

Contents

1	Miniprep - Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina	3
1.1	Introduzione - Contesto	3
1.2	Obiettivo	3
1.3	Strumentazione	3
1.4	Soluzioni e reagenti	3
1.5	Procedura	4
1.6	Conclusioni	6
2	Estrazione dell RNA totale con TRIzol e Quantificazione	7
2.1	Introduzione - Contesto	7
2.2	Obiettivo	7
2.3	Strumentazione	7
2.4	Soluzioni e reagenti	7
2.5	Procedura	8
2.6	Conclusioni	10
3	Spettrometria di un campione di RNA totale	11
3.1	Introduzione	11
3.2	Analogie e diversità dei due strumenti	11
3.3	Interpretazione dei dati	11
3.4	Registrazione del bianco	11
4	Restrizione del DNA ed analisi elettroforetica	12
4.1	Introduzione	12
4.1.1	Tecniche e tecnologie utilizzate	12
4.1.2	Informazioni generali sull'enzima EcoRI	12
4.2	Obiettivo	12
4.3	Strumentazione e reagenti (digestione enzimatica)	13
4.4	Strumentazione e reagenti (gel elettroforesi)	13
4.5	Procedura per digestione del DNA	14
4.6	Procedura preparazione Gel Elettroforesi	15
4.7	Preparazione della corsa elettroforetica	16
4.8	Osservare il gel nel transilluminatore	16
4.9	Come interpretare l'analisi	16
5	Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
5.1	Principio di funzionamento	17
5.2	Obiettivo	17
5.3	Strumentazione	17
5.3.1	Il termociclatore	17
5.4	Soluzioni e altre sostanze	17
5.5	Procedimento	18
5.6	Programma termociclatore	18
5.7	Risultati attesi	18
5.8	Un'evoluzione della PCR: RealTime-qPCR	19
5.8.1	Che problema risolve RT-qPCR	19
5.8.2	Principio di funzionamento semplificato	19
5.8.3	Cenni Storici: La strada che ha portato allo sviluppo della RealTime-qPCR	19
6	Preparazione di terreno LB solido	20
6.1	Introduzione	20
6.2	Composizione del terreno LB solido	20
6.3	Obiettivo	20
6.4	Strumentazione e reagenti	20
6.5	Procedura	20

7	Preparazione di cellule competenti	21
7.1	Introduzione	21
7.2	Buffer utilizzati	21
7.3	Procedura	22
7.4	Linee guida generali per la preparazione di tamponi	22
8	Preparazione piastre per trasformazione batterica	23
8.1	Introduzione	23
8.2	Approfondimento su Piastra con Kan/Caf	23
8.3	Approfondimento su Piastra con Amp/IPTG/Xgal	23
8.4	Obiettivo	24
8.5	Procedura	24
8.6	Conclusioni	24
9	Trasformazione cellule competenti	25
9.1	Introduzione	25
9.2	Approfondimento tecnica blue-white screening	25
9.3	Obiettivo	26
9.4	Procedura	26
9.5	Conclusioni	26
10	Colony PCR	27
10.1	Introduzione	27
10.2	Obiettivo	27
10.3	Procedura	27
10.4	Conclusioni	27

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' → 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 isotonic (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 inserito), 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 inserito):** 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 inserito:** 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 inserito) 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 μL di acqua sterile per sciogliere la colonia
- 15 μL 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 μL 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 μL di PCR mix e trasferirli in due provette PCR nuove.
4. Aggiungere 5 μL 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.