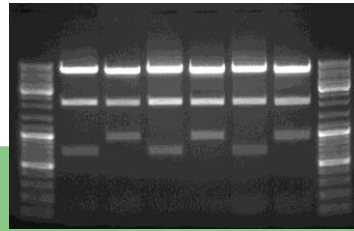


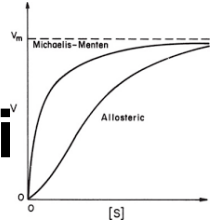
# Laurea Triennale in Scienze Biologiche 3° anno

## Corso di Laboratorio di Metodologie Biomolecolari

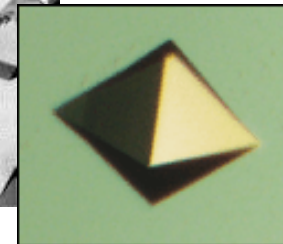
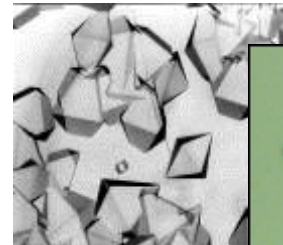
### 1. Biologia molecolare del DNA



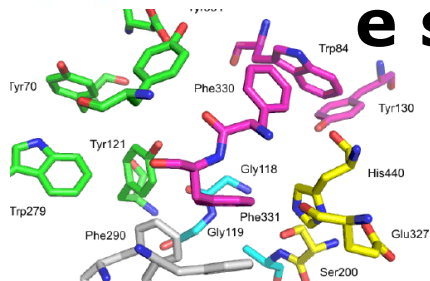
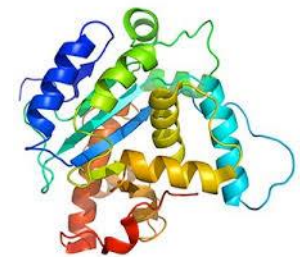
### 2. Purificazione di proteine e saggi enzimatici



### 3. Cristallizzazione di proteine



### 4. Bioinformatica e struttura di proteine



## Calendario dei laboratori

Due gruppi di studenti:

gruppo A: da Abbiati a Guerri

gruppo B: da Leggio a Zavattieri

- prima parte (prof. Nergadze):

4-5-6-7 marzo

aula D1 -> gruppo A

aula D2 -> gruppo B

- seconda parte (prof.ssa Canobbio):

11 marzo (tutti in aula E cascina Cravino in via Bassi)

12-14-18-20-26 marzo (gruppo A, aula D2 tranne 14 marzo in aula D5)

13-15-19-21-27 marzo (gruppo B, aula D2 tranne 15 marzo in aula D5)

28 marzo (tutti in aula E cascina Cravino in via Bassi)

- terza parte (prof.ssa Binda):

1-2-3 aprile

aula D1 -> gruppo A

aula D2 -> gruppo B

- quarta parte (prof. Forneris):

4-5 aprile tutti in aula Jucci

## **Verifica delle conoscenze acquisite (esame)**

- Test: domande sulle quattro parti
- Relazione sulle attività svolte: descrizione degli esperimenti e dei risultati ottenuti. Durante il corso vi sarà specificato il numero max di pagine da dedicare ad ogni parte e le modalità di invio della relazione ai docenti.

## Calendario delle verifiche

- 8 aprile 14.00, aula Jucci: test (in caso di assenza, voto insufficiente o insoddisfacente il test può essere ripetuto anche in date successive da concordare con i docenti)
- entro 20 maggio: scadenza per inviare la relazione (la relazione non può essere ripetuta)
- 17 giugno, 1-15-29 luglio: appelli di registrazione (registrarsi su esse3!!!!)

Tutte le informazioni saranno reperibili a  
breve al sito:

**[www.unipv.it/biocry/teaching](http://www.unipv.it/biocry/teaching)**

# Buone regole per il lavoro sperimentale in laboratorio

- **attività in gruppo, attività in singolo (lavorare in team)**
- **scrivere sul quaderno (riproducibilità dei risultati) e sulle provette**
- **utilizzo del waste (normale e Alipak)**
- **utilizzo delle pipette (next slide)**



# Utilizzo delle pipette automatiche



**1. Maneggiare con cura (pericolo di scalibrazione)**

**2. Impostare il volume**

## **Relazione sulle attività svolte**

La relazione ha lo scopo di «allenare» lo studente ad un aspetto fondamentale della ricerca in laboratorio: l'annotazione e l'elaborazione dei risultati degli esperimenti per garantirne la riproducibilità e facilitare un'analisi rigorosa che poi permette di trarre conclusioni su un determinato problema biologico.



## Cosa bisogna fare:

- Giorno per giorno prendere appunti sul proprio quaderno parametri, procedure e risultati degli esperimenti
- Nell'arco del periodo dei laboratori o alla fine preparare un file in formato Word in cui per ognuna delle 4 parti si descrive l'esperienza fatta facendo una piccola introduzione in cui si specifica lo scopo dell'esperimento, come è stato svolto, quali sono stati i risultati e l'interpretazione che se ne è tratta. L'impostazione del testo è libera ma deve rispettare questi limiti:
  - Parte 1 (Nergadze): max 3 pagine (+ eventuali allegati)
  - Parte 2 (Canobbio): max 6 pagine (+ eventuali allegati)
  - Parte 3 (Binda): max 2 pagine (+ eventuali allegati)
  - Parte 4 (Forneris): max 1 pagina (+ eventuali allegati)

**Non copiare da internet o da relazioni degli anni precedenti!!!**

# Traccia da seguire

Laboratorio di Metodologie Biomolecolari  
Relazione sulle attività svolte in laboratorio

nome e cognome  
n. matricola

Prima parte – Biologia molecolare del DNA

Breve introduzione e scopo del lavoro

Esperimenti (giorno 1, 2 ecc.)

Risultati: discussione e conclusione

Tutto questo deve essere compreso nel numero di pagine indicato nella slide precedente. Gli eventuali allegati con grafici, foto ecc. possono essere incluse in pagine aggiuntive alla fine di ciascuna delle 4 parti.

**Esempi**

**Introduzione teorica all'esperienza:** L'attività di laboratorio svolta con il Professor Nerdgaze ha avuto come argomento principale il DNA e l'ingegneria genetica, più nel dettaglio le tecniche più utilizzate per lavorare con il DNA:

- **PCR:** Polymerase Chain Reaction
- **Elettroforesi** su gel di Agarosio
- **Digestione con Enzimi di Restrizione** e costruzione della Mappa di Restrizione
- **Estrazione di DNA** da una coltura batterica di *E. coli*

Per ingegneria genetica si intende un insieme molto eterogeneo di tecniche che permettono di: **isolare geni**, **clonarli**: ovvero replicarli ed introdurli in un ospite differente dall'ospite originale grazie a dei trasportatori detti **vettori**. Le cellule così prodotte sono chiamate ricombinanti o trasformanti.

Essenziali all'ingegneria genetica sono gli **Enzimi Di Restrizione**, in laboratorio si utilizzano quelli di **tipo II**, essi tagliano a livello della sequenza di riconoscimento e possono quindi essere utilizzati come veri e propri **bisturi molecolari**. Gli enzimi di restrizione, riconoscono sequenze palindromiche, ovvero una sequenza che è identica sui due filamenti quando letta in una direzione ed il taglio può essere: piatto, con un'estremità 3' protrudente o con una 5' protrudente.

*Esempio di EcoRI:*

*È un RE isolato da E. coli, riconosce una sequenza di 6pb, ed è quindi chiamato rare cutter perchè effettua un taglio ogni circa (1/4)<sup>6</sup> ovvero che effettua un taglio in media ogni 4096 bp, il quale forma estremità sporgenti 5'.*



Una volta effettuato il taglio tramite EcoRI, si vengono a formare delle estremità dette **sticky ends**, che sono piu facili da legare da parte delle **ligasi**. Le estremità devono essere però compatibili.

Si può in questo modo andare a creare nuovi legami tra molecole di DNA che si vogliono studiare (inserti) ed i trasportatori che permettono di introdurre materiale genetico nella cellula (vettori).

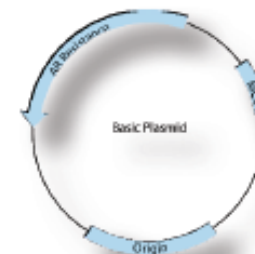
I **Vettori di Clonaggio**, sono molecole di DNA che possono entrare nella cellula ed essere replicati, fanno quindi da trasportatori dell'informazione genetica.

I vettori che abbiamo utilizzato per l'esperienza di laboratorio erano **vettori Plasmidici** (Figura 1), derivanti appunto da plasmidi, molecole di DNA circolare contenente geni accessori nelle cellule batteriche. Sopportano inserti di lunghezza fino ai 10 kb e sono molto utilizzati in laboratorio perché sono facili da far entrare nelle cellule ospiti. Nonostante ciò esistono e si utilizzano, a seconda delle esigenze, anche altri tipi di vettori che sopportano inserti di dimensioni maggiori come: Fagi, Cosmidi, YAC e BAC.

In generale I vettori hanno **3 proprietà principali**:

- Devono essere in grado di **replicarsi autonomamente** nella cellula ospite, avranno quindi un origine di replicazione.
- Devono contenere siti di restrizione unici, detti **multi cloning site (MCS)**, è un locus che contiene più siti di riconoscimento diversi per enzimi di restrizione che tagliano a livello delle seq. di riconoscimento. Qui andrà ad inserirsi l'inserto che avrà le terminazioni compatibili con il taglio effettuato dell'enzima di restrizione scelto.
- Devono contenere uno o più **marcatori selezionabili** per distinguere le cellule batteriche che hanno acquisito il vettore da quelle non trasformanti. Spesso è la resistenza ad antibiotici. Inoltre l'MCS può fare da sito marcatore delle cellule che hanno acquisito il vettore con l'inserto da quelle che non hanno l'inserto, ad esempio tramite la selezione Bianco-Blu.

Figura 1



Una volta ottenuto il vettore che contiene l'inserto che si vuole clonare, si può introdurre nelle cellule

Il plasmide (pGEM fig 5) in cui è stato inserito è lungo circa 3000 bp, e l'enzima usato per la restrizione è **EcoRI**.

Per la preparazione della soluzione per la PCR, abbiamo aggiunto in una provetta (negativa -) tutti gli ingredienti a parte il DNA Plasmidico e nell'altra (positiva +) invece:

- 5 µl di DNA plasmidico (pGEM), concentrazione 1 µM
- 3 µl di Primer Mix (10 µM): soluzione contenente i primer
- 10 µl di dNTPs (1mM): soluzione contenente i 4 dNTPs
- 10 µl buffer di reazione: soluzione che mantiene il pH perfetto per l'enzima taq Polimerasi
- 6 µl di MgCl<sub>2</sub> (25 mM): magnesio essenziale all'enzima in quanto cofattore
- 0.5 µl di enzima Taq Polimerasi
- 15.5 µl di H<sub>2</sub>O

**TOT: 50 µl**

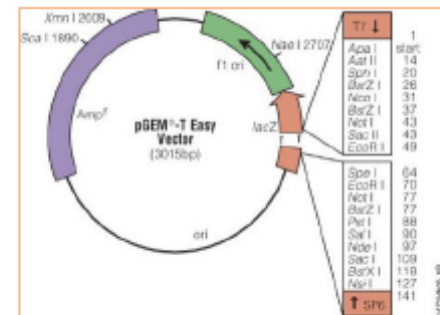
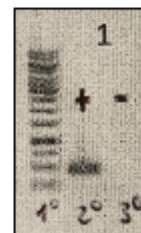
Una volta preparate le provette, si inseriscono nella macchina della PCR che effettuerà i cicli automaticamente. Il profilo di PCR utilizzato è stato:

- 2' a 95° C per la denaturazione del DNA
    - o 55" a 95° C
    - o 55" a 63° C per l'annealing
    - o 55" a 72° C per l'estensione
  - 5' a 72°C per finire l'estensione
  - Hold a 4°C
- } 35 Cicli

Successivamente i tutor hanno effettuato un'elettroforesi su gel d'agarosio in cui sulla prima colonna hanno inserito la scala di 1 kb di riferimento, nella seconda l'amplificato della provetta (+) e nella terza l'amplificato, che dovrebbe essere nullo, della provetta (-).

**Osservazioni e risultati:** Dalla fotografia del risultato dell'elettroforesi su gel d'agarosio, possiamo osservare che nella colonna della scala 1kb di riferimento si individuano più bande scure che rappresentano i frammenti di dimensione diversa, dal più grosso al più piccolo verso il basso. Nella seconda colonna (+) invece osserviamo una sola banda scura, che rappresenta il nostro amplificato (600 bp). Nella terza colonna, non osserviamo nessuna banda scura in quanto non abbiamo inserito nessun DNA da amplificare nella provetta (-), ciò significa anche che abbiamo lavorato bene e non ci sono state contaminazioni.

**Allegato:** Scansione del risultato dell'elettroforesi:



**Figura 5**

**Obiettivo:** Esplorare il sito catalitico della DNA Pol  $\alpha$  eucariotica

**Procedimento:**

Tramite pyMol e grazie al materiale fornitoci dal Prof. Forneris, andremo ad esplorare il sito catalitico della DNA Pol. Ho scelto di descrivere questa esperienza perché è dal mio punto di vista quella più rappresentativa delle potenzialità didattiche di questo software, ed in generale dei software di visualizzazione grafica molecolare. Inoltre è quella che mi è piaciuta maggiormente.

Lanciamo il software pyMol e come prima cosa apriamo una sessione già salvata nominata "ex3\_scene.pse", questa sessione mostra l'enzima DNA Pol  $\alpha$  in stile lines e con i 3 domini, pollice, palmo e dita colorati rispettivamente in azzurro, giallo e rosso. Inoltre è evidenziata la molecola di DNA nascente con il filamento di stampo e quello di neosintesi, se si zoomma nel sito catalitico si può osservare il substrato dell'enzima ovvero il dNTP, cui base azotata interagisce con la base azotata del nucleotide del filamento di stampo. Questo nucleotide che si sta inserendo però non ha ancora legato tramite legame fosfoanidrido la catena del filamento di neosintesi (Allegato 1).

Ora, dopo aver individuato il soggetto visualizzato nella sessione, andremo in *File* → *Run* e selezioniamo lo script "ex3-1.pml", vengono così messi in evidenza i legami tra aminoacidi, dNTP, i due ioni  $Mg^{2+}$  e le due molecole di  $H_2O$ . I due ioni metallici sono coordinati da parte dei residui appartenenti al dominio del palmo: Asp-475, Ala-476, Asp-654. (Allegato 2)

È interessante notare come i residui sopra citati hanno cariche negative per poter interagire con gli ioni  $Mg^{2+}$ , a differenza dei residui aminoacidici appartenenti al dominio dita, ovvero His-506, Arg518, Lys-522, Tyr526, i quali interagendo con i gruppi fosfato del dNTP hanno carica positiva. Nell'Allegato 2 due evidenzio queste caratteristiche.

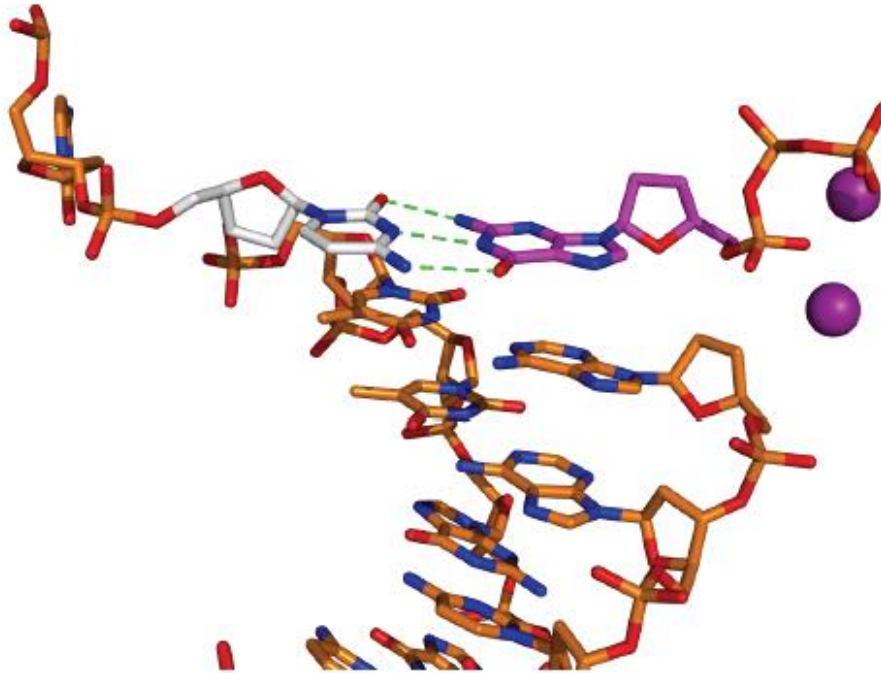
Eseguiamo ora un ulteriore script "ex3-1.pml", vengono ora evidenziati ulteriori residui del palmo, Asn-611 e Gln-615 che interagiscono con il filamento stampo, Arg-429 invece interagisce con il nucleotide del neofilamento appena inserito. Questo legame si forma solo se la base azotata del nucleotide appena inserito forma legami H con quella del nucleotide del filamento stampo corrispondente. Quindi nel caso ci fosse un appaiamento diverso a quello classico A-T, C-G, il residuo Arg-429 non riuscirebbe ad instaurare l'interazione con il nucleotide appena inserito, portando così ad un cambiamento conformazionale che richiama il dominio di questa polimerasi con attività di proofreading, il quale interviene inserendo il nucleotide esatto. L'interazione tra Arg-429 e il nucleotide del filamento di neosintesi è necessaria per il proseguimento della replicazione. (Allegato 3)

**Osservazioni e risultati:** Conoscere il meccanismo molecolare più nel dettaglio della replicazione del DNA mi ha fatto avere una conoscenza più approfondita del processo. Inoltre credo che questo tipo di approccio alla biologia molecolare sia molto didattico e interattivo.

**Allegato:** 1, 2, 3 nella pagina successiva.

**Allegati:**

**Allegato 1:** A sx si vede il filamento stampo e a destra il filamento nascente, in magenta è evidenziato il dNTP e le due sfere sono gli ioni  $Mg^{2+}$ .



**Allegato 2:** particolare del sito catalitico che mostra in verde sulla destra i residui che coordinano gli ioni  $Mg^{2+}$ , sulla sinistra in rosso invece i residui che interagiscono con i gruppi fosfato del dNTP.

