

## PROTOCOLLI SPERIMENTALI

### Parte 1: trasformazione batterica

Per effettuare la trasformazione batterica, ogni studente riceverà:

- la miscela di ligazione; si tratta della reazione di ligazione tra il plasmide pUC19 linearizzato con l'enzima di restrizione *EcoRI* e il gene dell'insulina, anch'esso tagliato con *EcoRI*.
- 200 µl di una sospensione di cellule di *E. coli* XL1Blue, rese competenti con un trattamento con  $\text{CaCl}_2$  e conservate a  $-80^\circ\text{C}$  (provetta da 1,5 ml).
- lasciare scongelare in ghiaccio le cellule competenti
- risospendere delicatamente le cellule con piccoli colpi delle dita sulla provetta
- siglare nuove provette con un pennarello *waterproof*: n. 1...4 per la trasformazione, + per il controllo positivo, - per il controllo negativo
- in ogni gruppo ogni studente aggiungerà alla provetta contenente le cellule:

1...4	10 µl di miscela di ligazione	
+	10 ml di vettore pUC19 (1 ng totale)	<b>controllo positivo</b>
-	10 ml di acqua	<b>controllo negativo (-DNA)</b>

- incubare in ghiaccio per 10 minuti
- trasferire in bagno termostato a  $37^\circ\text{C}$  per 5 minuti (fase di *heat shock*)
- porre per 1' in ghiaccio
- aggiungere sterilmente 800 µl di LB medium senza antibiotico
- incubare in termostato a  $37^\circ\text{C}$  per 15 minuti (tempo di espressione del gene *amp<sup>R</sup>*)

Nel frattempo, ogni studente aggiungerà alla propria piastra 60 µl di una miscela già pronta di IPTG e X-gal, così composta: 40 µl di IPGT 20 mg/ml e 20 µl di Xgal 40 mg/ml .

- distribuire la miscela in modo uniforme sulla superficie della piastra, utilizzando l'apposita spatola sterile
- trascorsi i 15 minuti di incubazione delle cellule, ciascun gruppo procede a piastrare (sulle piastre con l'antibiotico ampicillina) rispettivamente:
  - 100 µl / 200 µl di cellule trasformate con la miscela di ligazione
  - 100 µl di cellule trasformate con acqua (controllo negativo, senza DNA)
  - 100 µl di cellule trasformate con 1 ng di pUC19 (controllo positivo)
- distribuire le cellule in modo uniforme sulla piastra utilizzando l'apposita spatola sterile
- capovolgere le piastre (per evitare che in termostato la condensa cada sulle cellule) e incubarle in termostato a  $37^\circ\text{C}$  *overnight*

### Allestimento di una mini-coltura batterica

Sulle piastre che contengono ampicillina, dopo trasformazione, sono cresciute colonie bianche (plasmide ricombinante) e colonie blu (plasmide o non ricombinante).

Per estrarre il DNA plasmidico dalle colonie bianche trasformate con vettore ricombinante ed analizzare la corretta inserzione del gene, è necessario prima allestire una mini-coltura batterica in terreno liquido, in modo da ottenere un numero di cellule più elevato che non quello di una colonia batterica, da cui estrarre il plasmide.

Allestimento della coltura batterica in una provetta *eppendorf*:

- mettere 0,5 ml di terreno di coltura con ampicillina in una provetta *eppendorf* da 1,5 ml
- identificare una colonia batterica bianca e con uno stuzzicadenti sterile prelevarla, inserendo lo stuzzicadenti verticalmente nella colonia
- stemperare la colonia batterica nel terreno di coltura
- chiudere la *eppendorf* e incubare *over night* a  $37^\circ\text{C}$ .

## Parte 2: analisi dell'inserto

### Estrazione del DNA

- con un pennarello scrivere una sigla identificativa sulla provetta con la mini-coltura batterica e su una provetta vuota; prelevare 200 µl di coltura batterica e trasferirli nella provetta vuota;
- centrifugare una delle due provette per 3 minuti a 13 Krpm (cioè 13.000 rivoluzioni per minuto) ed eliminare il surnatante in un *becker*; la provetta va poi fatta sgocciolare sulla carta assorbente
- risospendere il *pellet* con 530 µl di soluzione A già addizionata con 1µl di proteinasi K
- miscelare con la micropipetta per risospendere le cellule
- addizionare 25 µl della soluzione di lisozima
- miscelare per inversione (5 x)
- incubare per 5 minuti a 95°C in un termostato a secco
- centrifugare 5 minuti a 13 Krpm
- eliminare il *pellet* (usando uno stuzzicadenti)

### Precipitazione del DNA e digestione con un enzima di restrizione

- al surnatante addizionare 450 µl di isopropanolo
- "vortexare"
- centrifugare 3 minuti a 13 Krpm, eliminare il surnatante
- addizionare 400 µl etanolo 70%
- centrifugare 3 minuti a 13 Krpm, eliminare il surnatante
- asciugare pellet in essiccatore a vuoto
- risospendere con 25 µl TE + RNasi A (che degrada l'RNA)
- "vortexare"
- aggiungere 5 µl di una miscela con l'enzima di restrizione *Bam*HI e il suo tampone
- incubare 10 minuti a 37°C

### Preparazione del gel di agarosio

- Preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di "nastro adesivo di carta" e inserire il pettine
- verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia "a bolla"
- misurare 30 ml di tampone TBE 1x in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 0,60 gr di agarosio
- pesare la beuta contenente la soluzione di agarosio e segnare il peso sul protocollo
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde, agitando di tanto in tanto
- pesare la soluzione di agarosio (l'acqua del tampone, bollendo, è evaporata!) e riportare la soluzione di agarosio al peso originale, utilizzando una spruzzetta con H<sub>2</sub>O distillata. Attenzione: far cadere l'acqua delicatamente, facendola scivolare lungo i bordi della beuta, altrimenti si formano delle bolle
- versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi. I pozzetti si formano quando, una volta solidificato il gel, viene tolto il pettine
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella
- versare il tampone TBE 1x nella camera di corsa (servono circa 250 ml), evitando che si formino bolle, fino a coprire completamente il gel. Se si formano bolle, toglierle con la punta di una pipetta Pasteur
- togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolari rispetto al gel

### Corsa elettroforetica

- aggiungere 2  $\mu$ l del DNA digerito a ciascuna provetta contenente il loading dye 6x e risospendere con la micropipetta, evitando di formare bolle. Il glicerolo presente nel *loading dye* serve per rendere piú densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e quindi a facilitarne l'entrata nel pozzetto
  - se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga eppendorf (in gergo di laboratorio, si dice "spinnare" da *spin*, centrifugare)
  - caricare lentamente ciascun campione (8  $\mu$ l) nei singoli pozzetti, ponendosi con la punta della micropipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolare rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
  - collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli al *power supply*; il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo
  - fissare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per 30 min circa
- Controllare la posizione delle bande accendendo la lampada "bright blue" sotto la cassetta del gel.

### Risultati della corsa elettroforetica

- 1: prodotti di digestione di un plasmide con gene inserito in modo corretto
- 2: prodotti di digestione di un plasmide con gene inserito in modo non corretto
- 3 – 9: prodotti di digestione ottenuti dagli studenti
- L: peso molecolare (Ladder)

