



SCHEDA del LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE e BIOTECNOLOGIE RICOMBINANTI (Prof. Maurizio Trovato)

Enzimi di restrizione, trasformazione e PCR

Giorno -1.

Preparazione Inoculo (Questo passaggio sarà fatto dall'esercitatore).

Crescita overnight DH5 α (pGEM-P5CS1) e pENTRY (S6K1)

Giorno 1: Introduzione e spiegazione attività laboratorio. Estrazione di DNA plasmidico (circa 3 ore e 30 minuti)

1. Centrifugare a 13000 rpm per 2 min 1.5 ml di coltura
2. Eliminare il supernatante e risospendere in 100 μ l di TE
3. Aggiungere 200 μ l di tampone di lisi e invertire finchè la soluzione non chiarifica e diventa viscosa (5' max.!).
4. Aggiungere 350 μ l di acetato di K 3M freddo e incubare in ghiaccio 10'
5. Centrifugare 15' a 13000 rpm e trasferire il supernatante in una nuova eppendorf sterile da 1.5 ml
6. Aggiungere 0,7 volumi di isopropanolo. Invertire delicatamente per qualche minuto. 10' a 4°C
7. Centrifugare 10' a 13000 rpm
8. Eliminare l'isopropanolo, risospendere il pellet in 100 μ l di 100 μ g/ml RNasi in TE ed incubare a R.T. (o 37 °C) per 15'
9. Portare a 0.3M di NaAc , aggiungere 1 vol di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico. Vortex 1'. Centr. 3' a 13000 rpm (Questo passaggio sarà fatto dall'esercitatore)
10. Prelevare solo la fase superiore e trasferirla in una eppendorf da 1.5 ml^[1]
11. Precipitare con 2 volumi di etanolo 96% (aspettare per 30' a -80°) [fare gel]
12. Centrifugare 15' a 14000 xg a +4° (minimo 15' a R.T.)
13. Lavare con EtOH 70% freddo, spin down 13000 rpm x 5', eliminare l'etanolo e seccare all'aria x 5'.
14. Risospendere il campione in 50 μ l di H₂O

<i>Tampone di risospensione</i>	TE	(Tris HCl 10 mM(pH=8.0), EDTA 1mM)
<i>Tampone di lisi</i>		NaOH 0.2M , SDS 1 %
<i>Tampone di rinaturazione*</i>		K Acetato 3M

Preparazione Gel 1% Agarosio per Elettroforesi

Preparare l'apparato elettroforetico

Pesare 0,4 grammi di Agarosio. Inserire 0,4 grammi di Agarosio in 40 ml di TAE 1X

Scaldare a microonde fino a portare ad ebollizione

Far raffreddare fino a 65°C

Aggiungere 1,5 μ l di bromuro di etidio, mescolare e versare nell'apposito apparato

Corsa elettroforetica

Preparare i campioni per l'elettroforesi aggiungendo 10 µl di plasmide + 1 µl di loading buffer inserire i campioni + il marcatore di peso molecolare nei diversi pozzetti del gel e avviare la corsa elettroforetica a 100 V per circa 15-20 minuti

Fare correre 1 gel e visualizzare risultati (con occhiali di protezione).

Giorno 2: Trasformazione DNA. Purificazione DNA plasmidico. Quantificazione con Nanodrop (a cura dell'esercitatore con qualche osservatore). Digestione con enzimi di restrizione. (circa 3 ore e 30 minuti)

Trasformazione

1) In una eppendorf da 1,5 ml mettere nell'ordine:

- 70 µl H₂O
- 10 µl plasmide
- 20 µl KCM 5X (freddo)
- 100 µl cellule competenti (le trovate già scongelate in ghiaccio)

2) Lasciare in ghiaccio per 20'

3) Lasciare a RT per 10'

3) Aggiungere 400 µl di LB

4) Mettere a 37 °C per 45'

5) Piastrare su Km (In questo modo verranno contro-selezionati tutti i costrutti pUC)

6. Incubare o.n. a 37°C

Purificazione DNA con silice/NaI

1. Aggiungere 150 µl NaI alla soluzione plasmidica e mescolare bene invertendo il tubo
2. Aggiungere 10 µl alla miscela, mescolare bene ed incubare 2 min a R.T.
3. Centrifugare 15" a 16.000 x g e levare bene il super
4. Lavare con soluzione E agitando vigorosamente
5. Ripetere punti 3 e 4
6. Centrifugare 15" a 16.000 x g e levare bene il super
7. Centrifugare a vuoto altri 15" ed eliminare le ultime tracce di liquido
8. Risospendere in 5-30 µl di H₂O ster. Ed incubare a 70 °C per 2'
9. Centrifugare 2' a 16.000 x g e trasferire l'eluato in un tubo nuovo.

Soluzione E

(Etanolo 50%, 10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)

Digestione con enzimi di restrizione

In due digestioni separate digeriamo 500 ng di pGEM-P5CS1 e 500 ng di pENTR(S6K1) con EcoRI/XbaI (in due digestioni separate x 15 minuti a 37°C (con enzimi Fast). Preparazione della reazione.

pUC18 [100 ng/µl]

pENTR(S6K1) [0.2 µg/ml]

DNA = X µl

Buffer digestione 10X 2.5 µl

EcoRI* 1 µl

XbaI** 1 µl

Volume finale µl 20

Digerire a 37°C x 15' (Fast enzyme)

* Thermo Fisher FastDigest EcoRI (cat FD0274), ** Thermo Fisher FastDigest XbaI (cat FD0684)

Preparazione Gel 1% Agarosio per Elettroforesi

Preparare l'apparato elettroforetico

Pesare 0,4 grammi di Agarosio. Inserire 0,4 grammi di Agarosio in 40 ml di TAE 1X

Scaldare a microonde fino a portare ad ebollizione

Far raffreddare fino a 65°C

Aggiungere 1,5 µl di bromuro di etidio, mescolare

Versare nell'apposito apparato

Corsa elettroforetica

Preparare i campioni per l'elettroforesi aggiungendo 10 µl di plasmide + 1 µl di loading buffer
inserire i campioni + il marcatore di peso molecolare nei diversi pozzetti del gel e avviare la corsa
elettroforetica a 100 V per circa 15-20 minuti

Fare correre 1 gel e visualizzare risultati (con occhiali di protezione).

Giorno 3: Analisi risultati, PCR da colonia, gel elettroforesi e discussione finale

Osservare risultato della trasformazione e fare PCR da colonia

PCR da colonia

MASTER MIX

1 x	H ₂ O	9	x N
	10x PCR buffer+MgCl ₂	2,5	
	10x NTP	2,5	
	Primer 1 (10µM)	2,5 (1 µM)	
	Primer 2 (10 µM)	2,5 (1 µM)	
	Taq (0.2 unità)	1	

1 x	DNA* da colonia	---	x N
	H ₂ O	5 µl	

NOTE IMPORTANTI

* Risospendere con uno stuzzicadenti sterile una colonia in 10 µl di H₂O. Utilizzarne 5 e conservarne i rimanenti 5 µl per recuperare la colonia. ** Preparare la master mix in ghiaccio includendo la TAQ polimerasi. *** NON CENTRIFUGARE MAI !!!!! **** Il primo step deve essere di almeno 3'. ***** Tenere in considerazione il numero di copie. Per plasmidi ad alto numero di copie (es. PUC o bluescript) fare 25 cicli. Per plasmidi a basso numero di copie (es. BIN19) fare 35 cicli.

PROGRAMMA TIPO

STEP 1 3' 95°C
STEP 2 15" 95°C
STEP 3 1' 60 °C
STEP 4 15" 72°C
STEP 5 GO TO STEP 2 25 times (vedi nota *****)
END

Preparazione Gel 1% Agarosio per Elettroforesi

Preparare l'apparato elettroforetico

Pesare 0,4 grammi di Agarosio

Inserire 0,4 grammi di Agarosio in 40 ml

Scaldare a microonde fino a portare ad ebollizione

Far raffreddare fino a 65°C

Aggiungere 1,5 µl di bromuro di etidio, mescolare

Versare nell'apposito apparato

Corsa elettroforetica

Preparare i campioni per l'elettroforesi aggiungendo 10 μ l di plasmide + 1 μ l di loading buffer
inserire i campioni + il marcatore di peso molecolare nei diversi pozzetti del gel e avviare la corsa
elettroforetica a 100 V per circa 15-20 minuti

Fare correre 1 gel e visualizzare risultati (con occhiali di protezione) e discussione generale.