



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**PIANO NAZIONALE
LAUREE SCIENTIFICHE**



Gli OGM: microrganismi per la produzione di farmaci biotecnologici

Docenti:

Prof. Claudia Crosio, ccrosio@uniss.it;
Dr. Ciro Iaccarino, ciaccarino@uniss.it
Dr. Mauro Rassu, maurassu@uniss.it
Dr.ssa Simona Sanna, simosanna@uniss.it
Dr.ssa Manuela Galioto, galioto@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 Cos'è il DNA?

DNA sta per *Deoxyribo Nucleic Acid*; è una complessa sostanza chimica che si trova nel nucleo di tutte le cellule e porta l'informazione per lo sviluppo degli organismi.

- 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

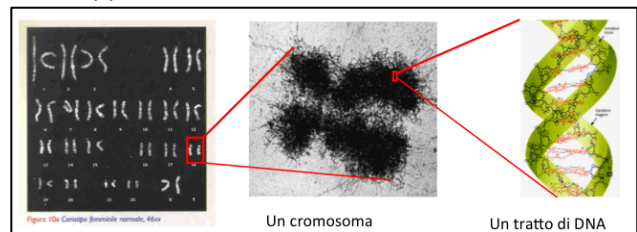
La molecola del DNA è un polimero, ossia è un insieme di tanti monomeri: i nucleotidi. Ogni nucleotide è costituito da tre componenti: un gruppo fosfato, uno zucchero (desossiribosio) e una base azotata. La molecola di DNA è formata da due catene **polinucleotidiche** avvolte l'una intorno all'altra 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.

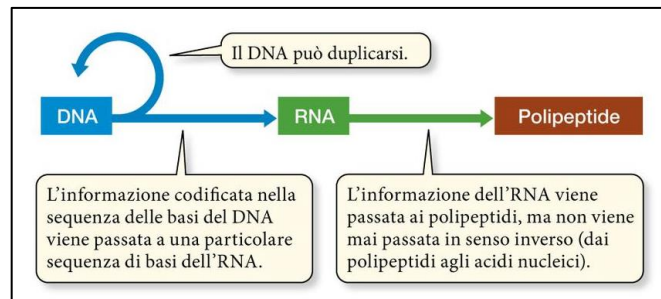


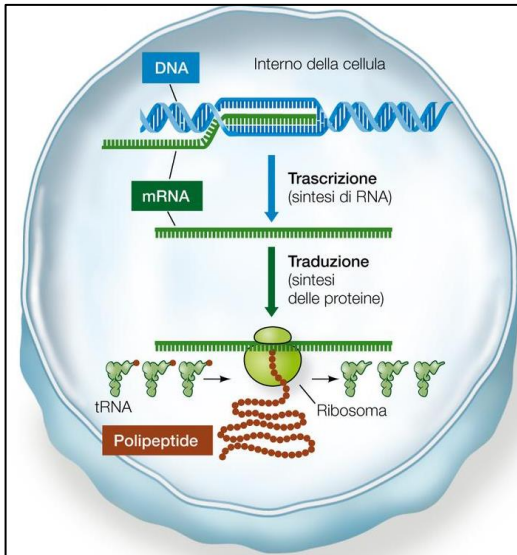
1.3 I geni ed il fluire dell'espressione genica

Subito dopo aver proposto insieme a James Watson la struttura tridimensionale del DNA, Francis Crick cominciò a considerare il problema del rapporto funzionale fra DNA e proteine. Questo lo portò a enunciare quello che chiamò il *dogma centrale* della biologia molecolare. In parole semplici, il dogma afferma che il gene è un tratto di DNA contenente le informazioni per la produzione di una catena polipeptidica; la

proteina però non contiene l'informazione per la produzione di altre proteine, dell'RNA o del DNA. Per mettere in relazione la sequenza dell'*mRNA* (e quindi del gene) con gli amminoacidi che compongono le proteine, occorre un *codice genetico*. Il codice genetico specifica l'*amminoacido* da utilizzare di volta in volta per costruire una *proteina*.

L'informazione contenuta nella molecola di mRNA può essere vista come una serie lineare di parole di tre lettere.





Ogni sequenza di tre basi (le tre «lettere») lungo la catena polinucleotidica dell'RNA è un'unità di codice, o *codone*, e specifica un particolare aminoacido. Ciascun codone è complementare alla corrispondente *tripletta* di basi nella molecola di DNA su cui è stato trascritto; così il codice genetico crea una corrispondenza tra i codoni e i loro specifici aminoacidi.

Nonostante l'uso che se ne fa comunemente, il **codice genetico** è il «linguaggio» in cui è scritta l'informazione e non l'informazione stessa, che viene più propriamente definita «messaggio genetico». Tutti gli organismi viventi dai virus agli eucaroti utilizzano il medesimo codice genetico che è per tanto detto **universale** (vedi dopo).

2. Introduzione agli OGM

2.1 Definizione di OGM?

Sono definiti "Organismi il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale che possono contenere uno o più geni modificati" (Art. 2, Direttiva 2001/18/CE del 12/03/01).

Gli OGM possono essere virus, batteri, funghi, piante e animali le cui caratteristiche genetiche sono state modificate in laboratorio mediante l'inserimento di un gene estraneo, detto **transgene**, esclusivamente mediante tecniche di ingegneria genetica.

Gli OGM hanno molteplici applicazioni tra cui:

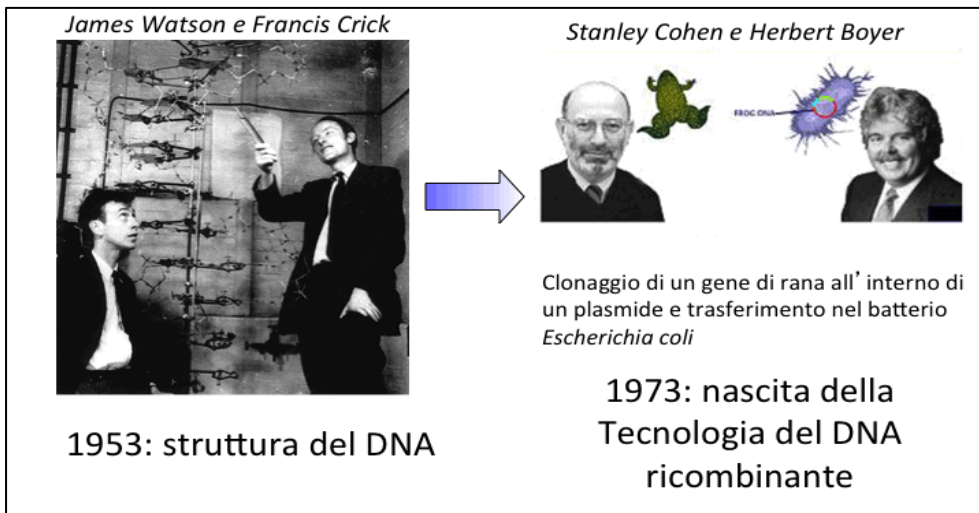
- **farmacologia e medicina:** produzione di biofarmaci, molecole utili a fini terapeutici, vaccini e antibiotici, terapia genica, etc
- **industria alimentare:** modificazione del contenuto di zuccheri, aminoacidi, grassi etc
- **chimica e farmaceutica:** enzimi, additivi, alcol, acidi, solventi, detergenti, materie plastiche, reagenti diagnostici
- **agricoltura, zootecnia e veterinaria:** miglioramento genetico per rendere resistenti a stress biotici e abiotici, incremento delle rese, etc...
- **protezione ambientale:** biorisanamento di ambienti contaminati, depurazione delle acque e dei reflui, etc...
- **energia:** estrazione del petrolio presente nelle rocce mediante produzione di sostanze tensioattive che ne favoriscono la separazione, etc...

Alcuni esempi di Organismi Geneticamente Modificati:

- *Flavr Savr*, un pomodoro modificato per rallentare il processo di decomposizione, messo in vendita in USA nel 1994.
- *E.coli*, un batterio modificato in grado di produrre insulina umana, poi purificata e utilizzata da persone diabetiche.
- *Mais B t*, un mais modificato in grado di produrre le tossine necessarie a combattere gli insetti dannosi più comuni.
- *Cotton MON1445*, cotone modificato in modo da conferirgli la tolleranza all'erbicida glifosato

2.2 Come si ottengono gli OGM: principi di ingegneria genetica

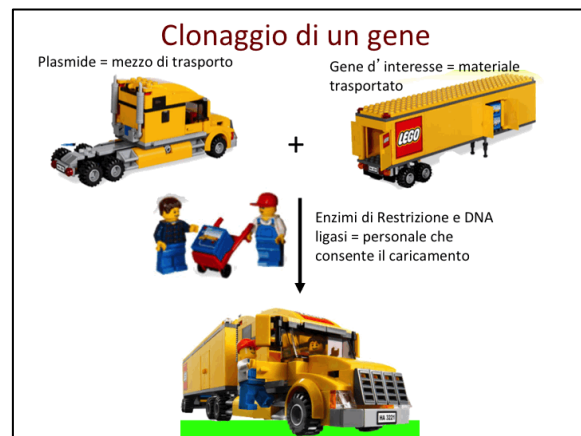
Gli OGM vengono ottenuti attraverso l'uso di tecniche di ingegneria genetica che permettono di inserire, all'interno del genoma di un organismo, frammenti di DNA provenienti anche da altri esseri viventi. Il DNA così ottenuto è definito *DNA ricombinante*.



Si definisce *tecnologia del DNA ricombinante* l'insieme delle tecniche di laboratorio che consentono di isolare e tagliare brevi sequenze di DNA per trasferirle e inserirle nel *genoma* di altre cellule, in modo da modificarne uno o più geni. Questa tecnologia permette interventi mirati, che modificano in modo specifico solo i geni dei caratteri su cui si vuole agire. Inoltre, le metodologie odierne consentono di trasferire DNA non solo tra individui della stessa *specie*, ma anche tra specie diverse, spesso molto differenti l'una dall'altra. Si possono, per esempio, trasferire geni da un batterio a una pianta o introdurre in un batterio un gene proveniente da una cellula eucariotica.

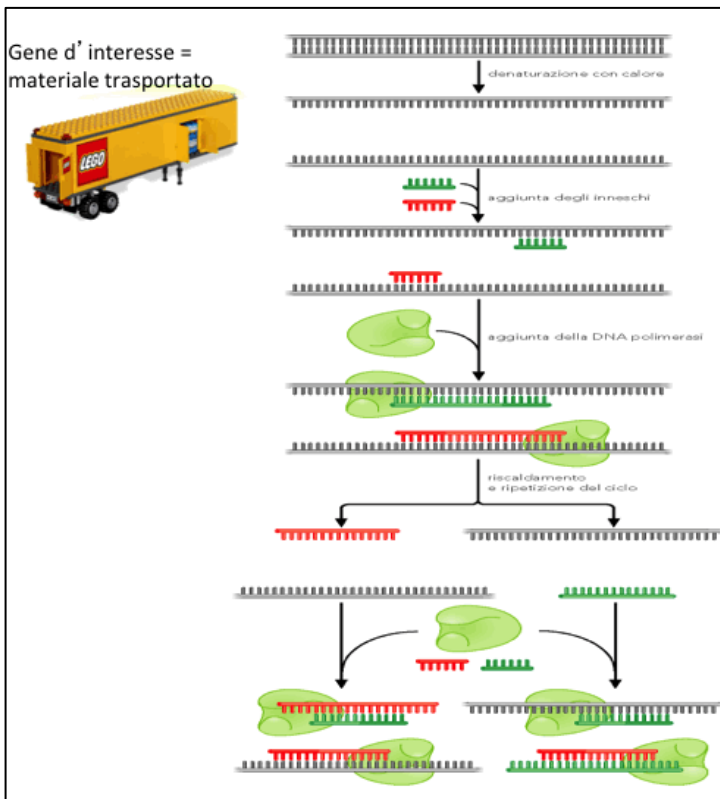
La tecnologia del DNA ricombinante è molto complessa dal punto di vista operativo, ma dal punto di vista concettuale si basa su criteri abbastanza semplici:

- identificare il *gene*;
- tagliarlo e isolarlo dalla molecola del DNA;
- unire il gene a un vettore a sua volta costituito da DNA
- trasferirlo all'interno di una cellula ricevente



2.2.1 Isolare il gene d'interesse: la rivoluzione della reazione a catena della polimerasi (PCR)

Oggi la tecnica più utilizzata per isolare specifiche sequenze di DNA è quella della **reazione a catena della polimerasi (PCR)**. Si tratta di una tecnica innovativa che consiste nell'amplificazione specifica di tratti di DNA mediante reazioni a catena della DNA polimerasi. Il principio è molto semplice. Data una sequenza di DNA a doppio filamento e due corte sequenze oligonucleotidiche (primer), di cui una complementare ad un tratto di filamento ad una estremità del DNA da amplificare (forward primer) e l'altra complementare ad un altro tratto posto all'altra estremità (reverse primer), in presenza di una DNA polimerasi termostabile e di una miscela di desossinucleotidi trifosfati in appropriate condizioni di reazione, è possibile far copiare numerosissime volte il tratto compreso tra i due primer, semplicemente facendo variare ciclicamente la temperatura di reazione. Infatti, raggiunta la temperatura di denaturazione (circa 95°C), la doppia elica si apre (fase di denaturazione), rendendo disponibile lo stampo per un eventuale sintesi delle catene complementari. Quando la temperatura si abbassa, in virtù delle loro minori dimensioni e della loro concentrazione, i primer si legheranno (fase di appaiamento o annealing) al DNA stampo prima che si rinaturino e, in presenza di una DNA polimerasi con un optimum di temperatura elevato (circa 72°C), inizierà la sintesi di DNA a partire dai primer (fase di sintesi del DNA o extension), procedendo lungo i filamenti singoli.



Al termine del primo ciclo di PCR da una doppia elica di DNA se ne ottengono due. Ripetendo il ciclo "denaturazione – annealing – extension" numerose volte (in genere da 20 a 30), si ottiene una massiccia amplificazione specifica di un dato tratto di DNA che può quindi essere analizzato e studiato in dettaglio.

Il metodo di analisi del DNA mediante PCR presenta vantaggi molto evidenti:

- ◆ è molto rapido (da 60 a 90 minuti),
 - ◆ la manualità è semplicissima,
 - ◆ è automatizzato,
 - ◆ i risultati sono visualizzabili con facilità mediante elettroforesi del DNA (vedi §2.2)
- Importanti ambiti di utilizzo della PCR sono la diagnosi prenatale di malattie genetiche e le indagini di medicina legale (sia civile che penale),

I termociclatori

Il successo della PCR è dovuto in gran parte alla possibilità di far avvenire l'intero processo in modo automatico all'interno di strumenti detti termociclatori (thermal cycler), in grado di variare ciclicamente la temperatura tra le varie fasi di ogni ciclo di PCR. Il costo di un thermal cycler si aggira sui 5.000 euro. Un esempio di profilo di amplificazione standard impostato mediante un termociclatore è il seguente:

1. denaturazione del DNA: 30 sec a 94°C	30-35 cicli
2. appaiamento (annealing) dei primers: 30 sec a 50°-60°C	
3. sintesi (extension) di DNA: 30 sec- 5 minuti a 72°C	

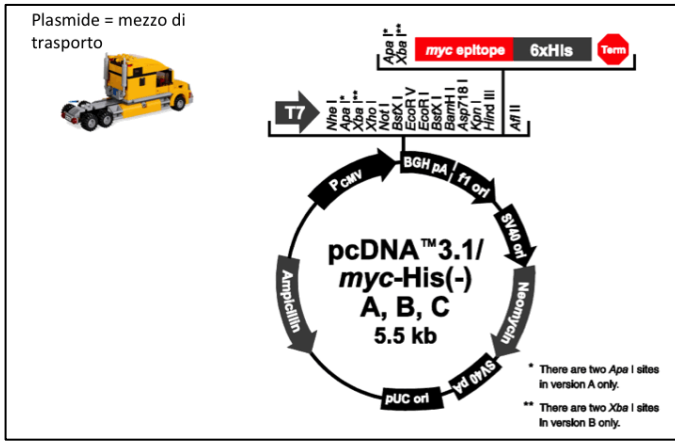
La Taq polimerasi

Il successo della PCR è stato possibile grazie anche all'uso di una DNA polimerasi termostabile estratta da batteri termofili (che vivono ad elevate temperature). Una DNA polimerasi utilizzata nelle reazioni della PCR è la **Taq polimerasi**, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*. L'isolamento di DNA polimerasi termostabili ha sollevato gli operatori dall'ingrato compito di aggiungere enzima fresco ad ogni ciclo di reazione!

scelta dei primer

Per ogni PCR, è necessario usare due primer (forward e reverse). La scelta della coppia di primer è critica per una buona riuscita della PCR, ovvero per ottenere amplificazione specifica di un tratto di DNA. I primer devono essere "disegnati" a livello di sequenze uniche nel genoma (presenti una sola volta), in modo che possano appaiarsi al DNA solo nella zona di interesse e non in altre zone.

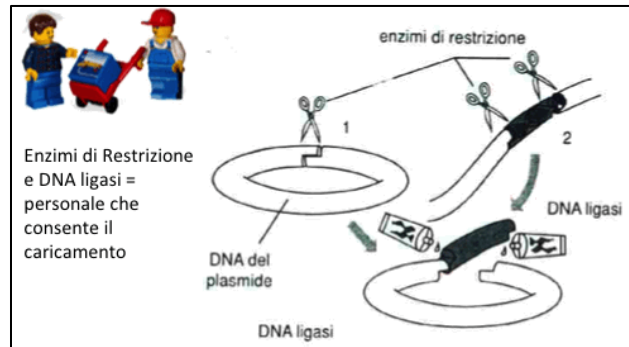
2.2.2 Il mezzo di trasporto: i vettori di clonaggio: Un vettore è una molecola di DNA capace di replicarsi in una cellula ospite. I vettori più frequentemente usati in biotecnologia sono i plasmidi del batterio *Escherichia coli*. I plasmidi sono piccole molecole di DNA circolare a doppio filamento extracromosomici che esistono naturalmente nei batteri, con cui convivono come simionti. Si replicano autonomamente nella cellula ospite, grazie alla presenza di una sequenza di origine (ORI) della replicazione. Molti plasmidi contengono geni che forniscono benefici alla cellula ospite (per esempio geni che codificano enzimi che inattivano gli antibiotici, e quindi conferiscono resistenza ad essi), o geni di trasferimento, che codificano proteine capaci di formare un tubo macromolecolare attraverso cui il DNA plasmidico può essere trasferito ad altre cellule.



I vettori possono essere piccole molecole circolari di DNA, i plasmidi, che possono accogliere frammenti fino a circa 15.000 paia di basi: in alternativa ai plasmidi possono essere utilizzate alcune strutture derivate da virus, in grado di contenere quantità maggiori di materiale genetico (fino a circa 70.000 paia di basi). Esistono inoltre vettori che rappresentano dei veri e propri cromosomi artificiali, ad esempio in lievito (noti come YAC, dall'inglese *Yeast Artificial Chromosomes*) o in batteri (*BAC, Bacterial Artificial Chromosomes*) che permettono l'inserimento di oltre 300.000 paia di basi – cioè oltre lo 0,01% del genoma di un mammifero.

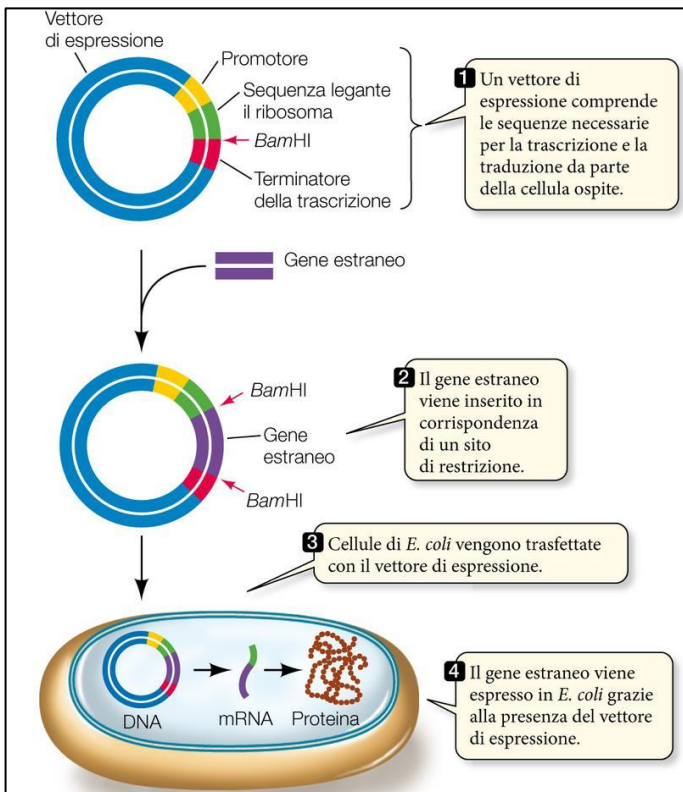
2.2.3 Il taglia e incolla.

Per tagliare il DNA si usano gli **enzimi di restrizione**, detti “forbici molecolari” proprio perchè sono in grado di tagliare il DNA in punti precisi, lasciando delle estremità che possono ricongiungersi ad altre estremità complementari create con lo stesso taglio, con un meccanismo “taglia e incolla” grazie ad un enzima detto **ligasi**.



L'universalità del codice ha ripercussioni

profonde sull'ingegneria genetica, perché ne deriva che un gene umano è scritto nello stesso codice di un gene batterico; perciò i dispositivi di trascrizione e di traduzione di un batterio possono utilizzare anche geni umani, oltre che i propri.



Ciò che cambia però sono i meccanismi che regolano l'inizio e la terminazione dei meccanismi di trascrizione e traduzione. Pertanto perché un gene umano si esprima e il suo prodotto venga sintetizzato dalla cellula batterica la sequenza codificante per la proteina umana deve essere preceduta da un *promotore* batterico che si lega specificamente con l'*RNA polimerasi* batterica, da una particolare sequenza dell'mRNA che gli permette di legarsi al *ribosoma* e succeduta da un *terminatore* batterico della trascrizione. Per risolvere questo tipo di problema, i biologi costruiscono **vettori di espressione** che possiedono tutte le caratteristiche dei vettori tipici con in più le sequenze necessarie affinché un gene estraneo (detto anche *transgene*) si esprima nella cellula ospite.

2.3 Le cellule come fabbriche di farmaci

Grazie alle *biotecnologie* si sintetizzano molti prodotti utili in campo medico, tra i quali vaccini, ormoni proteici e farmaci per trattare l'infarto e l'ictus.

Prodotto	Uso
Fattore di stimolazione delle colonie	Stimola la produzione di leucociti nei pazienti affetti da cancro o AIDS.
Eritropoietina	Previene l'anemia in pazienti sottoposti a dialisi renale e terapia tumorale.
Fattore VIII	Sostituisce il fattore della coagulazione mancante in pazienti con emofilia A.
Ormone della crescita	Sostituisce l'ormone naturale insufficiente in soggetti con crescita ridotta.
Insulina	Stimola l'ingresso del glucosio nelle cellule in soggetti affetti da diabete insulino-dipendente.
Fattore di crescita derivato dalle piastrine	Stimola la guarigione delle ferite.
Attivatore tissutale del plasminogeno	Dissolve i coaguli ematici dopo un infarto del miocardio o un ictus.
Vaccini: epatite B, herpes, influenza, meningite, pertosse	Impiegati nella prevenzione e nel trattamento di alcune malattie infettive.

Un altro modo per ottenere elevate quantità di prodotti utili alla medicina è il cosiddetto *pharming*, la produzione di farmaci proteici prodotti da animali transgenici. Un'applicazione prevede, per esempio, lo sfruttamento di vacche transgeniche nel cui latte si accumulano specifici farmaci antitumorali.

3. La produzione dell'ormone della crescita

3.1 L'ormone della crescita

L'ormone della crescita (somatotropo o GH) è una piccola proteina di 191 amminoacidi, sintetizzato dall'ipofisi, una piccola ghiandola situata al di sotto del cervello, sotto il controllo dell'ipotalamo.

La carenza di ormone della crescita spesso viene diagnosticata in età infantile. Alla nascita, la lunghezza e il peso del bambino sono normali. Solitamente, il rallentamento della velocità di crescita viene notato, verso il terzo anno di vita. Segni caratteristici del deficit, oltre alla bassa statura, sono lo scarso aumento di peso, il ritardo della dentizione, la presenza di uno spesso strato di grasso sottocutaneo, specie sui fianchi e sull'addome.

La prima terapia sostitutiva di ormone somatotropo, portata avanti da Raben nel 19581, era basata sulla somministrazione dell'ormone della crescita di derivazione umana (hGH – humane Growth Hormone), che veniva estratto dall'ipofisi dei cadaveri. La terapia con hGH di estrazione fu sospesa nel 1985, in seguito al decesso di alcuni pazienti colpiti dalla sindrome di Creutzfeldt – Jacob dovuta a ipofisi infette. Questa terapia è stata in seguito sostituita con il GH biosintetico.

L'avvento dell'ingegneria genetica ha reso infatti possibile l'identificazione del gene responsabile per la produzione del GH nell'organismo umano; attualmente GH viene sintetizzato nel batterio *Escherichia coli* grazie all'uso della tecnica del DNA ricombinate.

La sequenza codificante per l'ormone somatotropo umano è stata clonata in un vettore d'espressione ed il DNA ricombinate generato è stato inserito nel batterio. Il peptide (GH) prodotto dai batteri viene poi estratto, purificato ed utilizzato secondo le necessità.

L'ormone della crescita da DNA ricombinante (rGH) che viene utilizzato oggi è strutturalmente, chimicamente e biologicamente equivalente all'ormone umano, ma presenta il vantaggio di essere

maggiormente disponibile (la disponibilità del primo h-GH era correlata alla quantità di cadaveri da cui poteva essere estratto l'ormone stesso). Il GH ricombinante viene prodotto nelle quantità programmate, non da nessun rischio di infezioni ed ha una immunogenicità sensibilmente più bassa rispetto al GH di estrazione.

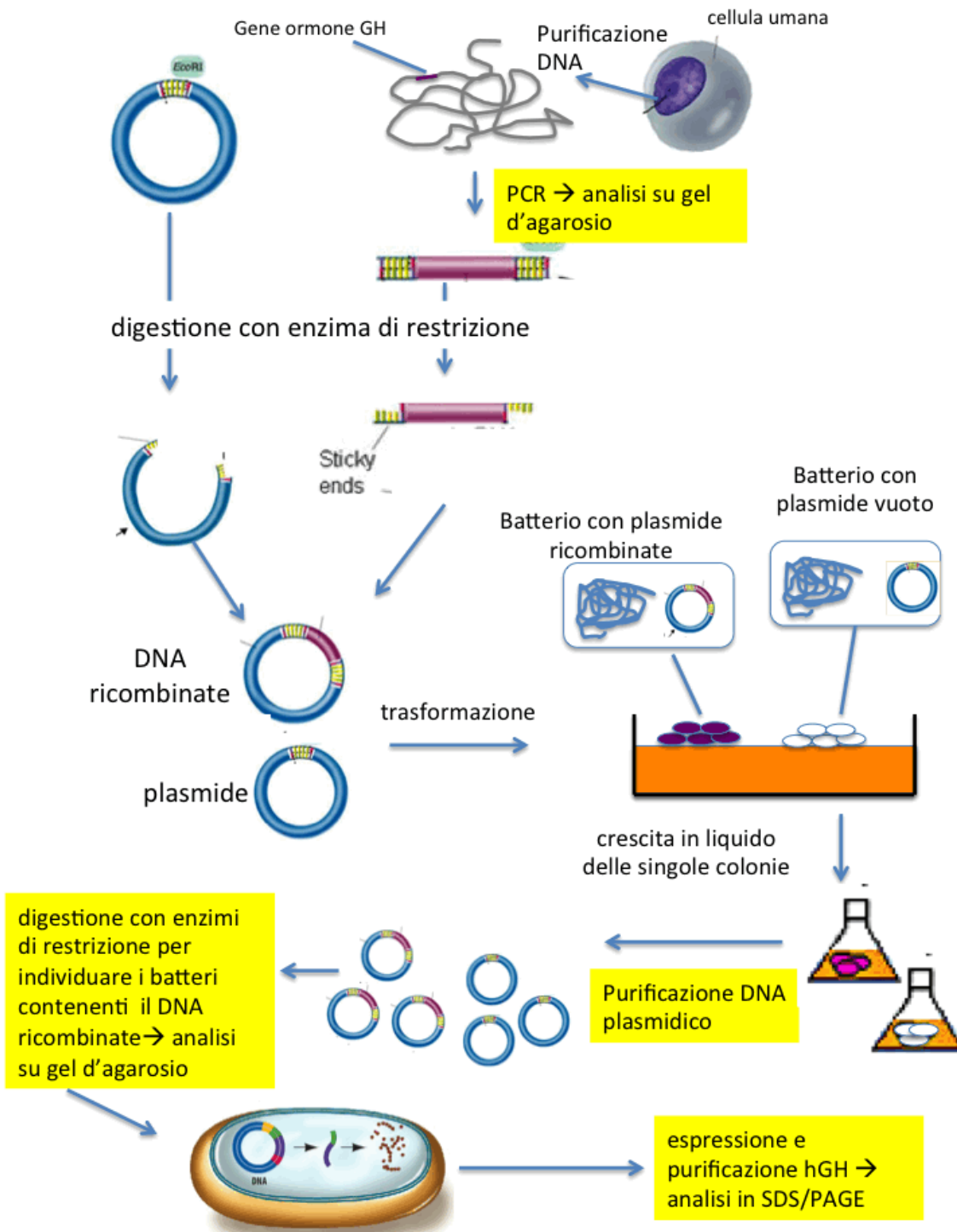


A undici anni, un metro e quaranta scarsi, gli va larga la maglietta. Balla nei pantaloncini enormi, nelle scarpe, per quanto stretti i lacci, un po' ciabatta. È un giocatore fenomenale: però nel corpo di un bimetto di otto anni, non di un adolescente.

↑ Somministrazione ormone della crescita, GH

↓ deficit di accrescimento per carenza di ormone della crescita, GH

3.2. Schema sperimentale



3.1 Isolamento gene d'interesse mediante PCR

Inserire in un tubo eppendorf da 0,2 ul le quantità indicate nell'ordine riportato in tabella

H ₂ O	8 ul
Buffer 5x	4 ul
Primer 10µM ciascuno	2 ul
dNTP 2mM	2 ul
DNA stampo 5ng/ul	2 ul
Taq 2,5U/µl	2 ul

Condizioni PCR:

94 °C	3 min	per 20 cicli
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
4°C	end	

3.2 Analisi dell'inserto

3.2.1 Estrazione del DNA plasmidico su piccola scala

- con un pennarello scrivere una sigla identificativa sulla provetta con la mini prep (coltura batterica) e su una provetta vuota;
- prelevare 500 µl di coltura batterica e trasferirli nella provetta vuota da 1.5 ml (*tubo eppendorf*);
- centrifugare il *tubo eppendorf* 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 in 200 µl di **SOL I** (glucosio 50 mM, EDTA pH 8.0 10 mM, Tris-HCl, pH 8.0 25 mM);
- aggiungere 200 µl di **SOL II** (NaOH 0.2M, SDS 1%) e mischiare per inversione 5-7 volte;
- incubare MAX 5' RT;
- aggiungere 200 µl di **SOL III** (NH₄-acetato 7.5 M) e per inversione 5-7 volte;
- incubare 5' in ghiaccio;
- centrifugare 10' a 13000rpm;
- prelevare 400 µl di coltura batterica e trasferirli nella provetta vuota da 1.5 ml e aggiungere 2 vol di **EtOH 100%**;
- incubare 10' RT;
- centrifugare 15' a 13000rpm;
- eliminare il sopranatante e aggiungere 300 µl di **EtOH 80%**;
- centrifugare 5' a 13000rpm;
- eliminare il sopranatante asciugare il pellet;
- risospendere in 50 µl di **TE 1X**(EDTA pH 8.0 1 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM) **+RnasiA 100ug/ml**

3.2.2 Digestione con un enzima di restrizione

Le reazioni di digestione sono assemblate di norma con 3 unità/µg di DNA da digerire di enzima di restrizione e con il suo tampone specifico, facendo attenzione che il volume di enzima non ecceda il 10% del volume finale di reazione: in questo modo il glicerolo presente negli stock di enzimi non interferisce con l'attività enzimatica. L'incubazione è effettuata per tempi variabili da 1h a O/N (over night, >16h) a seconda dell'enzima e della quantità di DNA da digerire, a una temperatura scelta in base alle specifiche del singolo enzima.

La completezza della reazione è valutata sottoponendo un'aliquota della miscela di reazione a elettroforesi su gel d'agarosio 1% colorato con bromuro d'etidio e confrontando la banda risultante con quella generata da un'aliquota di corrispondente DNA non digerito: un plasmide linearizzato ad esempio, corre più lentamente del suo corrispondente non digerito, circolare, superavvolto e, quindi, più compatto.

		Concentrazione finale
DNA plasmidico	2 ul	Circa 300 ng
Buffer EcoRI 10X		1x
Enzima 0,5 U/ ul		3 U per 1ug DNA
H ₂ O fino a 20 ul		

Incubare 1h a 37 °C

Aggiungere la soluzione di caricamento

Corsa elettroforetica

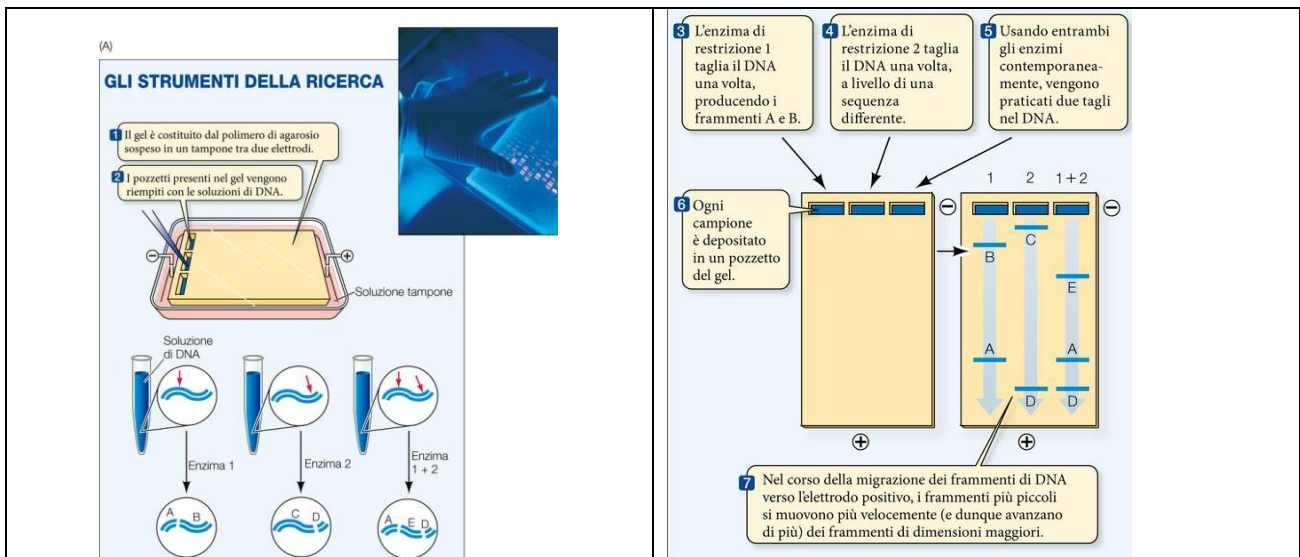
3.3 Elettroforesi di acidi nucleici in gel d'agarosio

Per separare i frammenti di DNA dopo il taglio con gli enzimi di restrizione si utilizza un gel di agarosio un polisaccaride che si ricava dalle alghe. Il gel è posto in uno stampo di forma rettangolare; a una delle estremità del gel si trovano delle piccole cavità verticali chiamate pozzetti, allineate a formare una fila. Ogni campione, composto da una miscela di frammenti di DNA e colorato con una sostanza blu, viene deposto (o «caricato») in un pozzetto, quindi si applica al gel un campo elettrico, con il polo negativo posizionato vicino ai pozzetti e il polo positivo all'estremità opposta.

A pH neutro, il DNA è carico negativamente grazie alla presenza dei gruppi fosfato; poiché le cariche opposte si attraggono, i frammenti di DNA migrano verso il polo positivo del campo elettrico. 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 la 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.

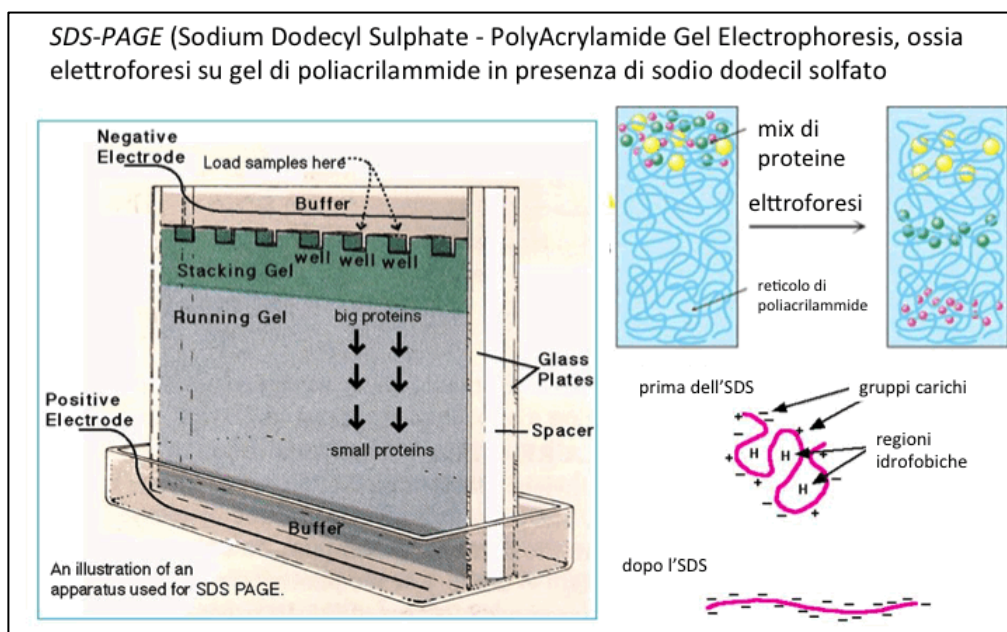
Tampone di corsa	Soluzioni di caricamento (loading buffer)
TAE (Tris/Acido acetico) Tris-acetato 0.04M EDTA 0.001M	Sono costituite da un colorante La loro funzione e': <ul style="list-style-type: none"> • aumentare la densità del campione, • Colorare il campione, rendere visibile la corsa elettroforetica

- I gel sono preparati sciogliendo l'agarosio all'1-1,5% (peso/volume) in TAE, portato alla temperatura di ebollizione.
- Prima che il gel polimerizzi si aggiunge SYBR safe.
- Il gel, lasciato brevemente a raffreddare viene colato in un lettino da elettroforesi di un apparato orizzontale.
- Una volta polimerizzato il gel è posto nell'apparato ed immerso in un tampone di corsa, TAE.
- I campioni da analizzare vengono diluiti in acqua e "loading buffer". Il "loading buffer" appesantisce il campione, facendolo andare sul fondo del pozzetto e consente al contempo di seguire la corsa elettroforetica.
- Si caricano i campioni su gel e si applica una differenza di potenziale di 50/120 V per un tempo variabile dai 5 ai 60 minuti.
- Si visualizzano infine le bande degli acidi nucleici ponendo il gel sotto raggi UV: il SYBR safe che si è intercalato alle basi appare, in queste condizioni, fluorescente.
- Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori con lunghezza in paia di basi (pb) e peso molecolare noti



3.4 Produzione hGH: analisi delle proteine in SDS/PAGE

La SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione di proteine in un campo elettrico in base alle loro dimensioni. Si opera in condizioni denaturanti, trattando il campione con sodio-dodecil solfato (SDS), un detergente anionico in grado di rompere le interazioni non covalenti delle proteine, e β mercaptoetanolo, agente riducente per i ponti disolfuro. In media una molecola di SDS si inserisce ogni due residui amminoacidici: il rapporto carica - massa nativo delle proteine presenti nel campione è quindi reso uniforme dal detergente per tutte le molecole proteiche, permettendo una separazione in base al loro peso molecolare. Per tutte le corse elettroforetiche è stato seguito il metodo descritto da Laemmli (1970). I gel di poliacrilammide sono stati preparati facendo copolimerizzare l'acrilammide e la bisacrilammide (capace di creare legami crociati) in presenza di catalizzatori come il persolfato d'ammonio (APS) e tetrametiletildiammina (TEMED). I gel si compongono di due parti: una porzione superiore di compattamento, anche detto stacking gel, (acrilamide 3%, Tris-HCl pH 6,8 0,125 M, SDS 0,1%) ed una porzione inferiore di separazione, anche detto resolving gel, contenete la concentrazione di acrilamide ideale per l'analisi della proteina d'interesse (Tris-HCl pH 8,8 0,375 M, SDS 0,1%). Dopo l'aggiunta ai campioni del buffer di caricamento Laemmli buffer 5X (Tris-HCl 250mM pH 6.8, SDS 5%, glicerolo 50%, β -mercaptoetanolo 5% e blu di bromo fenolo 0.05%), i campioni di proteine sono stati trattati a 95° C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle catene polipeptidiche. Il tampone di corsa è costituito da 50 mM Tris, 3.5 mM SDS, 38 mM glicina; la corsa viene, inoltre effettuata ad un amperaggio costante di 15 mA per lo stacking gel e 30 mA per il resolving gel. Terminata la corsa elettroforetica, i gel sono sottoposti a colorazione in Blue Coomassie (metanolo 20%, acido acetico 10% e Coomassie R 250 0.25%) e decolorazione (metanolo 30% e acido acetico 10%).



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 sospesi 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 regolarmente, 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 disposable (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 ugual 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