

# Corso di Laurea in Biotecnologie

Laboratori Didattici di Regolazione Genica

Docente: Prof. Mariangela Pucci

A.A. 2023/2024

Le attività di laboratorio avranno come obiettivo finale la quantificazione dell'espressione del gene codificante il recettore cannabico di tipo 1 CNR1 in cellule eucariotiche mediante Real-Time PCR.

Le attività saranno suddivise in due giornate:

## GIORNO 1:

- Estrazione RNA da pellet cellulare mediante TRIzol® Reagent.
- Dosaggio dell'RNA estratto mediante tecnica spettrofotometrica.
- Valutazione qualitativa dell'RNA estratto mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio.

## GIORNO 2:

- Sintesi di DNA complementare (cDNA) mediante reazione di trascrizione inversa.
- Quantificazione dell'espressione del gene di nostro interesse mediante la tecnica di Real Time PCR.
- Disegno di Primers specifici per il gene di interesse.

## GIORNO 1

### 1. ESTRAZIONE RNA

#### Reagenti:

- TRIzol® Reagent
- Cloroformio
- Isopropanolo 100%
- Etanolo 75% in H<sub>2</sub>O Nuclease Free



Volume Finale 50 mL

#### **Volume di Etanolo?**

- H<sub>2</sub>O Nuclease Free

#### Materiali e Strumenti:

- Pennarello Indelebile
- Tubi da 1,5 mL
- Micropipette (10-100 µl; 20-200 µl; 200-1000 µl)

- Puntali (20-200 µl; 200-1000 µl)
- Centrifuga Refrigerata a 4°C
- Vortex
- Cappa Chimica
- Termoblock

### 1.1 OMOGENIZZAZIONE DEL CAMPIONE

In questa fase si lavora sotto cappa chimica, in quanto il TRIzol® contiene fenolo, tossico e corrosivo, e guanidina isotiocianato, irritante. Lavorare sempre indossando un camice da laboratorio e guanti.

- **1.1.1** Con una micropipetta da 200-1000 µl prelevare 500 µl di TRIzol® e aggiungerli al tubo da 1,5 mL contenente il pellet cellulare.
- **1.1.2** Mediante uso del vortex, promuovere la disgregazione del pellet e quindi la lisi cellulare.
- **1.1.3** Lasciare il campione omogenizzato a temperatura ambiente per 5 minuti in modo da permettere la completa dissociazione del complesso nucleoproteico

### 1.2 SEPARAZIONE DI FASE

Anche in questa fase è necessario lavorare sotto cappa, in quanto verrà fatto uso di Cloroformio, irritante e tossico.

- **1.2.1** Con una micropipetta da 20-200 µl, aggiungere 100 µl di Cloroformio al nostro campione

**NB:** In questo step è necessario **AVVINARE** il puntale, cioè aspirare e buttar giù il cloroformio più volte fino a quanto tutto il volume sarà trattenuto dal puntale. Ciò serve a poter trattenere una soluzione idrofobica in un puntale idrofilico

- **1.2.2** Una volta chiuso il tubo da 1,5 mL, agitarlo vigorosamente a mano per 15 secondi.
- **1.2.3** Lasciare il campione a temperatura ambiente per 10 minuti.
- **1.2.4** Completata l'incubazione, disporre il campione nella centrifuga refrigerata e centrifugare a 12000xg per 10 minuti.
- **1.2.5** Durante la centrifugazione, siglare un tubo da 1,5 mL nuovo con pennarello indelebile e portarlo con sé sotto cappa.
- **1.2.6** Terminata la centrifuga, con una pipetta da 20-200 µl recuperare la fase acquosa inclinando di circa 45° il tubo contenente il campione e disporla nel tubo nuovo appena siglato.



**FARE ATTENZIONE A NON ASPIRARE L'INTERFASE O LA FASE ORGANICA.**

### 1.3 ISOLAMENTO RNA

In questa fase si può lavorare fuori cappa, ognuno nella sua postazione.

- **1.3.1** Con una pipetta da 200-1000 µl aggiungere 250 µl di isopropanolo al 100% alla fase acquosa appena recuperata.
- **1.3.2** Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
- **1.3.3** Centrifugare a 12,000xg per 10 minuti a 4°C.

**NB** L'RNA è spesso invisibile prima della centrifugazione e forma un pellet gelatinoso sul fondo ed al lato del tubo.

### 1.4 LAVAGGIO RNA

- **1.4.1** Terminata la centrifuga, con una pipetta da 20-200 µl rimuovere il surnatante dal tubo agendo sulla parete opposta alla cerniera e facendo attenzione a non toccare il pellet.
- **1.4.2** Lavare il pellet aggiungendo 500 µl di etanolo al 75% con una pipetta da 200-1000 µl.
- **1.4.3** Vortexare il tubo brevemente
- **1.4.4** Centrifugare il campione a 7500xg per 5 minuti a 4°C
- **1.4.5** Terminata la centrifuga, con una pipetta da 20-200 µl rimuovere il surnatante dal tubo agendo sulla parete opposta alla cerniera e facendo attenzione a non toccare il pellet.
- **1.4.6** Far asciugare il pellet sotto cappa per 5-10 minuti

**NB** Fare attenzione a non lasciare asciugare completamente l'RNA, perché il pellet potrebbe perdere solubilità.

### 1.5 RISOSPENSIONE RNA

- **1.5.1** Risospendere l'RNA aggiungendovi 25 µl di H<sub>2</sub>O nuclease-free
- **1.5.2** Disporre il tubo nel termoblock a 60°C per 15 minuti
- **1.5.3** Terminata l'incubazione, spinnare (centrifugare brevemente ad alta velocità) i campioni e disporli in ghiaccio.

## 2. DOSAGGIO RNA ALLO SPETTROFOTOMETRO

#### Reagenti:

- H<sub>2</sub>O nuclease free
- Tubo con RNA estratto nello step 1

#### Materiali e Strumenti:

- Spettrofotometro UV-VIS
- Cuvetta di quarzo
- Micropipette
- Puntali

### LEGGE DI LAMBERT-BEER

Dalla misura della luce assorbita ad una determinata  $\lambda$  si può risalire alla concentrazione della molecola in esame. Si tratta di una determinazione assoluta, che si basa sulla relazione esistente tra concentrazione e assorbanza.

$$\text{Log } I_0/I = \epsilon c l$$

$I_0$ : l'intensità della luce incidente

$I$ : intensità della luce trasmessa

$\epsilon$ : coefficiente di estinzione molare (per DNA e RNA si usa

il coefficiente di estinzione specifico  $K$ ,

$K$  esprime l'assorbanza di una soluzione a

concentrazione **1mg/ml** alla lunghezza d'onda di 260 nm

$K = 21$  per DNA nativo a doppio filamento

$K = 23$  per DNA denaturato a singolo filamento

$K = 25$  per RNA

$C$ : concentrazione della specie assorbente (mol/l)

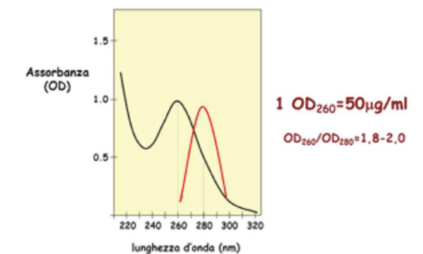
$l$ : percorso ottico (cm)

$1A_{260}$  di DNAds = 50 µg/ml

$1A_{260}$  di RNA = 40 µg/ml

L'espressione  $\text{Log } I_0/I$  viene detta assorbanza (A) o densità ottica (OD)

Spettro di assorbimento del DNA



- **2.1** Accendere lo spettrofotometro almeno 15 minuti prima dell'utilizzo.
- **2.2** Sullo strumento impostare la lunghezza d'onda alla quale è necessario lavorare, 260 e poi 280 nm.
- **2.3** Lavare la cuvetta con H<sub>2</sub>O bidistillata evitando di toccare le superfici che verranno attraversate dalla luce
- **2.4** Tarare lo strumento a zero di assorbanza (fare "il bianco") caricando nella cuvetta 100 µl di H<sub>2</sub>O con la quale abbiamo risospeso il nostro RNA nello step 1.5.1
- **2.5** In un tubo da 1,5 mL nuovo diluire il campione di 50 volte.



Sapendo che il Volume Finale nella cuvetta dovrà essere di 100 µl, quanti microlitri di RNA dovranno essere prelevati?

**V RNA ?**

**V H<sub>2</sub>O ?**

- **2.6** Trasferire il campione diluito nella cuvetta di quarzo

- 2.7 Disporre la cuvetta nello spettrofotometro ed effettuare la lettura a 260 nm e 280 nm, appuntarsi i valori di assorbanza.



- 2.8 Calcolare la concentrazione di RNA sapendo che 40 µg/mL di RNA, letto a 260 nm utilizzando una cuvetta con cammino ottico di 1 cm, ha un valore di assorbanza pari a 1,00
- 2.9 Determinare la purezza del campione di RNA calcolando il rapporto 260/280 (per RNA deve essere pari a 2) e 260/230 (deve essere pari a 2.2)

Campione	$\lambda_{260}$	$\lambda_{280}$	260/280	Concentrazione

### 3. CORSA ELETTROFORETICA

#### Reagenti:

- Agarosio
- TAE 50X
- TAE 1 X
- H2O bidistillata
- Nucleic Acid Gel Stain GelRed 10000X
- Loading dye Orange G
- Marker di peso molecolare (Ladder)

#### Materiali e Strumenti:

- Cella Elettroforetica
- Alloggiamento per gel (slitta o lettino)
- Pettini per creare i pozzetti
- Generatore di corrente
- Micropipette
- Puntali
- Transilluminatore UV
- Microonde
- Bilancia di precisione
- Navicella per pesata
- Beuta

### 3.1 PREPARAZIONE TAMPONE TAE 1X



- 3.1.1 A partire da una soluzione concentrata 50X, preparare un litro di tampone TAE 1X.

**V TAE 50X?      V H<sub>2</sub>O BD?**

- 3.1.2 Versare parte del Tampone nella cella elettroforetica

### 3.2 PREPARAZIONE GEL DI AGAROSIO ALL'1%

- 3.2.1 Preparare un gel di agarosio all'1% in un volume finale di 100 mL.



**Quanti grammi di Agarosio sarà necessario pesare?**

- 3.2.1 Accendere la bilancia di precisione.
- 3.2.2 Disporre sulla bilancia una navicella da pesata ed effettuare la tara
- 3.2.3 Pesare l'agarosio
- 3.2.4 Disporre l'agarosio appena pesato in una beuta di vetro e scioglierlo in 100 ml di TAE 1X in microonde fino ad ottenere una soluzione completamente limpida.
- 3.2.5 Aspettare qualche secondo ed aggiungere il GelRed.



La soluzione madre di GelRed è concentrata 10000X.

Nel nostro Vf di 100 mL, il GelRed deve essere concentrato 1X

Quanto GelRed va aggiunto?

- 3.2.6 Una volta aggiunto il GelRed, versare rapidamente il gel nella slitta con inserito il pettine e lasciare polimerizzare a temperatura ambiente per 15-20 minuti.
- 3.2.7 Terminata la polimerizzazione, rimuovere il pettine e disporre la slitta con il gel nella vaschetta elettroforetica assicurandosi che sia coperto completamente dal tampone di corsa.

### 3.3 CORSA DEI CAMPIONI

- 3.3.1 Nel primo pozzetto del gel caricare 5 µl di marcatore di dimensioni.
- 3.3.2 In un tubo da 0,2 mL preparare una mix con 5 µl di Orange G e 5 µl di RNA e caricarla nel pozzetto immediatamente successivo al marcatore.
- 3.3.3 Chiedere il coperchio della cella elettroforetica e collegare gli elettrodi al generatore.
- 3.3.4 Effettuare la corsa a 80mV per almeno 15-20 minuti.

### **3.4 VISUALIZZAZIONE DEI CAMPIONI.**

- **3.4.1** Terminata la corsa spegnere il generatore, e rimuovere la slitta con il gel dalla camera elettroforetica
- **3.4.2** Disporre il gel su un transilluminatore UV e visualizzare i campioni. Dovranno essere visualizzate le bande corrispondenti alle 3 subunità ribosomiali 5S, 18S e 28S.

**NB** Limitare l'esposizione ai raggi UV.

# Corso di Laurea in Biotecnologie

Laboratori Didattici di Regolazione Genica

Docente: Prof. Mariangela Pucci

A.A. 2023/2024

Le attività di laboratorio avranno come obiettivo finale la quantificazione dell'espressione del gene codificante il recettore cannabico di tipo 1 CNR1 in cellule eucariotiche mediante Real-Time PCR.

Le attività saranno suddivise in due giornate:

## GIORNO 1:

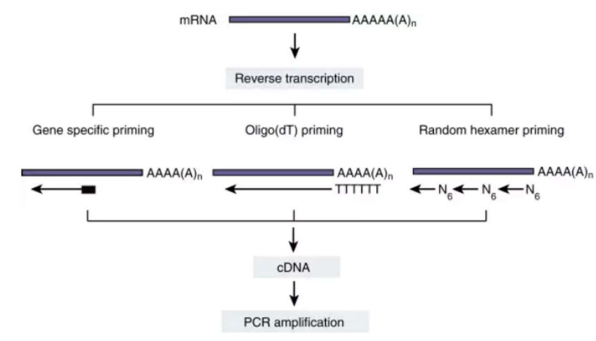
- Estrazione RNA da pellet cellulare mediante TRIzol® Reagent.
- Dosaggio dell'RNA estratto mediante tecnica spettrofotometrica.
- Valutazione qualitativa dell'RNA estratto mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio.

## GIORNO 2:

- Sintesi di DNA complementare (cDNA) mediante reazione di trascrizione inversa.
- Quantificazione dell'espressione del gene di nostro interesse mediante la tecnica di Real Time PCR.
- Disegno di Primers specifici per il gene di interesse.

## GIORNO 2

### 1. RETROTRASCRIZIONE



### Reagenti:

- Campione di RNA estratto il giorno 1
- Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer
- Random Hexamer Primer
- M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/ul) (RT)
- RiboLock RNase Inhibitor (20u/ul) (RNAase Inhib)
- 5X Reaction Buffer (RB 5X)
- 10 mM dNTPs Mix
- H<sub>2</sub>O, nuclease-free

### Materiali e Strumenti:

- Pennarello Indelebile
- Tubi da PCR 0.2 mL, sterili nuclease-free
- Micropipette (10-100 µl; 20-200 µl; 200-1000 µl)
- Puntali (20-200 µl; 200-1000 µl)
- Minicentrifuga da banco
- Termociclatore

### 1.1 PREPARAZIONE MIX A

- 1.1.1 Con un pennarello indelebile, siglare il tubo da PCR 0.2 mL sterile.
- 1.1.2 Nel tubo da PCR appena siglato aggiungere i seguenti reagenti:

REAGENTI	RNA DA RETRO	VOLUME
Campione di RNA	100 ng	?
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer		1 ul
Random Examer Primer		1 ul
H <sub>2</sub> O nuclease free		?

VOLUME FINALE		12 ul
---------------	--	-------

- 1.1.3 Mixare delicatamente tutti i componenti della reazione.
- 1.1.4 Incubare i campioni nel termociclatore a 65°C per 5 minuti.

### 1.2 PREPARAZIONE MIX B

- 1.2.1 Terminata l'incubazione a 65°C, riprendere i campioni dal termociclatore.
- 1.2.2 Aggiungere i seguenti reagenti:

REAGENTI	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME
5X Reaction Buffer	1X*	?
RNase Inhibitor		1 ul
Reverse Transcriptase		1 ul
10 mM dNTPs MIX		2 ul
<b>VOLUME FINALE</b>		<b>8 ul</b>

\* da considerare il V finale complessivo di 20 uL

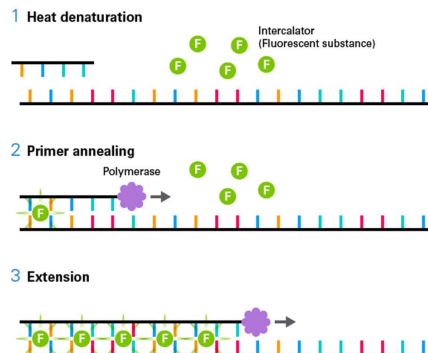
- 1.2.3 Mixare delicatamente tutti i componenti della reazione.
- 1.2.4 Spinnare i campioni: metterli nella microcentrifuga e centrifugarli ad alta velocità per pochi secondi in modo da raccogliere tutti i componenti del mix di reazione sul fondo del tubo.
- 1.2.5 Disporre i campioni nel termociclatore ed avviare il programma.

Il programma impostato sul termociclatore è il seguente:

- 65°C – pausa
- 65°C – 5 minuti → Mix A
- 4°C – pausa
- 25°C-pausa
- 25°C- 5 minuti → Mix B
- 42°C- 60 minuti
- 70°C- 5 minuti
- 4°C – pausa

- 1.2.6 Terminata la retrotrascrizione, rimuovere i campioni dal termociclatore e diluirli 1:2
- 1.2.7 Una volta diluiti, i campioni possono essere impiegati per la reazione di Real-Time PCR o conservati a -20°C.

## 2. REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION



### Reagenti:

- cDNA
- 2X SYBR Green Mix
- Primer Forward 10 uM
- Primer Reverse 10 uM
- H<sub>2</sub>O nuclease free

### Materiali e Strumenti:

- Tubi da PCR 0.2 mL, sterili nuclease-free
  - Micropipette (10-100 µl; 20-200 µl; 200-1000 µl)
  - Puntali (20-200 µl; 200-1000 µl)
  - Real-Time PCR
- 2.1 Con un pennarello indelebile, siglare un tubo da PCR 0.2 mL sterile nuovo
- 2.2 Nel tubo da PCR appena siglato aggiungere i seguenti reagenti:

REAGENTI	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME
cDNA		2 ul
2X SYBR Green Mix	1X	?
Primer forward 10 uM	400 nM	?
Primer reverse 10 uM	400 nM	?
H <sub>2</sub> O nuclease free		?
<b>VOLUME FINALE</b>		<b>20 ul</b>

**NB: Dovranno essere preparate 2 mix di reazione: nella prima verranno aggiunti i primer per il gene housekeeping B-Actina mentre nella seconda quelli per il gene di interesse CB1.**

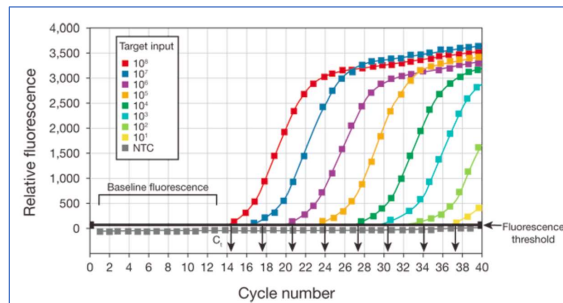
- 2.3 Spinnare i tubi, introdurli nello strumento ed avviare il seguente programma:

### 3.4 qRT-PCR

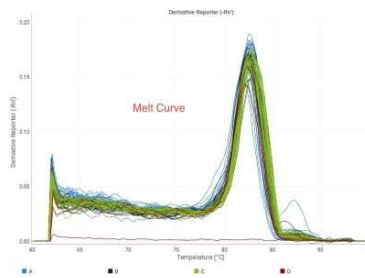
Set up the following PCR program on an RT-PCR instrument:

1. 95 °C	5 min	
2. 95 °C	10 s	} >40 cycles
3. 55/60 °C (see Note 15)	30 s	
4. 72 °C	30 s	
5. 72 °C	5 min	
6. Melting curve (Fig. 3a): from 65 to 95 °C read every 0.5 °C and hold 00:00:02 (see Note 16)		
7. 4 °C pause		

- 2.4 Al termine della reazione visualizzare l'amplification plot:



E la melting curve:



- 2.5 Mediante estrapolazione dei C<sub>t</sub>, effettuare l'analisi quantitativa attraverso quantificazione relativa:

	Target gene C <sub>t</sub>	Internal control average C <sub>t</sub>
Sample Y	27.4	15.2
Sample X	28.9	15.6
Sample Y Δ C <sub>t</sub>	27.4 - 15.2 = 12.2	
Sample X Δ C <sub>t</sub>	28.9 - 15.6 = 13.3	
Sample Y Δ Δ C <sub>t</sub>	12.2 - 13.3 = -1.1	
Sample X Δ Δ C <sub>t</sub>	13.3 - 13.3 = 0	
	Comparative expression level	
Sample Y	2 <sup>-(ΔΔC<sub>t</sub>)</sup> = 2.1	
Sample X	2 <sup>-(ΔΔC<sub>t</sub>)</sup> = 1	