti (colonie blu) grazie al blue-white screening che combina selezione antibiotica e cromogenica.

10 Colony PCR

10.1 Introduzione

La **Colony PCR** è una variante della PCR tradizionale in cui la colonia batterica intera viene usata come sorgente diretta del DNA stampo, senza un'estrazione preventiva.

A differenza della PCR "normale", dove si parte da DNA plasmidico o genomico purificato, la colony PCR permette di verificare in modo rapido la presenza di un inserto corretto direttamente dalle colonie cresciute sulla piastra.

Questa tecnica è particolarmente utile per confermare rapidamente la corretta integrazione di un inserto in plasmidi clonati.

Insight: Una differenza fondamentale nella Colony PCR è il **primo ciclo di denaturazione**. In questa fase, la temperatura è elevata (95 °C per 3 minuti) per **lisare le cellule batteriche** e liberare il DNA plasmidico, creando così una situazione analoga a quella di una PCR standard con DNA purificato.

10.2 Obiettivo

Verificare rapidamente la presenza di un inserto specifico in colonie batteriche trasformate tramite l'amplificazione del DNA plasmidico direttamente dalla colonia.

Strumentazione:

- Termociclatore
- Micropipette e puntali sterili
- Provette da PCR
- Strumenti per gel elettroforesi

Reagenti:

- 20 μ L di acqua sterile per sciogliere la colonia
- 15 μ L di PCR mix
- Colonie bianche e blu da testare
- Gel di agarosio 0.8% con SyberSafe per analisi finale

10.3 Procedura

1. Prendere due provette da PCR, etichettarle e aggiungere 20 μ L di acqua sterile.
2. Con una punta pulita, toccare una colonia bianca e dissolverla nell'acqua di una provetta. Ripetere con una colonia blu nella seconda provetta.
3. Prelevare 15 μ L di PCR mix e trasferirli in due provette PCR nuove.
4. Aggiungere 5 μ L della sospensione di colonia a ciascuna provetta contenente il mix e mescolare con il vortex.
5. Trasferire le provette nel termociclatore e avviare il seguente programma:
 - **Denaturazione iniziale:** 95 °C per 3 minuti
 - **25 cicli di amplificazione:**
 - 95 °C per 30 secondi (denaturazione)
 - 55 °C per 30 secondi (annealing)
 - 72 °C per 60 secondi (estensione)
 - **Estensione finale:** 72 °C per 5 minuti
6. Preparare un gel di agarosio allo 0.8% (vedi sezioni precedenti)
7. Dopo la corsa elettroforetica, analizzare i campioni per confermare la presenza dell'inserto.

Criticità: Nella colony PCR, il design dei primer forward e reverse deve essere estremamente specifico per il gene di interesse. La reazione avviene in un ambiente complesso, ricco di DNA batterico e plasmidico potenzialmente non correlato. Il potenziale per appaiamenti a sequenze diverse da quella target è maggiore, risultando poi, in amplificazioni spurie.

10.4 Conclusioni

La Colony PCR è una tecnica rapida e potente per identificare cloni batterici positivi direttamente dalle colonie, evitando passaggi laboriosi di purificazione del DNA. Con opportuni accorgimenti sul design dei primer e il corretto controllo del primo ciclo di denaturazione, si ottengono risultati affidabili ed efficienti.

11 Mantenimento di colture cellulari di mammifero

11.1 Introduzione

Il mantenimento di colture cellulari di mammifero è un passaggio fondamentale per numerosi studi di biologia molecolare e cellulare, come l'analisi dell'espressione proteica, la trasfezione di plasmidi e la caratterizzazione funzionale delle proteine. Questa esperienza si concentra sul mantenimento e la subcultura di cellule HEK293T trasfettate, ponendo attenzione a tutte le precauzioni per evitare contaminazioni e garantire l'integrità e la vitalità delle colture.

11.2 Cellule HEK293T e relazione con T-antigene SV40

L'SV40 (*Simian Virus 40*) è un virus che infetta cellule di primate e il suo genoma contiene un gene che codifica per una proteina virale chiamata **T-antigene SV40**. Questa proteina ha la funzione di riconoscere e attivare l'**origine di replicazione SV40**, una sequenza di DNA specifica presente nel genoma del virus stesso.

Nelle applicazioni di biologia molecolare, l'origine di replicazione SV40 viene inserita in plasmidi per consentire la loro replicazione efficiente nelle cellule eucariotiche.

Le cellule HEK293T, utilizzate in questa esperienza, sono state modificate per esprimere il T-antigene SV40 in modo stabile. Questo le rende capaci di riconoscere e attivare l'origine di replicazione SV40 presente in plasmidi pcDNA.3-HA e pcDNA.3- β Catenin-HA, facilitando così la replicazione e la stabilità del plasmide all'interno delle cellule.

In sintesi, il T-antigene SV40 nelle cellule HEK293T consente una replicazione più rapida e abbondante dei plasmidi contenenti l'origine SV40, rendendole ideali per studi di espressione proteica e altri esperimenti in cui è necessario avere molte copie di un plasmide.

11.3 Cos'è un plasmide taggato e a cosa serve

I plasmidi utilizzati in questa esperienza, come pcDNA3-HA e pcDNA3- β Catenin-HA, sono **taggati** con una piccola sequenza aggiuntiva chiamata *HA tag* (Hemagglutinin tag). Il **tag** è un breve peptide che viene fuso alla proteina di interesse e che non ne altera significativamente la funzione o la struttura.

Come funziona il tag:

- Il tag *HA* è riconosciuto da anticorpi specifici.
- Permette di **rilevare e quantificare** la proteina espressa durante gli esperimenti (es. Western blot, immunoprecipitazione).
- Facilita l'analisi della localizzazione intracellulare in tecniche come l'immunocitochimica.
- Garantisce che le proteine esogene (ad esempio, la β -Catenina) possano essere **identificate con facilità** rispetto alle proteine endogene normalmente presenti nelle cellule.

In sintesi, i tag come *HA* sono strumenti per confermare la presenza e la corretta espressione di una proteina d'interesse della cellula host.

11.4 Obiettivo

L'obiettivo di questa esperienza è mantenere e suddividere correttamente le colture cellulari di **HEK293T** in adesione, garantendo la vitalità e la purezza delle cellule per futuri esperimenti di espressione proteica e analisi molecolare.

In particolare, l'esperienza prevede la produzione e la gestione di due popolazioni di cellule:

- Una coltura trasfettata con **pcDNA3- β Catenin-HA** per studiare gli effetti dell'espressione di questa proteina nelle cellule.
- Una coltura trasfettata con **pcDNA3-HA (plasmide vuoto)** come controllo negativo.

Questa distinzione permette di confrontare le due condizioni sperimentali e ottenere risultati affidabili e riproducibili.

11.5 Strumenti e soluzioni

Strumentazione:

- Cappa a flusso laminare
- Microscopio invertito
- Pipette e puntali sterili
- Tubi Falcon sterili (15 mL e 50 mL)
- Pipetta aspirante
- Centrifuga da laboratorio
- Incubatore a 37 °C con 5% CO₂
- Etanolo al 70% per la sterilizzazione

Soluzioni e reagenti:

- Cellule **HEK293T** trasfettate con **pcDNA.3-HA** o **pcDNA.3- β Catenin-HA**
- Terreno di crescita completo (DMEM + 10% FBS + Pen/Strep 1X)
- PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺)
- Soluzione di tripsina-EDTA

Insight: Il **microscopio invertito** è progettato con la sorgente luminosa e gli obiettivi posti sotto il piano di osservazione. Questo consente di osservare comodamente cellule in coltura in piastre o contenitori in plastica, dove le cellule aderiscono al fondo. Rispetto ai microscopi convenzionali, facilita la visione di cellule vive senza la necessità di campioni sottili.

Perché 5% CO₂?

L'incubatore a 5% CO₂ ricrea le condizioni fisiologiche tipiche dell'ambiente cellulare. Il CO₂ si dissolve nel terreno di coltura, contribuendo a mantenere il **pH stabile e ottimale** (circa 7.4). Senza questa atmosfera controllata, il pH tenderebbe a salire o scendere, compromettendo la vitalità e la funzionalità delle cellule in coltura.

Insight: Ogni componente del mantenimento delle cellule ha un ruolo fondamentale:

- **Terreno di crescita completo (DMEM + 10% FBS + Pen/Strep 1X):** fornisce i nutrienti (glucosio, amminoacidi, sali) e i fattori di crescita (FBS) essenziali per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. La Penicillina/Streptomicina previene contaminazioni batteriche.
- **PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺):** tampone isotonic usato per lavare le cellule e rimuovere residui di terreno o sieri. L'assenza di ioni Ca²⁺ e Mg²⁺ facilita il distacco cellulare perché questi ioni stabilizzano le giunzioni cellulari.
- **Soluzione di tripsina-EDTA:** enzima proteolitico che rompe le connessioni tra le cellule e la matrice di adesione, consentendo di staccarle e passare a un nuovo contenitore (splitting).

Insight: La tripsina non è selettiva per le proteine di adesione, ma l'aggiunta dell'EDTA le rende i primi bersagli dell'enzima.

L'EDTA chela (lega) gli ioni Ca²⁺ e Mg²⁺, essenziali per la stabilità delle proteine di adesione (come integrine e cadherine). Senza questi ioni, le proteine perdono la loro integrità strutturale e si indeboliscono.

Questo le rende **più vulnerabili** all'azione proteolitica della tripsina, che quindi le taglia per prime, facilitando il distacco delle cellule dal substrato.

11.6 Procedura: Preparazioni

1. Etichettare due provette Falcon da 15 mL con “DMEM completo” e “HEK293T- β Catenina-HA”.
2. Disinfettare l’area della cappa a flusso laminare con etanolo al 70% e siglare i tubi necessari.
3. Osservare le cellule al microscopio invertito per controllare la morfologia e la confluenza.
4. Se la confluenza è superiore all’80-90%, procedere con lo splitting.

Perché: Quando la confluenza supera l’80-90%, le cellule iniziano a competere per spazio e nutrienti, il che può portare a stress cellulare, alterazioni morfologiche e perdita di vitalità. Effettuare lo splitting in questa fase mantiene le cellule in uno stato ottimale per la crescita e previene fenomeni di contatto-inibizione che ridurrebbero la loro capacità di proliferare.

11.7 Procedura: Preparazione terreno di coltura completo (5mL)

1. Utilizzando una pipetta sterile, prelevare:
 - 4.45mL di DMEM.
 - 0.5mL (500 μ L) di siero fetale bovino (FBS) per una concentrazione finale del 10%.
 - 50 μ L di soluzione Pen/Strep 100X per una concentrazione finale 1X.
2. Aggiungere nell’ordine: prima DMEM, poi FBS e infine Pen/Strep.
3. Miscelare delicatamente ruotando la provetta per garantire l’omogeneità della soluzione.
4. Tenere il terreno di coltura a 37°C o utilizzarlo subito per la semina delle cellule.

11.8 Procedura

1. Fase I: Splitting
 - Rimuovere il terreno di crescita con una pipetta sterile.
 - Aggiungere 3 mL di PBS 1X e lavare delicatamente le cellule per 10 secondi.
 - Aggiungere 1 mL di tripsina-EDTA e incubare 6 minuti a temperatura ambiente.
 - Osservare la distaccazione delle cellule al microscopio.
 - Aggiungere 4 mL di DMEM completo per neutralizzare la tripsina.
 - Risospendere con pipetta sierologia le cellule per singolarizzarle (volume totale 5ml: 1ml + 4ml DMEM) per evitare la formazione di aggregati cellulari.
 - Calcolare e prelevare il volume necessario per una diluizione 1:10, lasciando questo volume nella piastra.
 - Trasferire il resto della sospensione cellulare in un tubo Falcon da 15 mL.
 - Aggiungere 5 mL di DMEM completo alla piastra e mescolare delicatamente.
 - Incubare le piastre a 37 °C con 5% CO₂.
2. Procedere con la raccolta delle cellule (Fase II):
 - Etichettare 3 tubi Eppendorf e trasferirvi 1.3 mL di sospensione cellulare per tubo.
 - Centrifugare a 4 °C, 1000 rpm per 5 minuti.
 - Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 1 mL di PBS 1X.
 - Ripetere centrifugazione e lavaggio altre due volte.
 - Rimuovere accuratamente il surnatante e mantenere i pellet in ghiaccio.
 - Conservare i pellet a -80 °C per successive estrazioni proteiche.

Perché: Il **DMEM completo** neutralizza l’azione della tripsina grazie alla presenza del siero fetale bovino (FBS), che contiene inibitori naturali delle proteasi (ad esempio α -1-antitripsina). Questi inibitori bloccano l’attività proteolitica della tripsina, proteggendo le cellule e prevenendo un’eccessiva digestione delle loro proteine di membrana.

Insight: Dopo la raccolta e la conservazione a -80°C, le cellule non sono più vitali e non possono proliferare. Tuttavia, il loro contenuto (proteine, RNA, DNA) rimane integro e può essere recuperato per analisi biochimiche e molecolari.

11.9 Conclusioni

Questa procedura garantisce la vitalità e la purezza delle cellule *HEK293T* trasfettate, preparando il materiale biologico necessario per futuri esperimenti di lisi cellulare e analisi proteica. Il rispetto delle condizioni sterili e dei passaggi di lavaggio e splitting è fondamentale per mantenere l’affidabilità delle colture e prevenire contaminazioni.

12 Estrazione di proteine da cellule di mammifero

12.1 Introduzione

L'estrazione delle proteine da cellule di mammifero è un passaggio fondamentale per lo studio dell'espressione e della regolazione proteica. In questa esperienza, partendo dai pellet cellulari ottenuti dall'esperienza precedente, le cellule HEK293T vengono lisate per ottenere una frazione di proteine citosoliche. Il lisato proteico sarà poi utilizzato per preparare campioni destinati alla successiva analisi tramite **Western blot** (SDS-PAGE seguito da immunoblotting). A differenza di un'estrazione totale delle proteine (che includerebbe anche le frazioni nucleari e di membrana), questa procedura si focalizza sulla frazione citosolica. Un aspetto importante dell'esperienza è l'uso di un **buffer di lisi arricchito con inibitori di proteasi e fosfatasi**, per preservare l'integrità delle proteine e la loro fosforilazione durante l'estrazione.

Insight: La differenza tra un'estrazione "citoplasmatica" e una "totale" delle proteine sta nella forza del detergente usato e nelle condizioni del buffer. In questa esperienza si usa un **buffer delicato con Triton** che rompe solo la membrana plasmatica, rilasciando le **proteine citosoliche**. Le strutture intracellulari (nucleo, mitocondri, reticolo endoplasmatico) restano intatte, conservando le rispettive proteine al loro interno. Se invece volessimo fare un'estrazione "totale", servirebbero detergenti più forti (come SDS o NP-40) o l'uso di ultrasuoni per rompere anche questi compartimenti.

Perché è importante inibire le fosfatasi: Le fosfatasi rimuovono i gruppi fosfato dalle proteine, alterando il loro stato di fosforilazione. Poiché la fosforilazione regola l'attività, la stabilità e le interazioni delle proteine, impedirne la rimozione durante l'estrazione è essenziale per **preservare la forma funzionale e fisiologica delle proteine** come avviene in vivo.

12.2 Obiettivo

L'obiettivo dell'esperienza è ottenere lisati proteici citosolici dalle cellule HEK293T, mantenendo la loro integrità e preparare i campioni per le successive analisi di Western blot.

12.3 Strumentazione

- Cappa a flusso laminare
- Micropipette e puntali sterili
- Vortex
- Centrifuga refrigerata (4 °C)
- Ghiaccio

12.4 Soluzioni e reagenti

- **TRITON buffer:** buffer di lisi per rompere la membrana cellulare e liberare le proteine.
- **PP inhibitors:** mix di inibitori di proteasi e fosfatasi per prevenire la degradazione delle proteine durante l'estrazione.
- **LLS 5X** (*Laemmli Loading Sample Buffer 5X*): tampone di caricamento per la corsa elettroforetica.
- **Pellet cellulari (campioni e controllo negativo)** costituiti da:
 - pellets di cellule trasfettate con pcDNA3- β Catenin-HA (β Cat-HA)
 - controllo negativo (CTRL neg) con pcDNA3 vuoto

Perché si usa il Laemmli Loading Sample Buffer (LLS 5X):

Questo tampone di caricamento è essenziale per la preparazione dei campioni proteici destinati alla corsa su gel SDS-PAGE (vedi esperienze successive). Denatura le proteine, rompendo le strutture tridimensionali e uniformando la carica negativa grazie all'SDS. Il glicerolo aumenta la densità del campione, facilitando il caricamento nei pozzetti del gel. Infine, il bromofenolo blu permette di monitorare visivamente la corsa elettroforetica.

Criticità: È fondamentale mantenere il campione di cellule lisate a temperature prossime o sotto lo zero durante l'intero processo, perché la bassa temperatura rallenta l'azione delle proteasi e delle fosfatasi cellulari. Questi enzimi, se attivi, potrebbero degradare le proteine o rimuovere modifiche post-traduzionali importanti, come la fosforilazione, compromettendo così la qualità delle analisi successive.

12.5 Procedura

1. Preparazione dei campioni

- Recuperare 4 campioni contenenti i pellet cellulari:
 - 1 tubo contenente cellule di controllo negativo (campione trasfettato con plasmide vuoto).
 - 3 tubi contenenti cellule HEK293T trasfettate con pcDNA3- β Catenin-HA (campioni 2-4).

2. Preparazione del buffer di lisi TRITON

- Aggiungere 6 μ L della soluzione di inibitori PP (mix di inibitori di proteasi e fosfatasi) in un tubo contenente 1 mL di TRITON buffer.

3. Lisi delle cellule

- Aggiungere 60 μ L del TRITON buffer arricchito con inibitori in ciascun tubo contenente i pellet cellulari.
- Risospendere accuratamente i pellet usando una pipetta P200, evitando la formazione di bolle.
- (*Accorgimento: Per evitare bolle, settare la pipetta a 50 μ L e operare lentamente!*)
- Vortexare per pochi secondi, poi lasciare i tubi in ghiaccio per 10 minuti.
- Ripetere il passaggio di vortex e ghiaccio per garantire una completa lisi delle cellule.

4. Centrifugazione

- Centrifugare i campioni alla massima velocità per 20 minuti a 4 °C.
- Dopo la centrifugazione, i pellet con le frazioni insolubili (membrane, organelli) verranno scartati.

5. Raccolta del surnatante (lisato citosolico)

- Prelevare con attenzione il surnatante contenente le proteine citosoliche e trasferirlo in nuovi tubi Eppendorf etichettati come segue:
 - CTRL neg (Controllo negativo).
 - β Cat-HA (campioni 2-4).
- Questi saranno i **tubi per la raccolta del lisato proteico**.

6. Preparazione del campione per la corsa elettroforetica (Western blot)

- Etichettare altri 4 tubi Eppendorf (CTRL neg Wb e β Cat-HA Wb per i campioni 2-4).
- In ciascun tubo, aggiungere 20 μ L del lisato proteico (prelevato dal passo precedente).
- Aggiungere 5 μ L di LLS 5X buffer (*Laemmli Loading Sample Buffer 5X*) in ciascun tubo.
- Mescolare bene per ottenere un volume finale di 25 μ L.
- Centrifugare per 30 secondi alla massima velocità.
- Questi campioni sono pronti per essere analizzati con la tecnica Western Blot

7. Conservazione

- Conservare i campioni a -20 °C fino al momento dell'uso.

13 Elettroforesi SDS-PAGE e Western Blot

13.1 Introduzione

L'elettroforesi SDS-PAGE è una tecnica fondamentale per separare le proteine in base al loro peso molecolare. L'aggiunta dell'SDS denatura le proteine e conferisce loro una carica negativa proporzionale alla massa. Una volta separate, le proteine vengono trasferite su una membrana tramite il western blot, che permette di rilevare una specifica proteina grazie all'utilizzo di anticorpi.

13.1.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Principio della tecnica L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE) è una tecnica utilizzata per separare le proteine in base al loro peso molecolare. In presenza di un campo elettrico, le proteine migrano attraverso una matrice porosa (gel di poliacrilammide), permettendo una separazione efficiente delle diverse specie proteiche.

Ruolo dell'SDS e del BME Il tampone di caricamento contiene componenti che permettono la denaturazione delle proteine. Le due principali molecole coinvolte sono:

- **SDS (Sodium Dodecyl Sulfate):** è un detergente anionico che denatura le proteine rompendo le interazioni non covalenti responsabili della struttura secondaria e terziaria. Inoltre, si lega uniformemente alle catene polipeptidiche conferendo loro una carica negativa proporzionale alla massa, permettendo così una migrazione nel gel dipendente unicamente dal peso molecolare.
- **BME (β -mercaptoetanolo):** è un agente riducente che rompe i ponti disolfuro tra e all'interno delle catene polipeptidiche, facilitando l'ulteriore denaturazione. Il suo utilizzo è opzionale e viene impiegato quando si desidera separare completamente le subunità proteiche. In alcuni casi, come nelle analisi non riducenti, il BME può essere omissso per mantenere l'integrità dei legami disolfuro e preservare meglio la struttura quaternaria.

Struttura del gel: stacking e resolving Il sistema SDS-PAGE è un sistema a gel composto da due strati con proprietà distinte:

- **Stacking gel:** ha una bassa concentrazione di acrilammide (tipicamente 4%) e un pH più basso (6.8). La sua funzione è quella di concentrare le proteine in una banda sottile prima dell'ingresso nel gel di separazione.
- **Running gel (o resolving gel):** ha una maggiore concentrazione di acrilammide (tipicamente tra 8% e 15%) e un pH più alto (8.8). In questa sezione avviene la vera separazione delle proteine in base alla loro dimensione.

Perché il pH è basso nello stacking gel: Il pH 6.8 fa sì che la glicina del tampone sia in forma neutra e migri lentamente. Questo permette alle proteine di essere temporaneamente “comprese” tra ioni veloci (Cl^-) e lenti (glicina), concentrandosi in una banda sottile prima della separazione vera e propria.

Insight: La concentrazione di acrilammide nel resolving gel è un parametro critico. Gel a bassa percentuale (es. 8%) sono ideali per proteine di grandi dimensioni, che migrano lentamente e richiedono una matrice più porosa. Al contrario, gel più densi (12–15%) sono più adatti a proteine piccole, poiché offrono maggiore resistenza alla migrazione, migliorandone la separazione. La scelta corretta della percentuale è quindi fondamentale per ottenere una separazione ottimale.

Marker di peso molecolare Per stimare la massa delle proteine campione, viene caricato nel gel un *marker di peso molecolare*, ovvero una miscela di proteine standard con pesi molecolari noti. Confrontando la migrazione delle bande del campione con quelle del marker, è possibile determinare il peso molecolare apparente delle proteine analizzate.

13.1.2 Western Blot

Principio della tecnica Il Western Blot è una tecnica immunochimica che consente l'identificazione specifica di una proteina all'interno di un miscuglio complesso, dopo separazione tramite SDS-PAGE. Combina la risoluzione elettroforetica con il riconoscimento altamente selettivo da parte di anticorpi.

Trasferimento su membrana Dopo la corsa elettroforetica, le proteine separate nel gel vengono trasferite su una membrana (PVDF o nitrocellulosa) mediante applicazione di un campo elettrico perpendicolare al gel. Questo passaggio mantiene la disposizione delle proteine, rendendole accessibili all'interazione con anticorpi. Il corretto trasferimento può essere verificato osservando il marker o mediante colorazione reversibile (es. Red Ponceau).

Blocco e incubazione con anticorpi Per evitare legami aspecifici, la membrana viene incubata con una soluzione di blocco (es. MILK 5% in PBST) che satura i siti liberi. Successivamente, si aggiunge un **anticorpo primario** specifico per la proteina d'interesse, seguito da un **anticorpo secondario** che riconosce il primario ed è coniugato a un enzima (es. HRP, perossidasi).

Rilevazione del segnale Il segnale viene sviluppato tramite reazione chemiluminescente: il substrato dell'enzima produce luce quando trasformato. Questa luce viene rilevata tramite una camera CCD (es. Chemidoc). L'intensità delle bande rilevate è proporzionale alla quantità di proteina presente nel campione.

Insight: La **camera CCD** (Charge-Coupled Device) è un sensore in grado di rilevare anche luci molto deboli, come quella prodotta nella reazione di chemiluminescenza del Western Blot. Trasduce la luce in un segnale elettrico.

13.2 Obiettivo

Rilevare l'espressione di una proteina specifica (es. Beta-Catenina-HA), endogena o esogena, e valutarne i livelli di espressione o modificazioni post-traduzionali, tramite SDS-PAGE seguita da Western Blot.

13.3 Fasi dell'esperimento

L'esperimento si articola in tre fasi principali, ciascuna con un ruolo specifico nell'identificazione della proteina d'interesse:

- **Fase I – Separazione (SDS-PAGE):** Le proteine vengono denaturate, linearizzate e caricate su un gel di poliacrilammide. L'elettroforesi separa le proteine in base al loro peso molecolare, generando un profilo ordinato per dimensione.
- **Fase II – Trasferimento e immunodetection (Western Blot):** Le proteine separate vengono trasferite su una membrana PVDF. La membrana viene bloccata per prevenire legami aspecifici, poi incubata con anticorpi specifici: il primario riconosce la proteina target, il secondario permette la rilevazione.
- **Fase III – Rilevamento e analisi:** Il segnale generato dall'enzima coniugato all'anticorpo secondario produce luce (chemiluminescenza), che viene rilevata da una camera CCD. Le bande visibili sulla membrana indicano la presenza e l'abbondanza relativa della proteina di interesse.

13.4 Strumentazione

- Sistema per elettroforesi verticale
- Alimentatore per elettroforesi
- Termoblocco a 95°C
- Sistema per trasferimento proteine (blotting apparatus)
- CHEMIDOC per rilevamento chemiluminescenza
- Centrifuga da banco

13.5 Soluzioni e reagenti

Fase I – SDS-PAGE (preparazione gel e corsa elettroforetica)

- Soluzione di acrilammide al 40% (disponibile in commercio)
- Tampone Tris 1.5 M pH 8.8 (per resolving gel)
- Tampone Tris 1.0 M pH 6.8 (per stacking gel)
- SDS al 10%
- APS 10% (ammoniopersolfato) e TEMED (Tetramethylethylenediamine) – per la polimerizzazione
- Tampone di corsa (Running buffer): 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3

Fase II – Trasferimento e immunodetection (Western Blot)

- Tampone di trasferimento: 20 mM Tris, 152 mM glicina, 10% isopropanolo
- PBS pH 7.2 10X: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄
- Buffer di lavaggio: PBST 0.1% (PBS + Tween 20)
- Soluzione di blocco: latte scremato 5% in PBST 0.1%
- Anticorpi primario (anti-HA) e secondario (coniugato con HRP)

Fase III – Rilevamento del segnale

- Soluzione di sviluppo chemiluminescente: reagente A + B (da miscelare al momento in rapporto 1:1)
- Soluzione Red Ponceau (opzionale, per verifica visiva del trasferimento)

Insight: I reagenti A e B sono componenti di un sistema chemiluminescente utilizzato per rilevare le proteine nel Western Blot. Il **reagente A** contiene un substrato come il luminolo, mentre il **reagente B** include potenziatori della reazione (es. perossido di idrogeno). Quando miscelati, questi reagenti generano una reazione catalizzata dalla perossidasi (HRP) coniugata all'anticorpo secondario, producendo **luce visibile**. Questa luce viene poi catturata da una telecamera CCD, rendendo visibile la banda della proteina di interesse. La miscela va preparata al momento, perché la reazione si attiva subito ed è instabile nel tempo.

Il segnale è massimo entro i primi 5 minuti e tende a decadere rapidamente. È consigliabile rilevare l'immagine **subito dopo l'incubazione**, poiché dopo 15–30 minuti la luminescenza può risultare significativamente attenuata.

13.6 Procedura: Corsa elettroforetica (Fase I)

1. Preparazione del gel

- Preparare il *running gel* (8%, volume finale 10 mL) mescolando:
 - 5.3 mL di acqua
 - 2 mL di acrilammide
 - 2.5 mL di Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
 - 0.1 mL di SDS 10%
 - 0.1 mL di APS 10%
 - 0.005 mL di TEMED
- Versare circa 5 mL di running gel tra le lastre e ricoprire con 1 mL di isopropanolo.
- Attendere la polimerizzazione (15–20 minuti), poi rimuovere l'isopropanolo con carta da banco senza toccare il gel.
- Preparare lo *stacking gel* (volume finale 5 mL) mescolando:
 - 1.85 mL di acqua
 - 0.55 mL di acrilammide
 - 2.5 mL di Tris-HCl 1 M pH 6.8
 - 0.05 mL di SDS 10%
 - 0.05 mL di APS 10%
 - 0.005 mL di TEMED
- Versare 1–2 mL di stacking gel sopra il running gel polimerizzato e inserire il pettinino.
- Attendere la completa polimerizzazione del stacking gel (10–15 minuti).

2. Preparazione campioni

- Prelevare i campioni precedentemente preparati (estratto proteico + Laemmli buffer).
- Bollire i campioni a 95°C per 5 minuti (usando il termoblocco acceso durante la polimerizzazione).
- Centrifugare per 10 secondi alla massima velocità.

3. Corsa elettroforetica

- Caricare il gel da sinistra verso destra nel seguente ordine:
 - Standard per le proteine (Marker)
 - 12 µL di un campione controllo (EV)
 - 12 µL di un campione Beta-Catenin-HA (a scelta tra quelli preparati)
 - 12 µL di un campione Beta-Catenin-HA (controllo positivo fornito)
- Far correre il gel a 100V per circa 1.5 ore.

13.7 Procedura: Western Blot (Fase II)

1. Western blot

- Immergere il gel nel tampone di trasferimento.
 - (a) Polo positivo
 - (b) Carta da filtro Whatman 3 mm
 - (c) Membrana (PVDF o nitrocellulosa)
 - (d) Gel (dalla corsa SDS-PAGE)
 - (e) Carta da filtro Whatman 3 mm
 - (f) Polo negativo
- Avviare il trasferimento a 25V, 1A per 15 minuti.

- Verificare la buona riuscita del trasferimento sulla membrana PVDF (la colorazione 'Red Ponceau' può aiutare in questo step)

2. Blocco e immunodetection

- Incubare la membrana per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione lenta con **MILK 5% in PBST 0.1%** (soluzione di blocco), per saturare i siti aspecifici della membrana.
- Incubare per 1.5 ore a temperatura ambiente con l'**anticorpo primario**, diluito nella soluzione di blocco (su parafilm).
- Lavare la membrana **3 volte per 5 minuti** a temperatura ambiente, in agitazione, con il **buffer di lavaggio (PBST 0.1%)** per rimuovere l'anticorpo primario non legato.
- Incubare per 1 ora a temperatura ambiente con l'**anticorpo secondario**, anch'esso diluito nella soluzione di blocco (su parafilm).
- Lavare nuovamente la membrana **3 volte per 5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione con PBST 0.1%.

Insight: La **soluzione Red Ponceau** è una colorazione reversibile che permette di verificare visivamente il corretto trasferimento delle proteine sulla membrana. Viene applicata dopo il trasferimento e colorerà temporaneamente tutte le proteine presenti, rendendo visibili le bande. Può essere facilmente rimossa con lavaggi in acqua o PBS, senza interferire con i successivi passaggi di blocco o immunodetection.

Perché si usa MILK 5% come soluzione di blocco: Il latte scremato contiene proteine (soprattutto caseina) che si legano ai siti liberi sulla membrana PVDF, impedendo che gli anticorpi si leghino in modo aspecifico. Diluendo il latte al 5% in PBST 0.1%, si crea una barriera proteica che **riduce il background** e garantisce che gli anticorpi si leghino solo alla proteina di interesse, migliorando la qualità e la nitidezza del segnale nel Western Blot.

Insight: Nel Western Blot si usano due anticorpi per identificare e visualizzare la proteina di interesse:

- L'**anticorpo primario** si lega in modo specifico alla proteina target.
- L'**anticorpo secondario** si lega all'anticorpo primario.
- L'anticorpo secondario è coniugato a un enzima (come HRP) che, con i reagenti A e B, produce **luce visibile**.
- La luce emessa consente sia di **vedere la proteina** (presenza/assenza), sia di **valutarne la quantità** in base all'intensità del segnale.

Insight: La **soluzione di blocco** (latte 5% in PBST) serve a coprire i siti liberi sulla membrana per evitare che gli anticorpi si leghino in modo aspecifico. Questo riduce il background e rende il segnale più pulito e specifico.

13.8 Procedura: Rilevamento del segnale (Fase III)

1. Rilevamento del segnale

- Preparare soluzione di sviluppo (Reagente A + B, 1:1).
- Incubare la membrana 5 min.
- Acquisire l'immagine mediante CHEMIDOC.

2. Analisi dei dati

- Analizzare le bande visibili e quantificare l'intensità tramite software dedicato.
- Normalizzare rispetto al controllo interno, se presente.

13.9 Elettroforesi SDS-PAGE seguito da Western Blot

L'elettroforesi SDS-PAGE seguita dal Western blot è una tecnica combinata che consente di separare le proteine in base alla loro dimensione e successivamente identificarle in modo specifico con anticorpi. Questa esperienza mostra come visualizzare la presenza e la quantità di proteine target in un campione complesso, fornendo dati chiave per studi di espressione e regolazione proteica.

13.10 Cromatografia di affinità

La cromatografia di affinità è un metodo di purificazione proteica altamente selettivo, basato sull'interazione specifica tra la proteina di interesse e una matrice legata a ligandi specifici. Questa esperienza descrive come sfruttare queste interazioni per isolare una proteina target da un lisato cellulare, ottenendo un campione altamente purificato per studi successivi.

13.11 ICC (Immunocitochimica)

L'immunocitochimica (ICC) è una tecnica che permette di localizzare e visualizzare proteine specifiche direttamente all'interno delle cellule. Sfruttando anticorpi fluorescenti o enzimatici, questa esperienza mostra come ottenere un'immagine precisa della distribuzione intracellulare delle proteine, fornendo informazioni fondamentali per lo studio delle funzioni cellulari.