

ESERCITAZIONE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

a) Minipreparazione di DNA plasmidico (GenElute HP Plasmid Miniprep Kit)

Indossare il camice e i guanti monouso

Razionale

Questo metodo si basa sulla lisi delle cellule in condizioni alcaline con conseguente denaturazione del DNA, seguita da rapida rinaturazione. Il cambiamento di pH del mezzo, previsto dalla procedura, determina la precipitazione dell'SDS legato alle proteine che a loro volta sono legate al DNA genomico batterico, invece il DNA plasmidico rinatura e resta in soluzione. A tal punto, il DNA plasmidico viene purificato mediante assorbimento su membrana di silice in adeguate condizioni di forza ionica. Le membrane di silice legano selettivamente sia RNA che DNA a diverso peso molecolare. In condizioni di alta forza ionica la presenza di sali sottrae acqua alle molecole di DNA che in queste condizioni sperimentali viene "catturato" dalla membrana di silice, mentre i contaminanti passano senza legarsi. La particolare membrana che usiamo in questa purificazione permette di eluire, mediante l'uso di tamponi a concentrazione salina media, molecole quali RNA, proteine, carboidrati e piccoli metaboliti, mentre con un tampone a concentrazione salina più bassa, viene eluito solo il DNA plasmidico.

*Procedura

NB: i punti 1 e 2 della procedura verranno eseguiti dal docente di riferimento

1. Risospendere accuratamente il sedimento (*pellet*) batterico con 200 μ L di *Resuspension Solution Buffer* contenente RNasi A (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 μ g/mL RNasi A).
2. Aggiungere 200 μ L di *Lysis Buffer* (Tampone di lisi alcalina: 200 mM NaOH, 1% SDS). Miscelare capovolgendo per 3-4 volte, non usare il vortex per evitare di frammentare il DNA cromosomale e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (non eccedere con il tempo di incubazione). **Nota:** questo passaggio provoca la denaturazione di DNA e proteine e la solubilizzazione delle membrane.
3. Aggiungere 350 μ L di *Neutralization Buffer* (Tampone di neutralizzazione: Potassio acetato, acido acetico, pH 4.8) **Nota:** questo passaggio consente la rinaturazione selettiva del solo DNA plasmidico. Mescolare per inversione 4-6 volte. Sedimentare i detriti cellulari mediante centrifugazione a 12.000

g per 10 minuti. Il DNA plasmidico rimane in soluzione, mentre il *pellet*, contenente pareti cellulari, complessi di DNA cromosomale e proteine denaturate viene scartato.

4. Assemblare la *genElute HP Miniprep binding Column* in un tubo per microcentrifuga. **Nota:** la colonna contiene la membrana di silice a cui si legherà il DNA plasmidico. Aggiungere 500 µL di *Column Preparation Solution* e centrifugare a 12.000 g per 1 minuto e allontanare il liquido dal tubo.

5. Trasferire il lisato chiarificato del punto 3 alla colonna e centrifugare 1 minuto a 12.000 g. Eliminare l'eluato che è filtrato attraverso la colonna (*flowthrough*).

6. Aggiungere 500 µL della soluzione di lavaggio *Wash Solution 1* alla colonna e centrifugare 1 minuto a 12.000 g. Allontanare il *flowthrough*.

7. Aggiungere 750 µL della soluzione di lavaggio *Wash Solution 2* (contenente etanolo 80%) alla colonna e centrifugare 1 minuto a 12.000 g. Allontanare il *flowthrough*.

8. Centrifugare a 12.000 g per 1 minuto e allontanare l'eccesso di etanolo. **Nota:** i lavaggi permettono di eliminare eventuali contaminanti quali RNA, proteine, carboidrati e piccoli metaboliti ancora presenti sulla membrana di silice.

9. Trasferire la colonna in un tubo pulito ed eluire il DNA plasmidico con 50 µL di *Elution buffer*. Centrifugare a 1.000 g per 1 minuto. Conservare il DNA plasmidico in ghiaccio.

N.B. Per l'utilizzo di qualsiasi apparecchio elettrico attenersi alle modalità d'uso e alle precauzioni che vi verranno indicate dal docente di riferimento.

***Le soluzioni utilizzate vanno maneggiate indossando gli opportuni dispositivi di protezione individuali in quanto contengono sostanze che potrebbero essere irritanti. Si rende comunque noto che le concentrazioni utilizzate, i volumi e i tempi di esposizione sono tali che l'entità del rischio è irrilevante per la salute.**

b) Verifica del clonaggio

Indossare il camice e i guanti monouso

Protocollo per la determinazione della presenza dell'inserto nel vettore plasmidico mediante analisi elettroforetica del DNA.

Razionale

La presenza dell'inserto d'interesse all'interno del vettore di clonaggio può essere verificata mediante idrolisi con enzimi di restrizione e successiva analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le distanze di migrazione elettroforetica di frammenti di DNA su gel di agarosio sono inversamente proporzionali alla loro peso molecolare (massa) e quindi alla loro lunghezza. Pertanto, l'analisi elettroforetica di frammenti di DNA di dimensioni non note permette di stabilirne le lunghezze, utilizzando come parametro la loro migrazione e come riferimento le distanze di migrazione di frammenti di DNA di lunghezza nota (*ladder*).

Materiale specifico occorrente:

- gel di agarosio (preparato dal personale del Dipartimento di Biologia preposto all'esercitazione di laboratorio). Nota: La concentrazione di agarosio in un gel dipenderà dalle dimensioni (lunghezza) dei frammenti di DNA da separare. Per il nostro esperimento useremo un gel di agarosio all'1%. Per prepararlo usiamo 1 g di agarosio per ogni 100 mL di tampone TAE 1X
- soluzione tampone per l'elettroforesi (Tampone TAE 1x: Tris-Acetato-EDTA).
- bagno termostato a 37°C.
- enzima di restrizione (RE).
- camera elettroforetica con relativo generatore di corrente.
- soluzione addensante (*Sample Buffer 10x*) contenente blu di bromofenolo e glicerolo, per il caricamento dei campioni nel gel di agarosio.

a) Idrolisi con enzima di restrizione

Il DNA plasmidico (600 ng) viene idrolizzato per 30' a 37°C con un enzima di restrizione (EcoRI) che riconosce 2 siti nel vettore di clonaggio a monte e a valle dell'inserto. La digestione viene effettuata nelle condizioni di pH e forza ionica suggerite dalla casa produttrice dell'enzima e utilizzando 1 unità di enzima per ogni idrolisi di restrizione. Un'unità di enzima di restrizione è definita come la quantità di enzima che digerisce 1 microgrammo di DNA a 37°C in 1 ora. Volume totale di digestione 20 microlitri (20 µL).

R	REAZIONE
Plasmide (100 ng/µL)	6 µL

H₂O	10 µL
Tampone di restrizione 10x	2 µL
Enzima EcoRI (0,5 u/µL)	2 µL
TOTALE	20 µL

b) Elettroforesi su gel d'agarosio

La migrazione dei campioni di DNA plasmidico tagliati enzimaticamente deve sempre essere confrontata con il DNA plasmidico non trattato enzimaticamente e con frammenti di DNA di peso molecolare noto (*markers, ladder, marcatore o standard* di peso molecolare). A tale scopo allestite il campione P1 contenente il plasmide da voi preparato e il campione P2 contenente il plasmide fornito dal laboratorio, non trattati enzimaticamente:

	P1	P2
Plasmide non trattato (100 ng/µl)	3 µL	3 µL
H₂O	17 µL	17 µL

Aggiungete al campione trattato (**R**) e a quelli non trattati (**P1** e **P2**), 2 µL di S.B. 10x (*Sample Buffer*). Il *Sample Buffer* è un tampone che contiene Blu di Bromofenolo che consente di seguire la corsa elettroforetica e glicerolo che aumenta la densità del campione da caricare. Al di sotto della camera elettroforetica, in corrispondenza dei pozzetti verrà posto un foglio nero per rendere maggiormente visibili i pozzetti e facilitare il caricamento dei campioni. Caricate un campione per pozzetto introducendo la punta della micropipetta nel pozzetto stesso ma avendo cura di non bucarne il fondo. Svuotate la punta lentamente ma con continuità.

Ordine di caricamento sul gel di agarosio

Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 4
Marker	P1	P2	Reazione (R)

Chiudete la camera elettroforetica con l'apposito coperchio, collegate gli elettrodi all'alimentatore in modo che il catodo (polo negativo) sia vicino ai pozzetti. Il DNA è carico negativamente e pertanto in queste condizioni migra verso l'anodo (polo positivo).

Si esegue la corsa elettroforetica a 100 Volt costanti per circa 30 minuti. Al termine della corsa il gel viene osservato al transilluminatore*

***Nota di sicurezza:** I raggi UV sono nocivi e si deve usare lo schermo protettivo e gli occhiali contro gli UV durante l'esame del gel sul transilluminatore.

Composizione del *Sample buffer* 10x:

Per 40.0 mL: Sciogliere 0.16 g di blu di bromofenolo in 20.0 mL di 1M Tris-HCl a pH 8.0 e 20.0 mL di 50% glycerol.

N.B. Per l'utilizzo di qualsiasi apparecchio elettrico attenersi alle modalità d'uso e alle precauzioni che vi verranno indicate dal docente di riferimento.