



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**PIANO NAZIONALE
LAUREE SCIENTIFICHE**



Analisi elettroforetica delle proteine e isolamento del DNA genomico

Docenti:

Prof. Marilena Formato, formato@uniss.it
Dr. Gabriele Nieddu, ganiemdu@uniss.it
Dr.ssa Manuela Galioto, galioto@uniss.it

Prof. Laura Manca, manca@uniss.it;
Dr. Paolo Mereu, pmereu@uniss.it
Dr.ssa Monica Pirastru, pirastru@uniss.it

Dipartimento di Scienze Biomediche

Referente Progetto PLS-Sassari: Prof. Marilena Formato
Dipartimento di Scienze Biomediche
E-mail: formato@uniss.it

1. Conoscenze propedeutiche

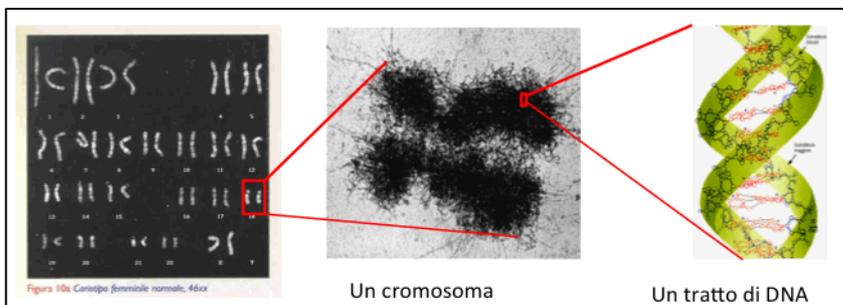
1.1 Le molecole biologiche: gli acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono molecole biologiche complesse presenti in diverse zone della cellula. Il termine «acido nucleico» deriva dal fatto che queste molecole sono state trovate per la prima volta all'interno del nucleo. I principali acidi nucleici sono il DNA e gli RNA.

La sigla DNA deriva da *Deoxyribo Nucleic Acid* (acido desossiribonucleico); è una complessa molecola che si trova nel nucleo di tutte le cellule e porta l'informazione per lo sviluppo degli organismi. Generalmente quando si parla di DNA si intende il DNA nucleare nonostante nelle cellule animali il DNA sia presente anche dentro i mitocondri.

La funzione del DNA è quella di contenere le informazioni necessarie alla produzione delle proteine che vengono trasmesse alle cellule figlie durante un complesso processo biochimico che prevede la trascrizione dell'informazione contenuta nel DNA in forma di triplette nucleotidiche e la traduzione di questo messaggio nella sintesi delle proteine (in forma di sequenze aminoacidiche).

- Il DNA è il **materiale ereditario** responsabile delle caratteristiche degli individui e quindi delle somiglianze e differenze tra gli stessi.
- Il DNA è unico, diverso da individuo a individuo, eccetto che per i **gemelli monozigotici**, il cui DNA è identico.
- Il DNA è visualizzato sotto forma di **cromosomi** durante la divisione cellulare.



1.2 La struttura del DNA

Il DNA è un polimero, ossia è un insieme di tanti monomeri: i nucleotidi.

Ogni nucleotide è costituito da tre componenti:

- un gruppo fosfato
- uno zucchero (desossiribosio)
- una base azotata.

La molecola di DNA è formata da due catene **polinucleotidiche** avvolte l'una intorno all'altra con andamento destrorso. Le due catene sono **antiparallele**, cioè i due singoli filamenti sono orientati uno in direzione 5'→3' e l'altro 3'→5'.

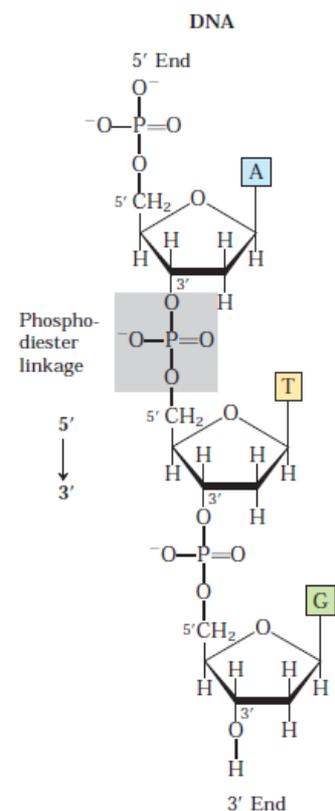
Gli scheletri zucchero fosfato si trovano all'esterno, le basi azotate all'interno. Le basi delle due catene sono unite tra loro mediante legami a idrogeno. Le **basi sono complementari** e il loro appaiamento è:

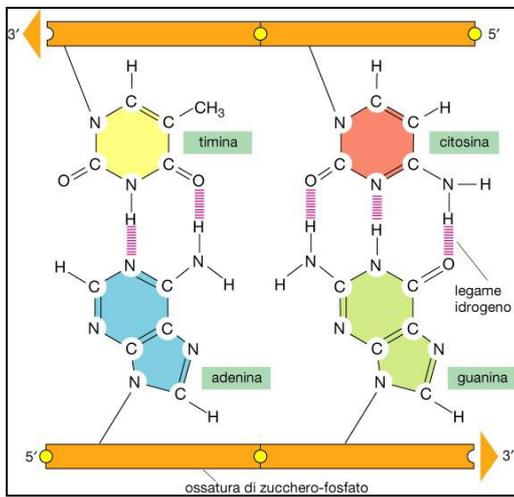
A = T Adenina - Timina

G ≡ C Guanina - Citosina

L'informazione genetica risiede nella sequenza di basi. Il nostro genoma è costituito da circa 30.000 geni, ossia tratti di DNA che codificano per proteine.

E' possibile estrarre il DNA a partire da diversi tessuti: saliva, tampone buccale, sangue (sia tracce di sangue fresco che secco), capelli, urine, liquido seminale, mozziconi di sigaretta, chewing gum. Il campionamento può riguardare anche fazzoletti di carta, tazzine, sigarette ecc.





Di grande attualità è l'analisi del DNA antico (aDNA) che consiste nel recupero del materiale genetico da reperti fossili o museali. Le problematiche che comunemente si incontrano sono dovute allo stato di conservazione del DNA, talvolta danneggiato dalla esposizione prolungata ai diversi agenti atmosferici.

1.3 L'isolamento del DNA genomico

L'estrazione del DNA è un passaggio cruciale propedeutico ad analisi molecolari successive, quali l'amplificazione di un segmento genico mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), il clonaggio ed il sequenziamento nucleotidico, che consentono di caratterizzare un individuo da un punto di vista genetico, di identificare regioni genomiche (marcatori) potenzialmente correlate con l'insorgenza di patologie e rivelare rapporti di

parentela tra individui.

I sistemi di estrazione possono essere suddivisi in due categorie principali:

- a) metodi tradizionali, che prevedono l'utilizzo di solventi organici (Fenolo/Cloroformio) o di soluzioni saline molto concentrate (Salting-out);
- b) micro-metodi basati sull'impiego di kit commerciali, che permettono di isolare in modo rapido il DNA a partire da quantità molto piccole di tessuto. Il grande vantaggio che offre l'impiego di questi sistemi è la rapidità di analisi. Per contro, i metodi tradizionali garantiscono una miglior resa in termini di concentrazione del DNA e di efficienza nella rimozione dei contaminanti proteici, lipidici, glucosidici e salini presenti in soluzione.

A prescindere dal metodo che si decide di utilizzare, l'estrazione del DNA è caratterizzata da alcuni passaggi essenziali che prevedono la rottura della parete e/o membrana cellulare, la digestione enzimatica delle proteine, l'allontanamento dei contaminanti, la degradazione del RNA e la precipitazione del DNA. Dopo questi passaggi è possibile ottenere l'isolamento del DNA in tampone di eluizione. La procedura si completa con il dosaggio spettrofotometrico dell'estratto.

1.4 Estrazione di DNA genomico da sangue mediante metodo del Salting-out

La precipitazione delle proteine mediante "salting out" è uno dei metodi più utilizzati e sfrutta il principio secondo il quale la solubilità delle proteine in soluzione dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione salina o forza ionica. A basse concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine aumenta lentamente (salting in), mentre ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente (salting out) causando la precipitazione delle stesse. La solubilità delle proteine è determinata dalla formazione di uno strato di solvatazione (clatrato) costituito dalle molecole del solvente che interagiscono mediante ponti idrogeno con gli amminoacidi idrofilici delle proteine. I sali competono con questi amminoacidi per il legame alle molecole del solvente, rimuovendo di fatto lo strato di solvatazione che avvolge le proteine e causandone la loro precipitazione. L'allontanamento dei contaminanti proteici dalla soluzione è fondamentale per assicurare il buon esito delle applicazioni downstream all'estrazione, come la PCR e il clonaggio genico. L'eventuale permanenza di nucleasi nella miscela contenente l'estratto potrebbe causare infatti la frammentazione della molecola di DNA e dell'informazione in essa contenuta.

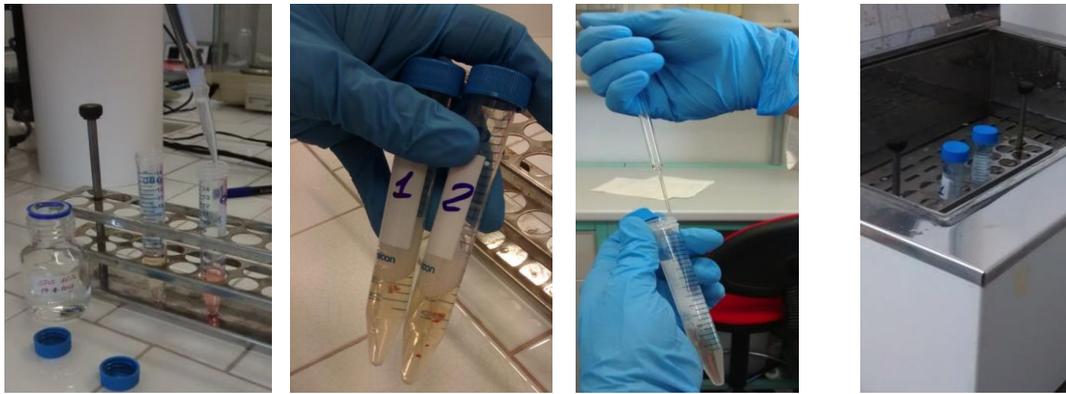
Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi e il trattamento con una proteasi, la Proteinasi K, allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali. Infine mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

1. Separazione della componente cellulare dal plasma mediante centrifugazione.

Nel sedimento (pellet) che si ottiene, i globuli bianchi (nucleati) stratificano nella parte superiore mentre i rossi (privi di nucleo) sul fondo della provetta. Essendo il DNA contenuto nel nucleo, si preleva e si trasferisce solo lo strato superiore in un'altra provetta sterile.

2. Lisi dei globuli bianchi per aggiunta di soluzione ipotonica e incubazione a circa 60 ° in bagnetto termostato in presenza di proteinasi K.



3. Aggiunta di NaCl 6M, soluzione ad elevata concentrazione salina per determinare la precipitazione delle proteine.

4. Centrifugazione e recupero del surnatante (fase acquosa) contenente il DNA.



5. Precipitazione del DNA

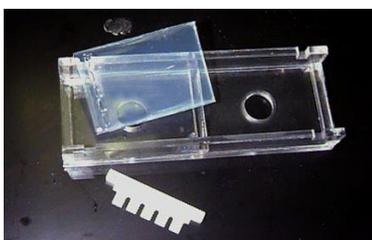
- Aggiungere 800 μ L di etanolo puro
- Agitare delicatamente per inversione fino alla comparsa del flocculo di DNA
- Trasferire il flocculo con un puntale in una provetta contenente 600 μ L di etanolo 80%
- Centrifugare per 10 min. a 13000 rpm ed eliminare il surnatante
- Risospesondere il DNA in 1 mL di tampone TE.



1.6 Elettroforesi del DNA in gel d'agarosio

Dopo l'estrazione l'integrità del DNA viene valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio in TAE (un tampone a pH 8,0). L'elettroforesi è un metodo standard utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA (per esempio per separare i frammenti di DNA dopo PCR o dopo taglio con gli enzimi di restrizione).

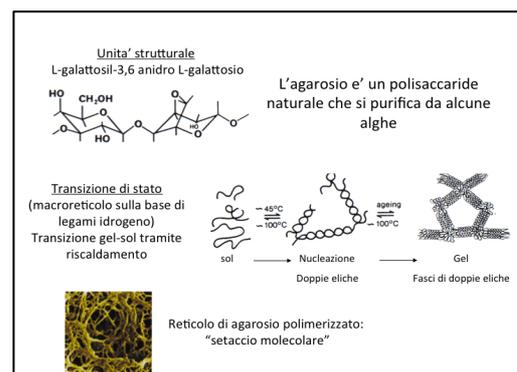
- L'agarosio è un polisaccaride che si ricava dalle alghe.
- Il gel viene formato sciogliendo a caldo l'agarosio allo 0,8% (peso/volume) in TAE. Una volta che l'agarosio è perfettamente solubilizzato, la soluzione viene posta in uno stampo di forma rettangolare e lasciato raffreddare.



- Ad una delle estremità del gel si trovano delle piccole cavità verticali chiamate pozzetti, allineate a formare una fila. Un determinato volume di ciascun campione di DNA è miscelato con una soluzione acquosa, denominata "loading buffer", costituita dal colorante Blu di Bromofenolo e da saccarosio.

Il "loading buffer" serve per "appesantire" il campione, facendolo andare sul fondo del pozzetto e colorando il campione in blu consente al contempo di seguire la corsa elettroforetica.

- Ogni campione viene depositato (o «caricato») in un pozzetto, quindi si applica al gel un campo elettrico (voltage costante di 75 V) per 40', con il polo negativo posizionato vicino ai pozzetti e il polo positivo all'estremità opposta. La corsa elettroforetica viene condotta a voltage costante.



Tampone di corsa

TAE (Tris/Acido acetico)

Tris-acetato 0.04M

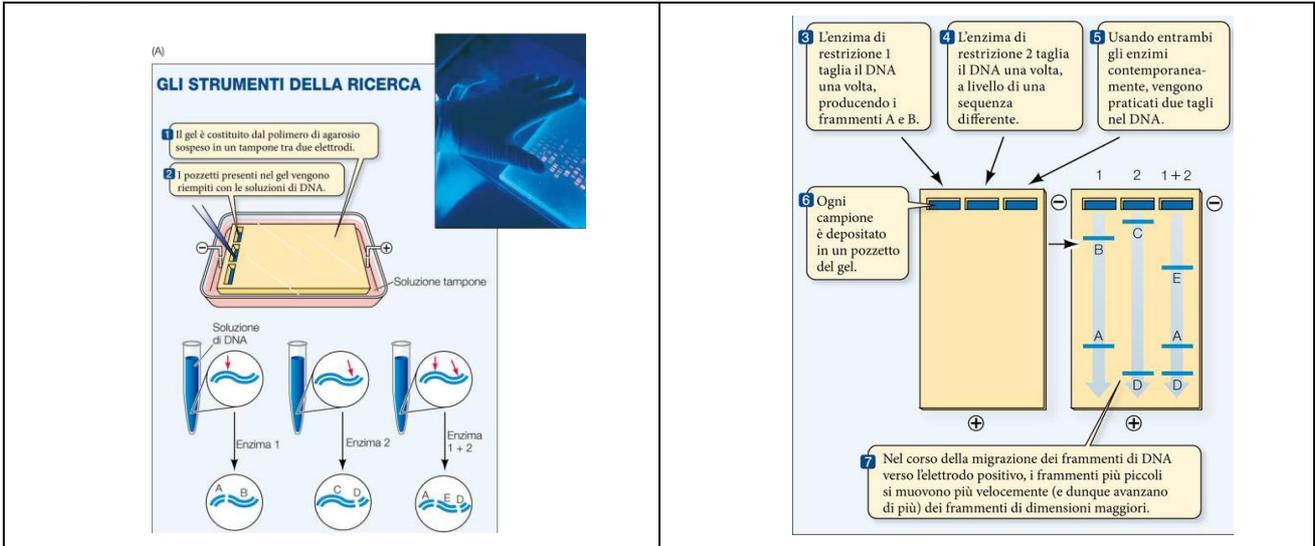
EDTA 0.001M

Soluzioni di caricamento

Sono costituite da un colorante

La loro funzione e': aumentare la densità del campione, Colorare il campione, rendere visibile la corsa elettroforetica

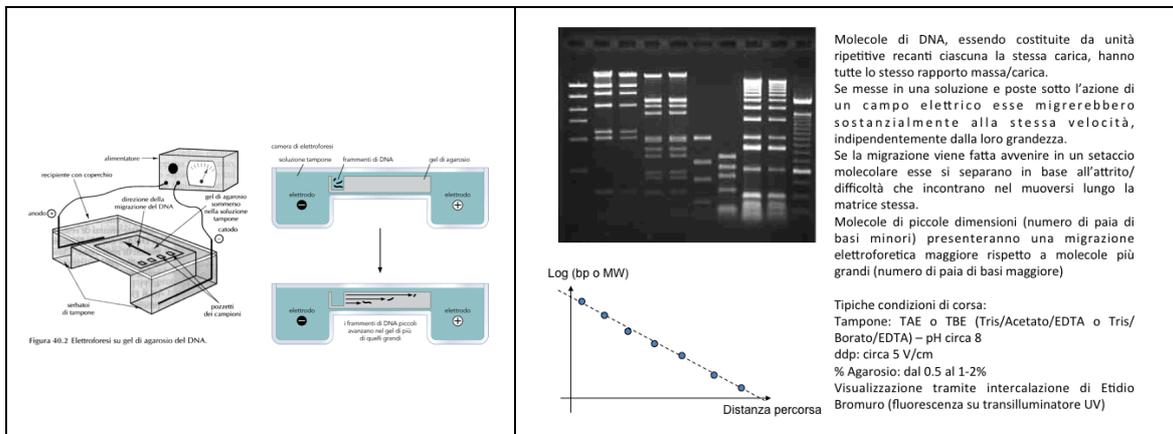
A pH basico, il DNA è carico negativamente per la presenza dei gruppi fosfato. Poiché le cariche opposte si attraggono, i frammenti di DNA sottoposti ad un campo elettrico migrano verso il polo positivo. Il gel funziona da «setaccio molecolare»: le molecole piccole, infatti migrano attraverso l'agarosio più velocemente di quelle grandi. Dopo un certo intervallo di tempo si interrompe l'erogazione di corrente elettrica e si esamina la distanza percorsa dai frammenti. Per visualizzare il DNA si usa un colorante che diventa fluorescente quando viene esposto alla luce ultravioletta.



Parametri che influenzano la velocità di migrazione del DNA nei gel di agarosio

- **Dimensioni del DNA:** le molecole lineari di dsDNA migrano a velocità inversamente proporzionali al logaritmo in base 10 del numero di paia di basi. Le molecole più grandi sono sottoposte a maggiori forze di attrito, e inoltre incontrano maggiore ostacolo nel trovare una via attraverso i pori del gel rispetto alle molecole più piccole. La relazione semilogaritmica descritta fa sì che non vi sia una spaziatura uniforme, lungo il gel, tra bande di DNA differenti tra loro dello stesso numero di paia di basi; invece, quando la dimensione delle molecole sale verso l'estremo superiore dello spettro di dimensioni analizzato, la velocità di migrazione diminuisce e il potere di risoluzione cade notevolmente.

Diagramma semilogaritmico: dimensioni del DNA (kb oppure bp) sull'asse Y logaritmico; cm oppure mm



percorsi a parità di tempo sull'asse X lineare.

- **Concentrazione di agarosio:** Esiste una relazione lineare tra il logaritmo della mobilità elettroforetica del DNA e la concentrazione del gel; questa relazione varia a seconda del valore di una costante (coefficiente di ritardo) collegata alle proprietà del gel e alla taglia e forma delle molecole migranti.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Preparazione del gel

- preparare la camera di polimerizzazione e posizionarla su piano orizzontale



- versare 40 ml di tampone TAE 1x in una beuta di vetro pirex contenente 0,32 g di agarosio.
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde o su una piastra riscaldante
- aspettare alcuni minuti, coprendo la beuta contenente la soluzione di agarosio con un pezzetto di stagnola, per evitare l'evaporazione. L'agarosio deve raggiungere una temperatura intorno ai 60°C prima di essere "colato" nella camera di polimerizzazione per evitare che rovini il supporto di plastica
- versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine. I pozzetti si formano per rimozione del pettine una volta terminata la polimerizzazione
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- rimuovere la vaschetta dal supporto per la polimerizzazione e trasferirla nella cella elettroforetica

Corsa elettroforetica

- miscelare 20 μ l di ciascun campione con 5 μ l di loading buffer utilizzando una micropipetta
- se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga da banco
- caricare lentamente ciascun campione (25 μ l) nei singoli pozzetti facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
- chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del generatore di corrente



- impostare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 30 min
- fare attenzione che la banda del tracciante, il blu di bromofenolo, non esca dal gel (altrimenti alcune bande di DNA possono uscire dal gel). Il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 bp.
- Al termine della corsa elettroforetica, interrompere l'erogazione di corrente, spegnere l'alimentatore, aprire la cella elettroforetica e trasferire il gel nel transilluminatore. L'esposizione del gel alla luce ultravioletta per mette di visualizzare il DNA.

Estrazione di proteine da tessuti

Dopo l'acqua, le proteine sono le sostanze più abbondanti nelle cellule e sono coinvolte nella maggior parte dei processi biologici che si svolgono in esse.

Nell'organismo umano si trovano più di 100000 tipi di proteine diverse. Grazie alla loro varietà, le proteine svolgono molte funzioni, tra cui:

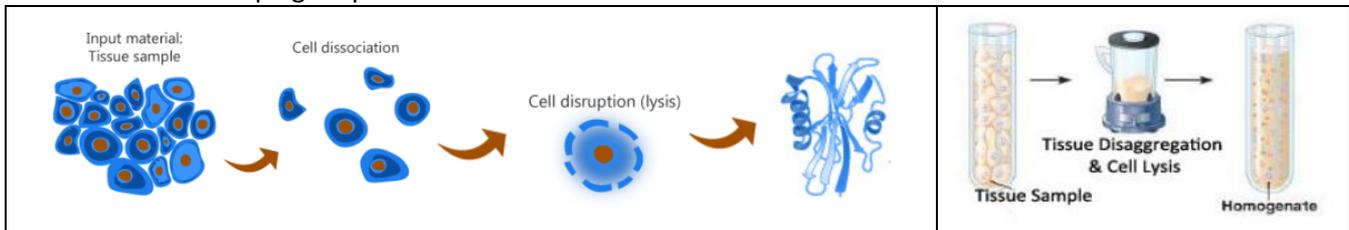
- facilitano le reazioni chimiche che avvengono nelle cellule (ruolo di enzimi),
- regolano l'entrata e l'uscita di alcune sostanze dalle cellule (proteine di membrana),
- servono come sostegno e sono coinvolte nel movimento cellulare (proteine strutturali).

Alcune proteine formano strutture visibili a occhio nudo, come le ragnatele e i capelli. Le macromolecole proteiche sono polimeri lineari di amminoacidi.

La prima tappa nell'isolamento delle proteine prevede l'estrazione dalla cellula. Tale processo avviene mediante un'omogeneizzazione che distrugge il tessuto e rilascia i componenti intracellulari in sospensione.

L'omogeneizzazione viene anche usata come fase preliminare per la purificazione parziale di organuli cellulari per gli studi sulla compartimentazione metabolica. Per il successo della omogeneizzazione sono molto importanti:

- la scelta del tessuto di partenza
- le proprietà fisiche e chimiche della soluzione fisiologica adoperata
- il metodo impiegato per la distruzione delle cellule



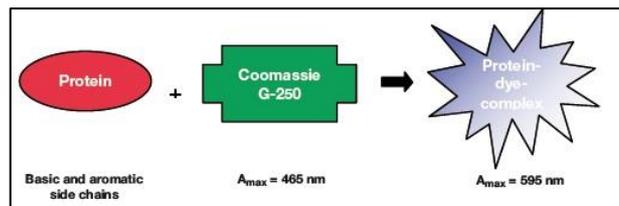
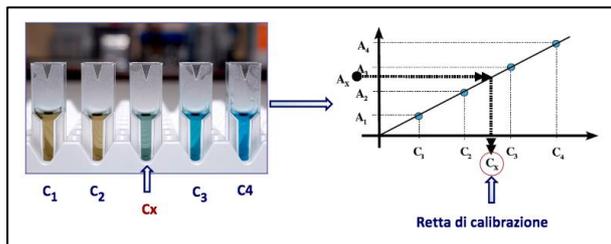
Le procedure di omogeneizzazione per la purificazione delle proteine implicano necessariamente una fase di distruzione cellulare con metodi che possono essere meccanici, chimici ed enzimatici. La scelta del metodo dipende dalla natura della parete/membrana cellulare.

Il contenuto proteico può successivamente essere quantificato utilizzando metodi colorimetrici come il dosaggio mediante saggio Bradford, e le proteine successivamente purificate mediante procedure di frazionamento basate sulle proprietà chimico-fisiche della proteina di interesse. Pur perdendo in parte la proteina desiderata si mira ad eliminare in maniera selettiva le altre componenti dalla miscela.

Caratteristica della proteina	Procedura di purificazione
Solubilità	Salting out
Carica ionica	Cromatografia a scambio ionico Elettroforesi Focalizzazione isoelettrica
Polarità	Cromatografia idrofobica
Dimensioni	Cromatografia per filtrazione su gel SDS-PAGE Ultracentrifugazione
Specificità di legame	Cromatografia per affinità

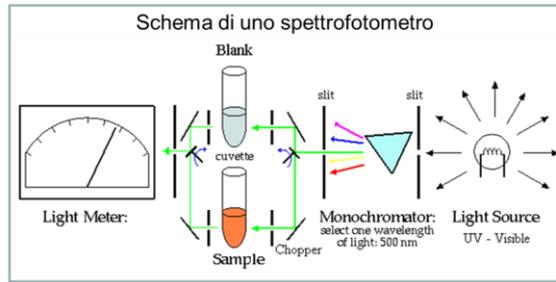
Quantificazione di proteine.

Reagenti specifici vengono incubati con quantità NOTE di una proteina standard (es. Albumina da siero bovina- BSA) e si ottiene una retta di calibrazione. Poi si fa reagire con lo stesso colorante un volume noto di miscela di proteine e si relaziona l'assorbanza con la quantità sulla retta di calibrazione.



Dosaggio mediante Metodo di Bradford (legame con coloranti). Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine (mediante formazione di complessi non covalenti con gli amminoacidi basici) provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (50% acido fosforico).

Spettrofotometria



$$T \text{ (trasmittanza)} = I/I_0$$

I_0 = intensità della luce incidente
 I = intensità della luce trasmessa

$$A \text{ (assorbanza)} = \log 1/T$$

L'assorbanza esprime la quantità di luce assorbita da una sostanza (è adimensionale)

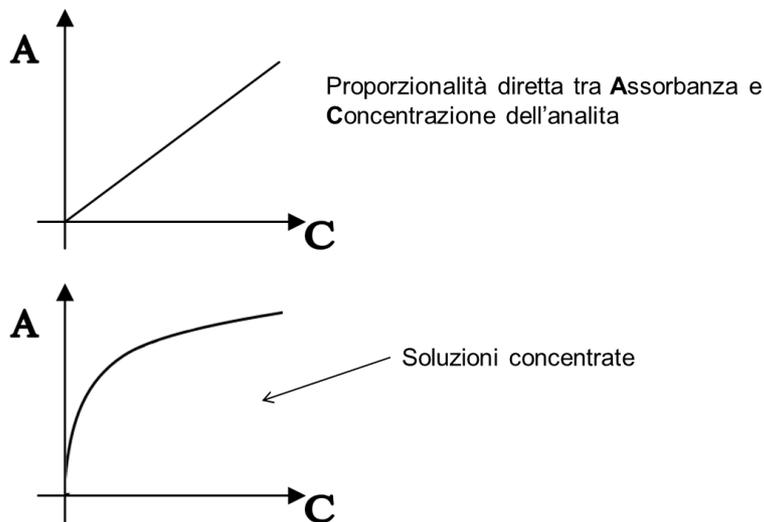
Legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} C l$$

C = concentrazione dell'analita (M ovvero mol/l)
 L = cammino ottico (centimetri)
 ϵ_{λ} = coefficiente di estinzione molare ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

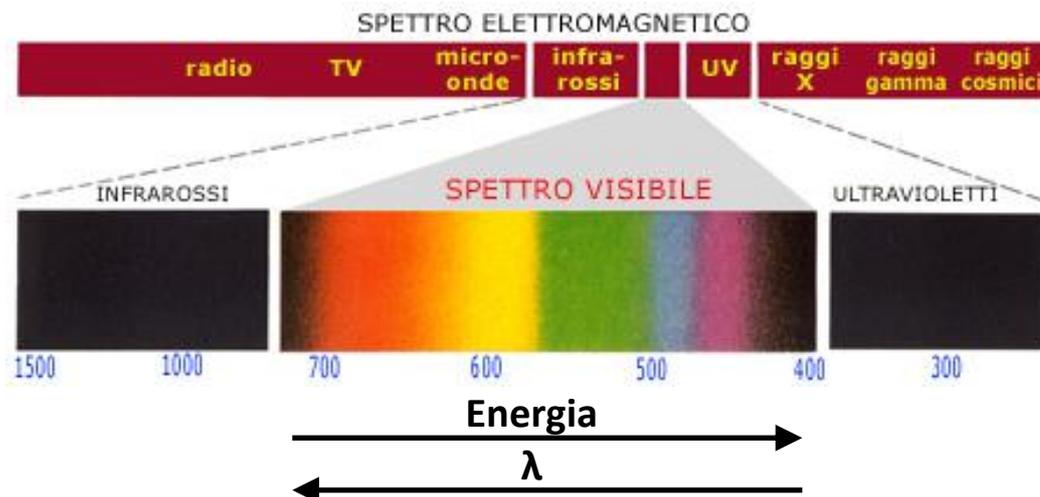
ϵ_{λ} dipende:
 ♦ dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita (λ)
 ♦ dalla natura del solvente
 ♦ dal pH
 ♦ dalla specie chimica che assorbe
 □ è indipendente dalla temperatura

La legge di Lambert-Beer è valida solo per soluzioni molto diluite



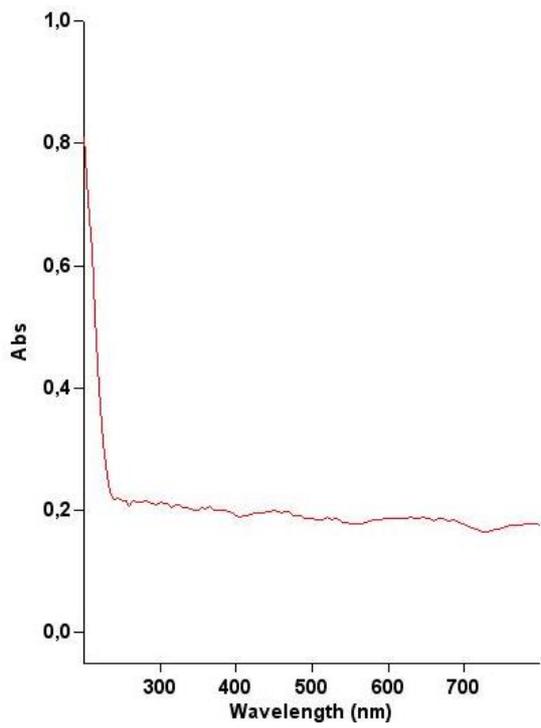
Lo spettro elettromagnetico

I vari intervalli dello spettro elettromagnetico sono sfruttati a scopo analitico per ottenere informazioni strutturali quali-quantitative sulla materia analizzata

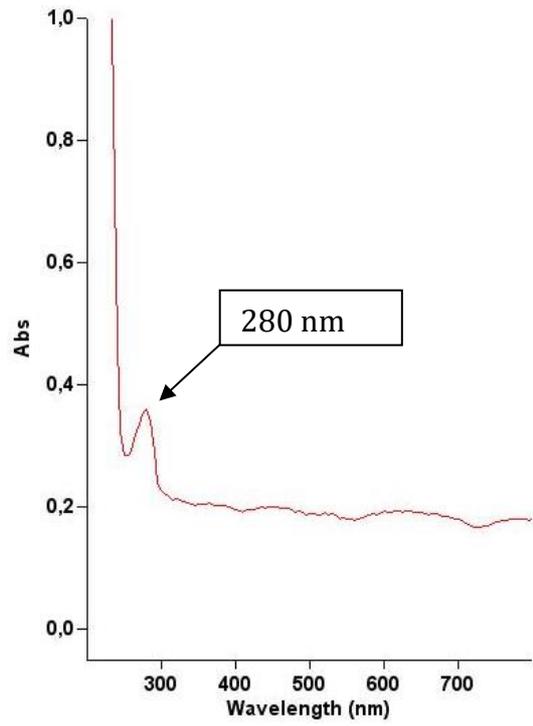


Spettri di Assorbimento

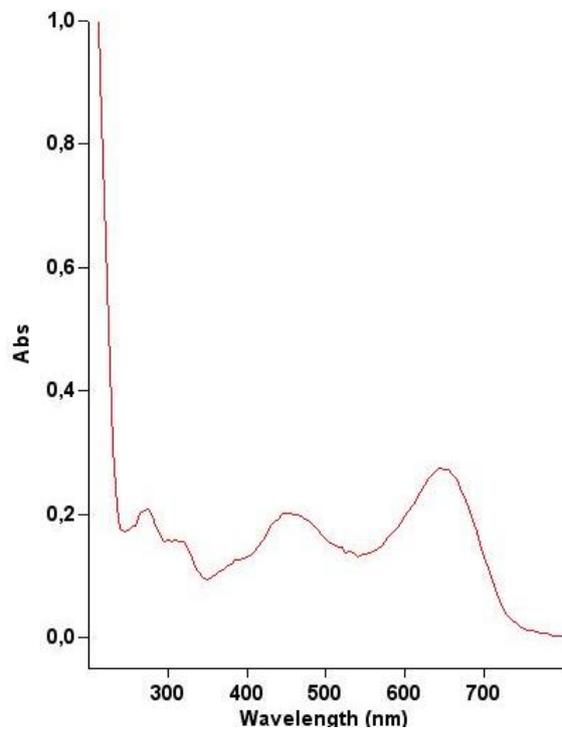
Bianco reagenti



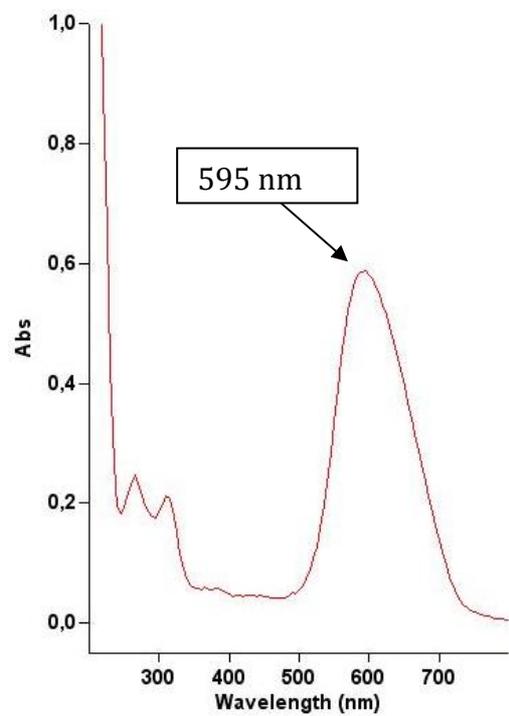
Albumina serica bovina (BSA)

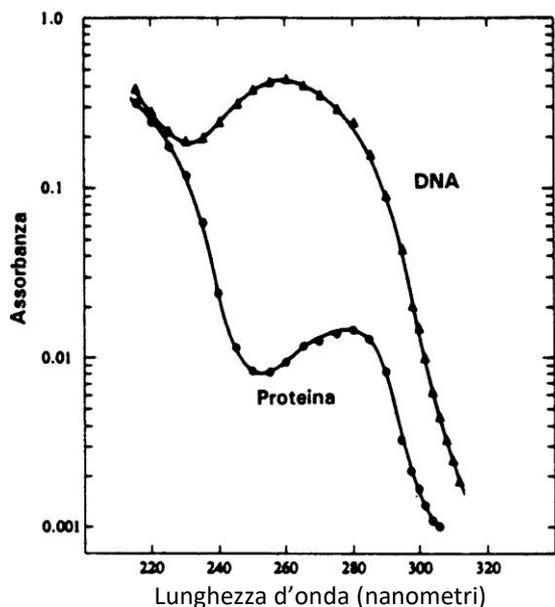


Bradford



BSA + Bradford





PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford

Preparazione soluzioni standard

Per la costruzione della retta di taratura preparare 5 soluzioni a concentrazione nota della proteina standard diluendo opportunamente una "soluzione stock" (2 mg/ml). Volume finale della soluzione diluita 200 μ L.

STANDARD	Soluzione BSA Stock (2 mg/ml)	H ₂ O
0.2 mg/ml	20 μ L	180 μ L
0.4 mg/ml	40 μ L	160 μ L
0.6 mg/ml	60 μ L	140 μ L
0.8 mg/ml	80 μ L	120 μ L
1 mg/ml	100 μ L	100 μ L

Esecuzione dosaggio

- Per l'esecuzione del dosaggio utilizzare provette da 1 ml ed aggiungere nell'ordine (in duplicato):
 - 20 μ L di campione proteico o di proteina standard (utilizzare una micropipetta P20)
 - 1000 μ L del reattivo Bradford (utilizzare la soluzione prediluita).
 - Per la preparazione del bianco (riferimento) aggiungere acqua al posto del campione.
- Agitare su vortex e trasferire il contenuto in cuvette di plastica.
- Effettuare le letture di assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo 5 min di incubazione con il reattivo (il colore blu è stabile per circa 45 min).
- Leggere prima l'assorbanza del bianco (riferimento), quindi azzerare lo spettrofotometro e procedere con le letture di standard e campioni.
- Per il calcolo della concentrazione proteica utilizzare la retta di taratura ottenuta mettendo in relazione le misure di assorbanza e le concentrazioni della proteina standard.

Riportare in tabella le letture di assorbanza ottenute

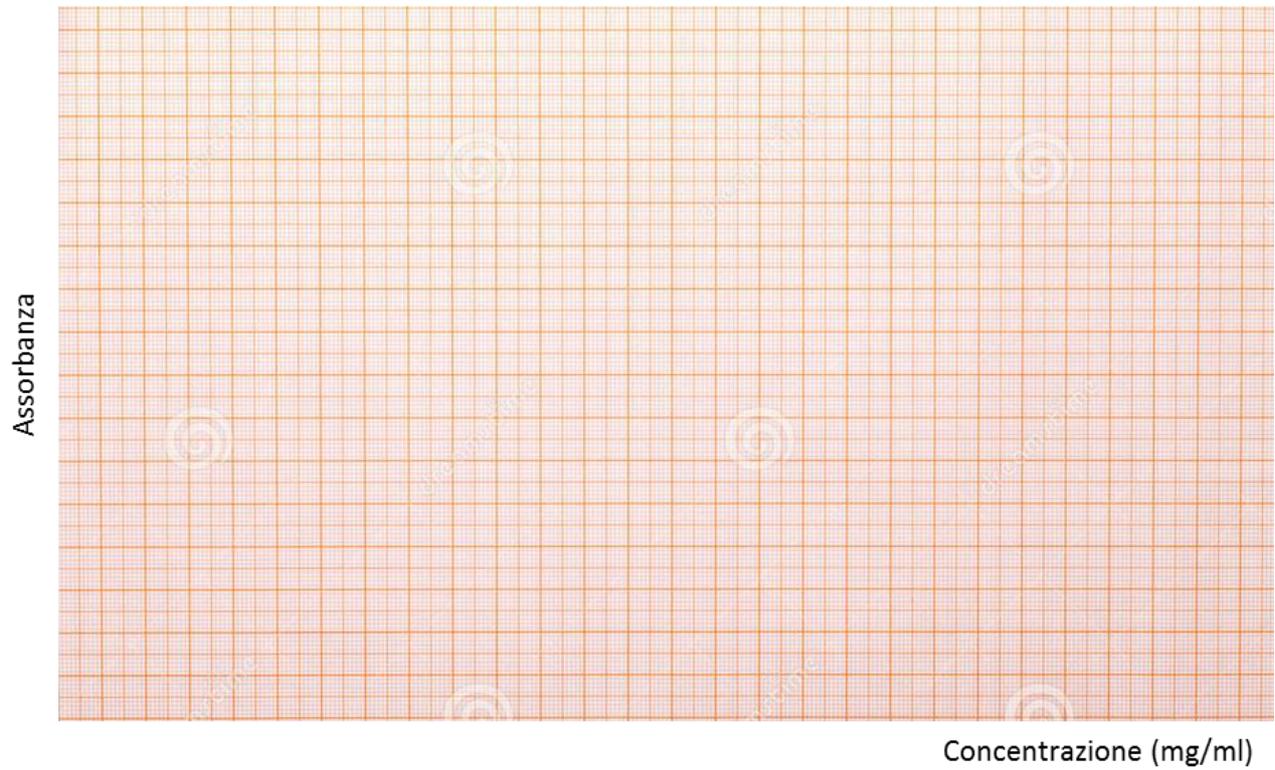
STANDARD	Assorbanza (595 nm)	
0.2 mg/ml		
0.4 mg/ml		
0.6 mg/ml		
0.8 mg/ml		
1 mg/ml		

Campione A		
Campione B		
Campione C		

Riportare in grafico i valori ottenuti per gli standard

Costruire la retta di taratura

Calcolare le concentrazioni dei campioni A, B,C



Norme generali di sicurezza in laboratorio

- Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.
- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- Indossare guanti monouso durante la manipolazione di sangue o di materiale da esso derivato non fissato. I guanti devono essere rimossi con attenzione e sostituiti quando sono visibilmente contaminati. I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tascheria, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente, immediatamente dopo la manipolazione di materiali contaminati e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare, portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite propipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro.
- Tutto il materiale biologico d'origine umana (sangue, ecc.) deve essere considerato come potenzialmente infetto e pertanto trattato con le necessarie precauzioni.
- Segnalare immediatamente al personale docente ogni spargimento di materiale biologico (ad es. schizzi di sangue) sul piano di lavoro, affinché si provveda alla decontaminazione con un germicida chimico appropriato (candeggina, ecc.).
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Raccogliere tutti i liquidi biologici (sangue, terreni di coltura venuti a contatto con le cellule, cellule, ecc.) in speciali contenitori per rifiuti, che verranno successivamente eliminati previo trattamento con candeggina al 15%.
- Mettere il materiale monouso (pipette, fiasche ecc.) venuto a contatto con materiale biologico in un sacco apposito, che verrà smaltito mediante incenerimento.
- Stante i costi elevati dello smaltimento, ridurre il più possibile l'uso del materiale monouso.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione

Utilizzo della centrifuga

- chiudere accuratamente il tappo delle provette, per evitare la fuoriuscita di liquido e la formazione di aerosol
- assicurarsi che il rotore sia bilanciato: provette di uguale peso devono essere inserite negli alloggiamenti diametralmente opposti
- chiudere il coperchio della centrifuga prima di avviarla
- non cercare di aprire il coperchio prima del completo arresto del rotore
- in caso di fuoriuscita di liquido dalle provette, avvertire il personale docente

Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

- assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti
- assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti
- alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti