

# **CORSO “LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE” a.a. 2024-2025**

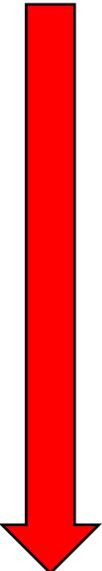
**Seconda parte**

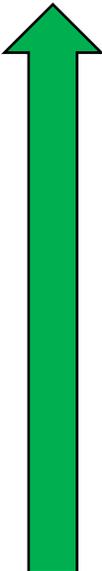
**Lezione 1**

Dott.ssa Melania Eva Zanchetta

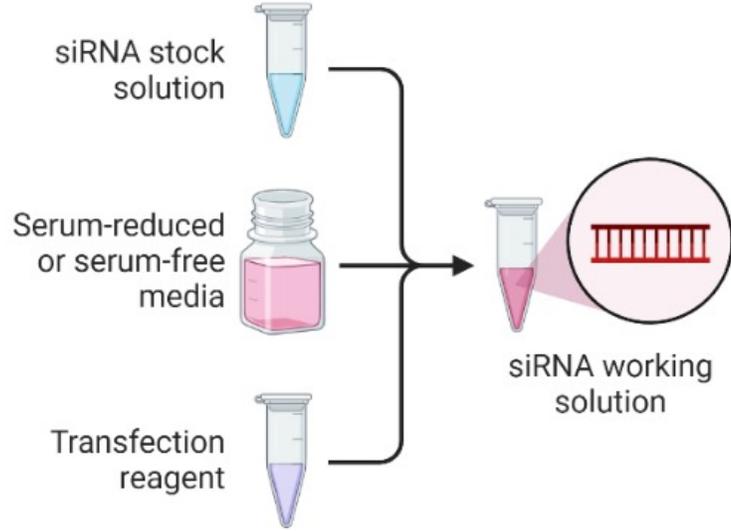
[melaniaeva.zanchetta@burlo.trieste.it](mailto:melaniaeva.zanchetta@burlo.trieste.it)

# Valutazione dell'attivazione della risposta infiammatoria mediante analisi dell'espressione di *CCL5* nelle cellule U2OS dopo knock-down del gene *SFPQ*

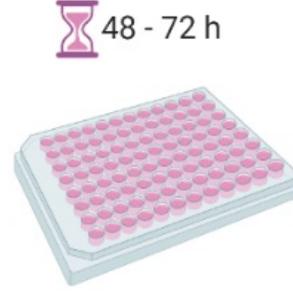
- 
- ***SFPQ*** (Splicing Factor Proline And Glutamine Rich)
  - DNA- and RNA binding protein
  - nuclear protein first identified as a splicing factor, that participates to several cellular activities, including RNA transport, apoptosis, and DNA repair
  - Essential pre-mRNA splicing factor required early in spliceosome formation

- 
- ***CCL5*** (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*)
  - Member of the Chemokines superfamily
  - CC subfamily
  - functions as one of the natural ligands for the chemokine receptor chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5)
  - Induced during the later stage of inflammation

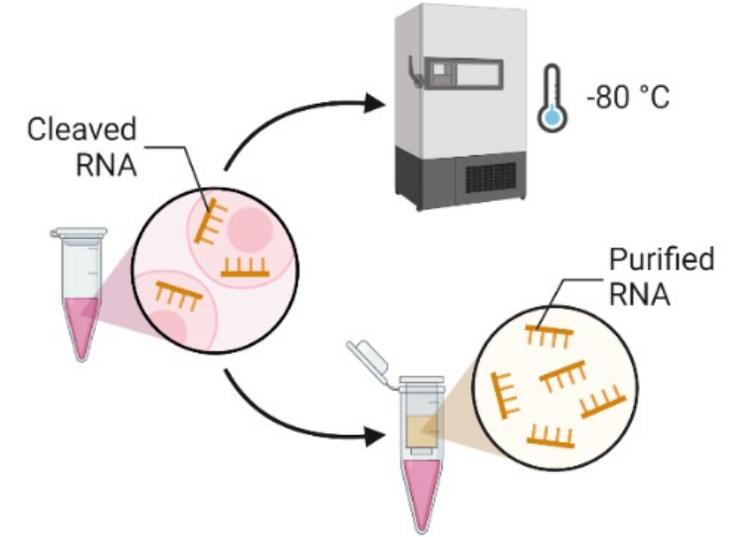
1 Combine siRNA stock solution with media and mix gently



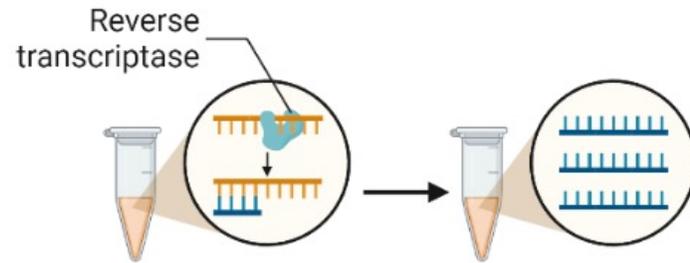
2 Add siRNA working solution to cells and incubate for 48-72 hours



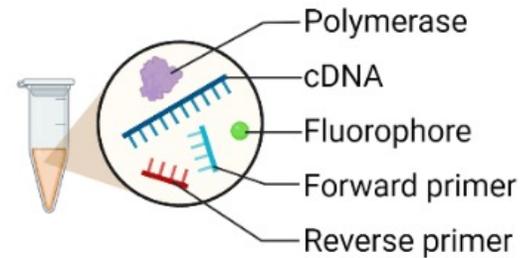
3 Collect cells and store in  $-80^{\circ}\text{C}$  or proceed directly to RNA isolation



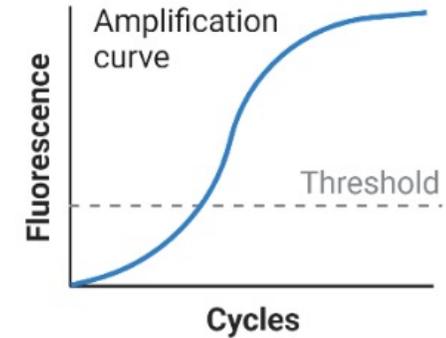
4 Reverse transcription of purified RNA to cDNA



5 Store cDNA in  $-20^{\circ}\text{C}$  or amplify directly by qPCR



6 Measure mRNA knockdown with Ct values



# PROGRAMMA SECONDA PARTE PRATICA

- **1- TRASFEZIONE TRANSIENTE PER SILENZIAMENTO GENICO** (Zanchetta)

Metodiche di trasfezione. Trasfezione di siRNA in cellule U2OS con Lipofectamina. Allestimento individuale della reazione.

- **2- ISOLAMENTO DELL'RNA TOTALE DA CELLULE** (Zanchetta)

Estrazione individuale dell'RNA totale da cellule U2OS con l'utilizzo di kit commerciale. Quantificazione mediante spettrofotometria UV e calcolo della concentrazione del campione ottenuto. Valutazione della purezza dell'RNA isolato.

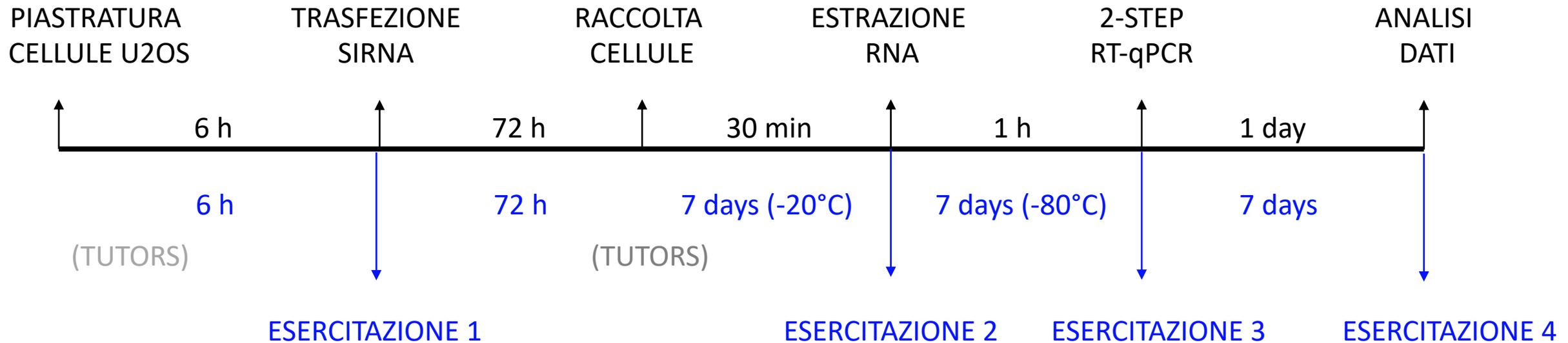
- **3- RETRO-TRASCRIZIONE DA RNA TOTALE** (Zanchetta)

Diluizione del campione di RNA estratto in precedenza. Allestimento individuale della reazione di retro-trascrizione con l'utilizzo di kit commerciale. Diluizione del cDNA sintetizzato. Allestimento delle reazioni di RT-qPCR.

- **4- LA PCR QUANTITATIVA** (Schoeftner)

- Analisi dei dati ottenuti dalla RT-qPCR e quantificazione dell'espressione dei geni amplificati. Analisi qualitativa dei dati.

# SCHEMA SPERIMENTALE



# PROGRAMMA SECONDA PARTE PRATICA

- **1- TRASFEZIONE TRANSIENTE PER SILENZIAMENTO GENICO** (Zanchetta)

Metodiche di trasfezione. Trasfezione di siRNA in cellule U2OS con Lipofectamina. Allestimento individuale della reazione.

- **2- ISOLAMENTO DELL'RNA TOTALE DA CELLULE** (Zanchetta)

Estrazione individuale dell'RNA totale da cellule U2OS con l'utilizzo di kit commerciale. Quantificazione mediante spettrofotometria UV e calcolo della concentrazione del campione ottenuto. Valutazione della purezza dell'RNA isolato.

- **3- RETRO-TRASCRIZIONE DA RNA TOTALE** (Zanchetta)

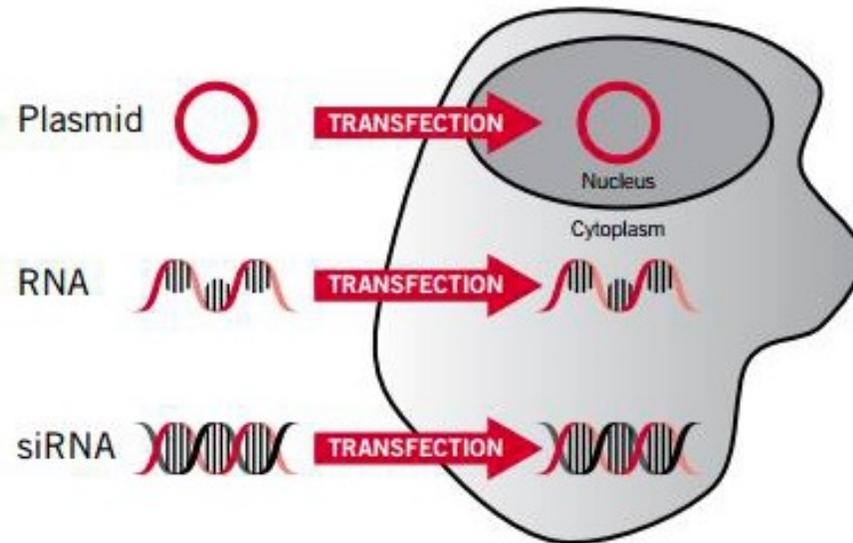
Diluizione del campione di RNA estratto in precedenza. Allestimento individuale della reazione di retro-trascrizione con l'utilizzo di kit commerciale. Diluizione del cDNA sintetizzato. Allestimento delle reazioni di RT-qPCR.

- **4- LA PCR QUANTITATIVA** (Schoeftner)

- Analisi dei dati ottenuti dalla RT-qPCR e quantificazione dell'espressione dei geni amplificati. Analisi qualitativa dei dati.

# TRASFEZIONE

Tecnica di manipolazione genica che permette di introdurre materiale genetico esogeno (DNA, RNA) in cellule di mammifero per lo studio della funzione e dei meccanismi di regolazione GENICA



# TIPI DI TRASFEZIONE

## TRANSIENTE

- per esperimenti a **breve termine**: le cellule raccolte **48-72 h** dopo la trasfezione
- over-espressione /**silenziamento genico**

### Problemi:

- **popolazione** cellulare **disomogenea**: poche cellule con molto plasmide
- dopo circa 72hr si perde effetto della trasfezione:
- A ogni mitosi raddoppiano le cellule e si dimezza la quantità di DNA/RNA trasfettato in rapporto alle cellule.

## STABILE

- per esperimenti a lungo termine
- possibilità di **isolare e propagare singoli cloni** contenenti il materiale trasfettato
- **il plasmide si integra nel genoma**, processo lungo e laborioso
- **l'integrazione è casuale**
- necessario **marker di selezione** (tag, morfologia, resistenza a antibiotici)
- **popolazione cellulare omogenea**: molte cellule con poco plasmide

# TIPI DI TRASFEZIONE

## TRANSIENTE

- per esperimenti a **breve termine**: le cellule raccolte **48-72 h** dopo la trasfezione
- over-espressione / **silenziamento genico**

### Problemi:

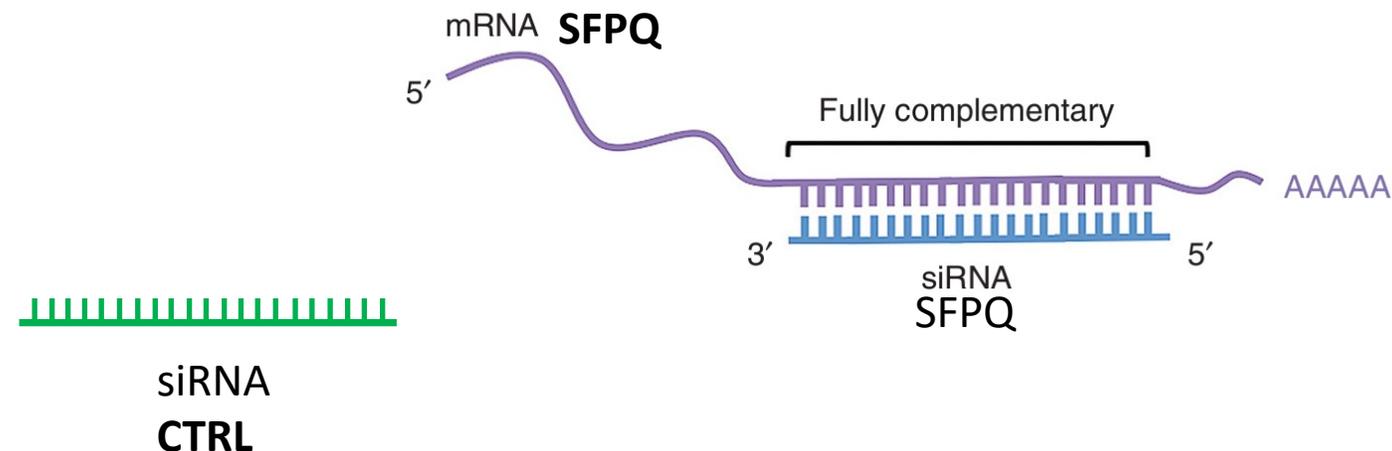
- **popolazione** cellulare **disomogenea**: poche cellule con molto plasmide
- dopo circa 72hr si perde effetto della trasfezione:
- A ogni mitosi raddoppiano le cellule e si dimezza la quantità di DNA/RNA trasfettato in rapporto alle cellule.

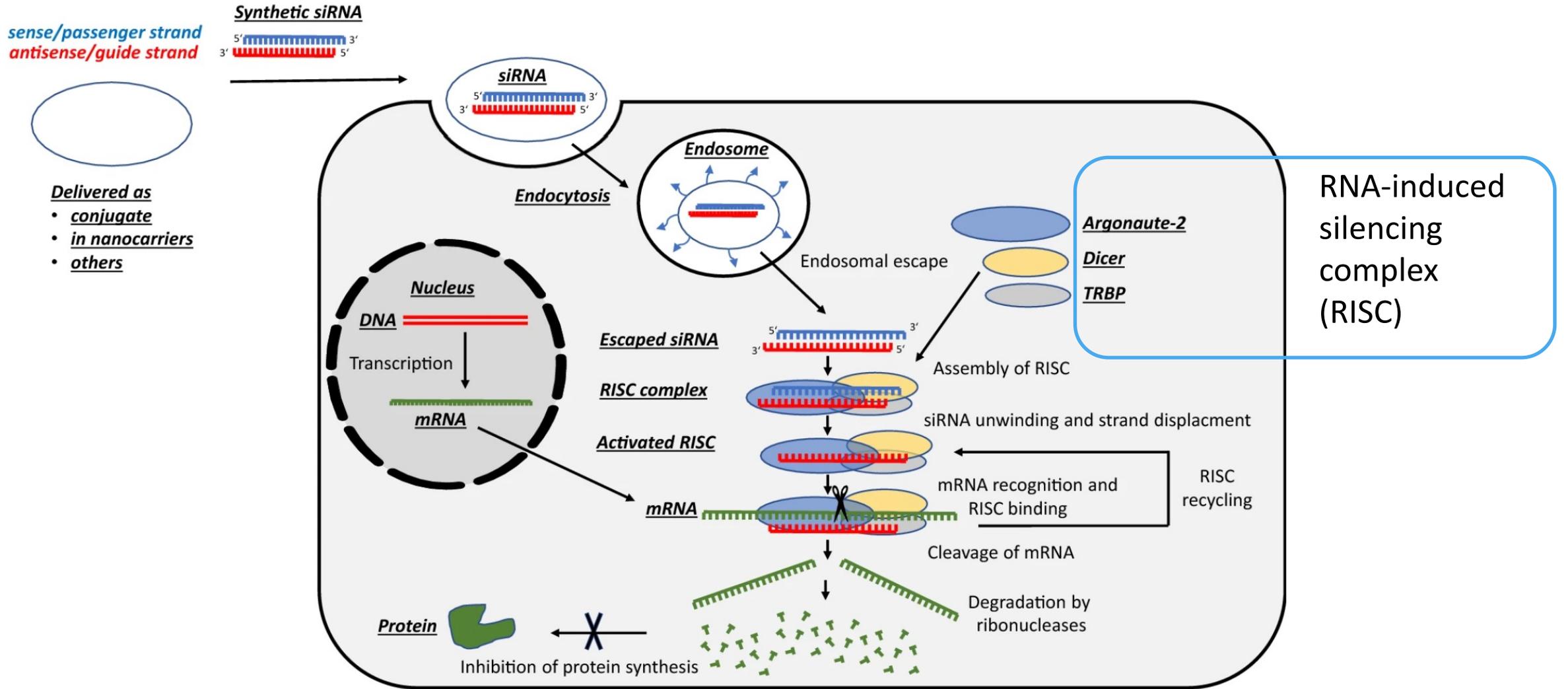
## STABILE

- per esperimenti a lungo termine
- possibilità di **isolare e propagare singoli cloni** contenenti il materiale trasfettato
- **il plasmide si integra nel genoma**, processo lungo e laborioso
- **l'integrazione è casuale**
- necessario **marker di selezione** (tag, morfologia, resistenza a antibiotici)
- **popolazione cellulare omogenea**: molte cellule con poco plasmide

# SILENZIAMENTO GENICO MEDIANTE SMALL INTERFERING RNA (siRNA)

- siRNA possono down-regolare l'espressione di geni target in maniera sequenza-specifica tramite la degradazione dell'mRNA target (post-transcriptional gene silencing)
- In biologia molecolare l'RNA interfering è utile per determinare il contributo individuale di un gene rispetto ad uno o più fenotipi cellulari

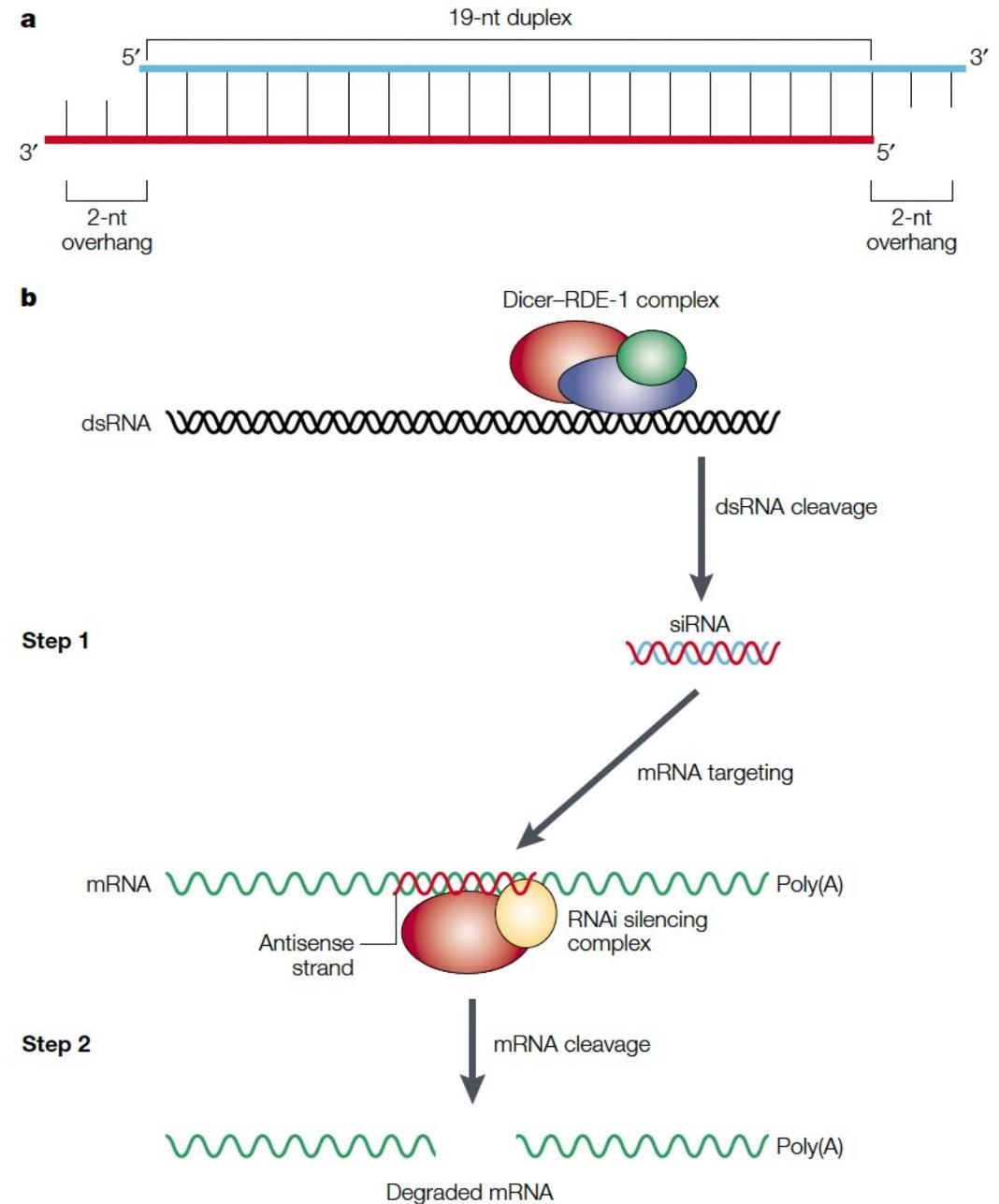




RNA-induced silencing complex (**RISC**) >> comprende diverse proteine tra cui **Argonaute-2** (Ago-2), **Dicer** e transactivation response element RNA-binding protein (**TRBP**)

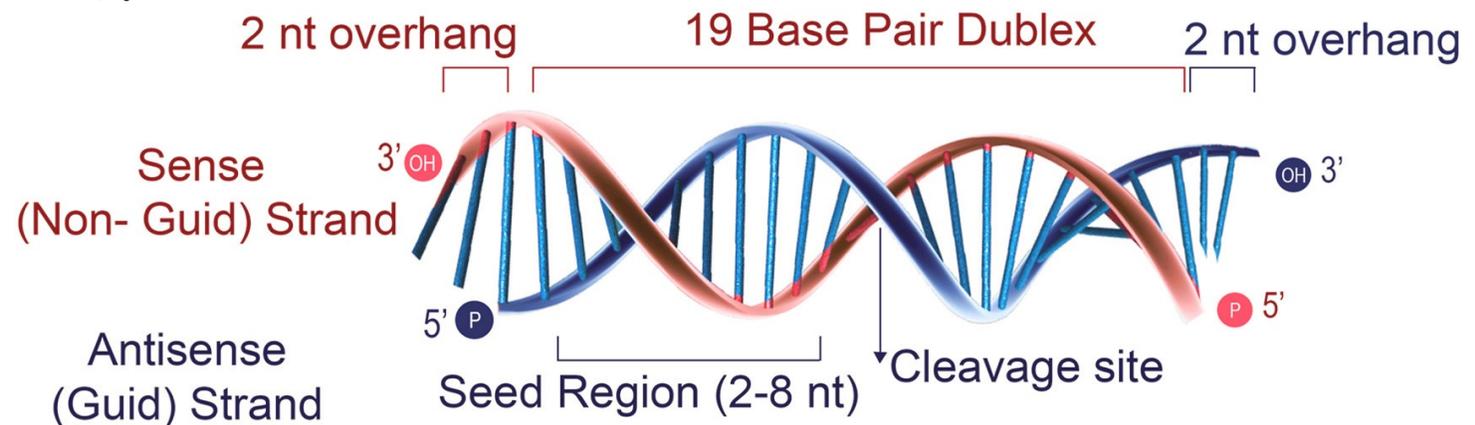
# siRNA: MECCANISMO

1. L'RNA lungo a doppio filamento (dsRNA) viene processato dal complesso Dicer-RDE-1 per formare i siRNA.
2. I siRNA sono tipicamente costituiti da due RNA a singolo filamento di 21 nucleotidi (nt) che formano un duplex di 19 bp con sporgenze di 2 nt 3'. Il filamento senso viene rimosso
3. Il filamento antisenso del siRNA viene utilizzato da un complesso di silenziamento RISC per guidare il taglio dell'mRNA, promuovendone la degradazione



# siRNA: DISEGNO

- Due filamenti di RNA (dsRNA) formano un duplex lungo 21 bp con sporgenze si 2nt al 3' su ciascun filamento. Il filamento antisenso è un perfetto reverse complement dell'mRNA bersaglio.
- I siRNA ben progettati possono portare a una riduzione >90% dell'RNA target
- i dsRNA da 21nt sono i più efficaci
- la specificità della sequenza è importante - i bp-mismatch singoli riducono la capacità di silenziamento
- Di solito si testano 3-4 siRNA e poi si sceglie il migliore
- Possono essere modificati chimicamente
- esistono siRNA commerciali già validati/pool



### General features an siRNA should have:

to prevent unspecific or weak binding to the target mRNA, to allow unwinding and RISC incorporation:

- GC content of an siRNA ~30 - 60%

to ensure preferential loading of the antisense strand:

- asymmetrical nucleotide content
- weak base pairing at the 5'-end of the antisense strand

### General features that should be avoided:

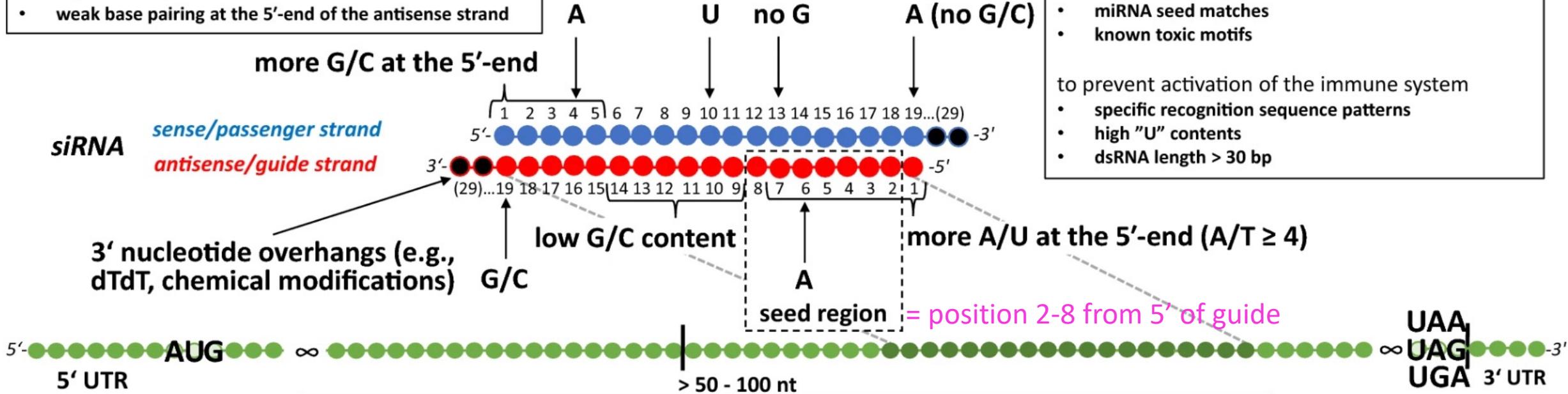
to prevent off-target effects or poor target mRNA binding:

- secondary structures in the sense or antisense stand
- internal repeats
- palindromes
- CCC or GGG sequences
- miRNA seed matches
- known toxic motifs

to prevent activation of the immune system

- specific recognition sequence patterns
- high "U" contents
- dsRNA length > 30 bp

## siRNA design



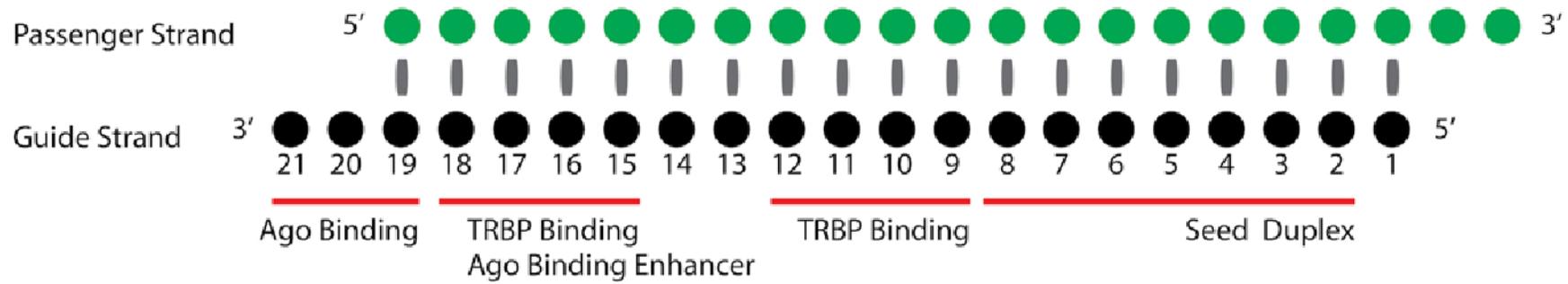
### mRNA target position

- avoid single nucleotide polymorphisms (SNPs)
- exclude sequences that are not present in all relevant transcript variants or identify relevant variants expressed by target cells
- sequences close to the start codon are possible but not recommended
- selecting regions in the ORF about 50–100 nucleotides downstream of the start codon
- siRNAs closer to the start codon are more efficient than those further downstream
- 5'UTR (and 3'UTR) of mRNAs are not recommended
- avoid local target secondary structures

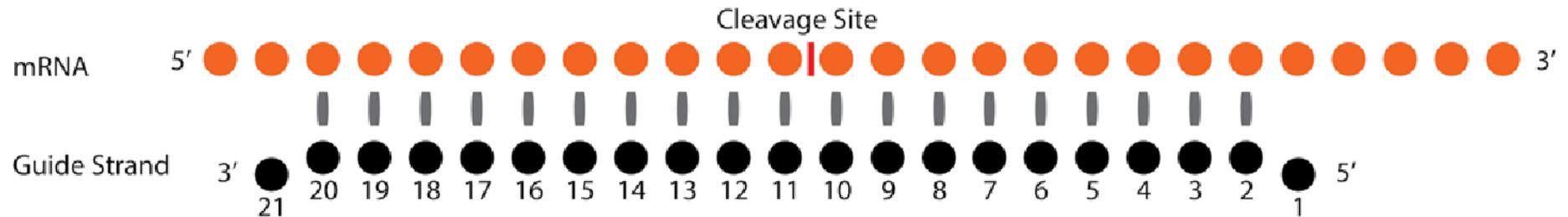
target mRNA

# Mechanism of siRNA-Mediated Gene Silencing

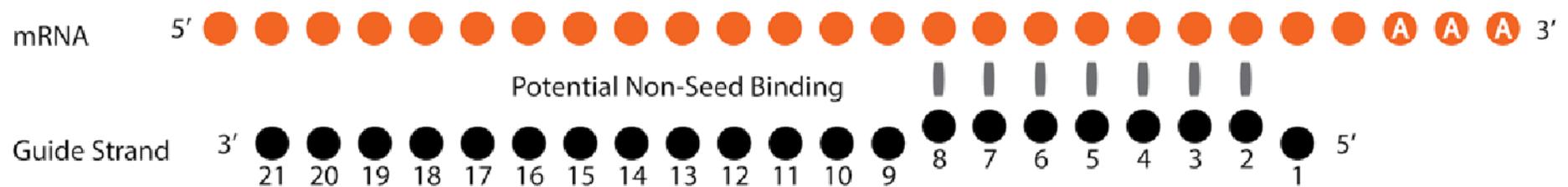
## (A) siRNA Duplex



## (B) On-Target



## (C) Seed-Dependent Off-Target



# siRNA: CONTROLLI DA USARE

- CONTROLLO NON TRATTATO (controllo di trasfezione)

Un controllo non trattato stabilisce un riferimento di base per i fenotipi cellulari e i livelli di espressione genica (solo mix di trasfezione)

- CONTROLLO «POSITIVO»

Un controllo positivo ben caratterizzato consente di assicurarsi che il metodo di trasfezione sia sufficiente per ottenere un silenziamento efficace (siRNA contro target noto costitutivamente espresso/ siRNA GFP)

- CONTROLLO «NEGATIVO»

I controlli negativi aiutano a separare gli effetti specifici della sequenza dagli effetti delle condizioni sperimentali sulle risposte cellulari (non-targeting siRNA)

# siRNA: CONTROLLI DA USARE

- CONTROLLO NON TRATTATO

Un controllo non trattato stabilisce un riferimento di base per i fenotipi cellulari e i livelli di espressione genica (solo mix di trasfezione)

- CONTROLLO «POSITIVO»

Un controllo positivo ben caratterizzato consente di assicurarsi che il metodo di trasfezione sia sufficiente per ottenere un silenziamento efficace (siRNA contro target noto costitutivamente espresso/ siRNA GFP)

- CONTROLLO «NEGATIVO»

I controlli negativi aiutano a separare gli effetti specifici della sequenza dagli effetti delle condizioni sperimentali sulle risposte cellulari (non-targeting siRNA)

# SCELTA DEL MODELLO CELLULARE

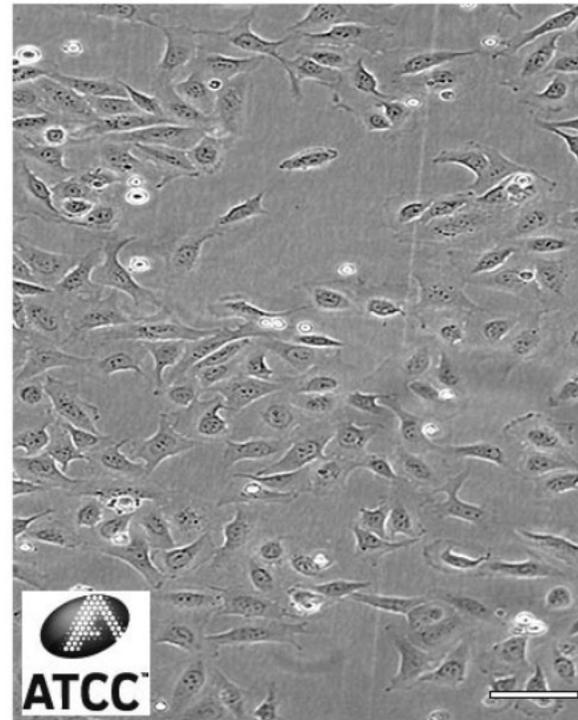
## U2OS

- La trasfezione può essere eseguita su cellule primarie, tumorali o immortalizzate
- Non tutte le cellule possono essere trasfettate con successo >  
**EFFICIENZA**
- Necessaria una fonte abbondante di cellule di partenza per ottenere un numero utilizzabile di cellule trasfettate
- Se possibile scegliere: **Linee cellulari immortalizzate**

# SCELTA DEL MODELLO CELLULARE U2OS

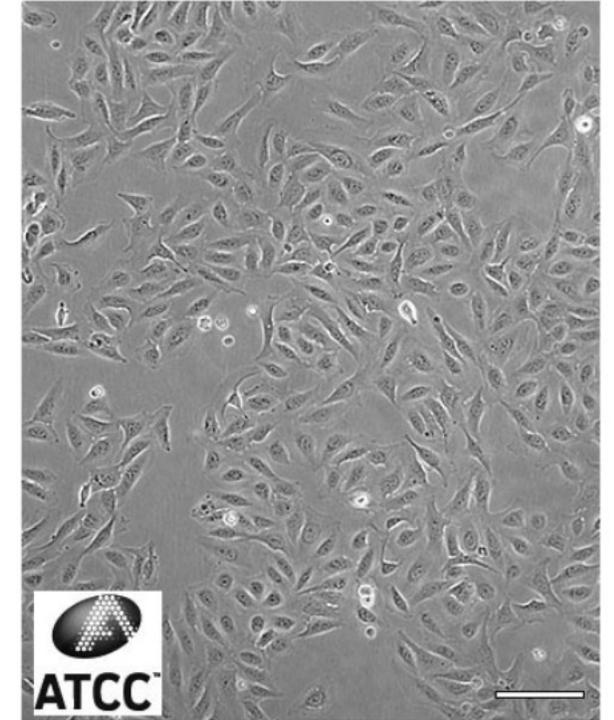
- Linea cellulare con morfologia epiteliale
- derivata nel 1964 da un sarcoma moderatamente differenziato della tibia di una donna bianca di 15 anni affetta da osteosarcoma.
- Le cellule crescono formando uno strato continuo (confluente), dello spessore di una singola cellula (monostrato).

ATCC Number: **HTB-96**™  
Designation: **U-2 OS**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

# METODICHE DI TRASFEZIONE

## 1) METODI CHIMICI

utilizzano molecole carrier che neutralizzano o conferiscono una carica positiva agli acidi nucleici

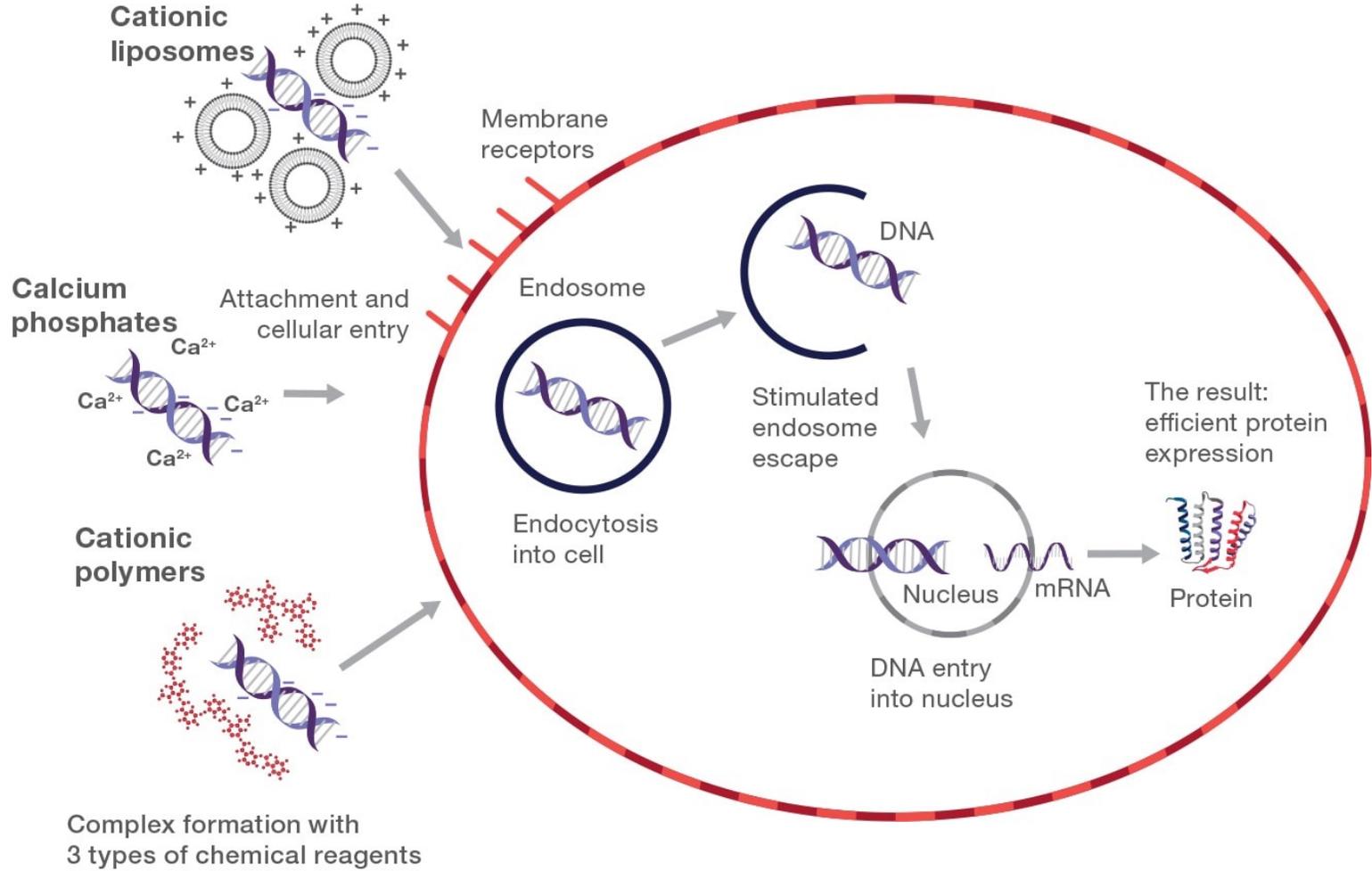
## 2) METODI FISICI

consentono di far entrare gli acidi nucleici direttamente nel citoplasma o nel nucleo della cellula senza l'uso di molecole portanti chimiche

## 3) METODI BIOLOGICI

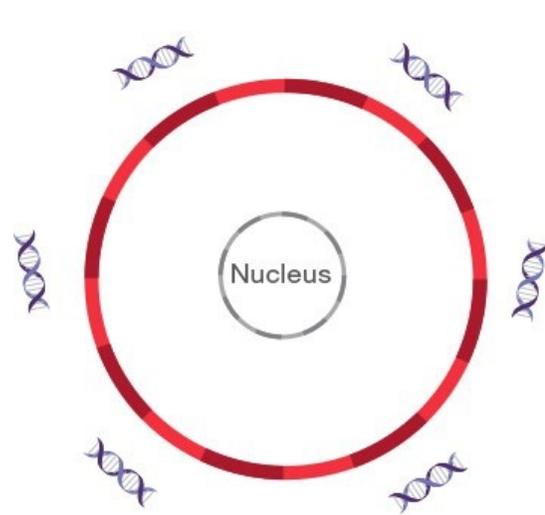
utilizzano virus geneticamente modificati per trasferire acidi nucleici nelle cellule

# METODICHE DI TRASFEZIONE METODI CHIMICI



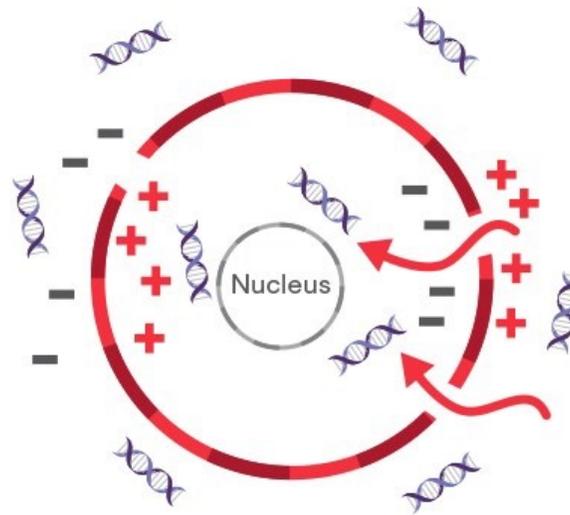
# METODICHE DI TRASFEZIONE

## METODI FISICI



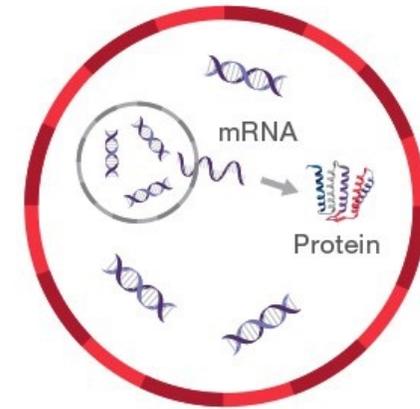
Before electroporation

The cell membrane is intact and DNA/CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) etc. are outside



During electroporation

Electric field is induced across the cell membrane; pores form and DNA/CRISPR-Cas9 RNP etc. enter cells

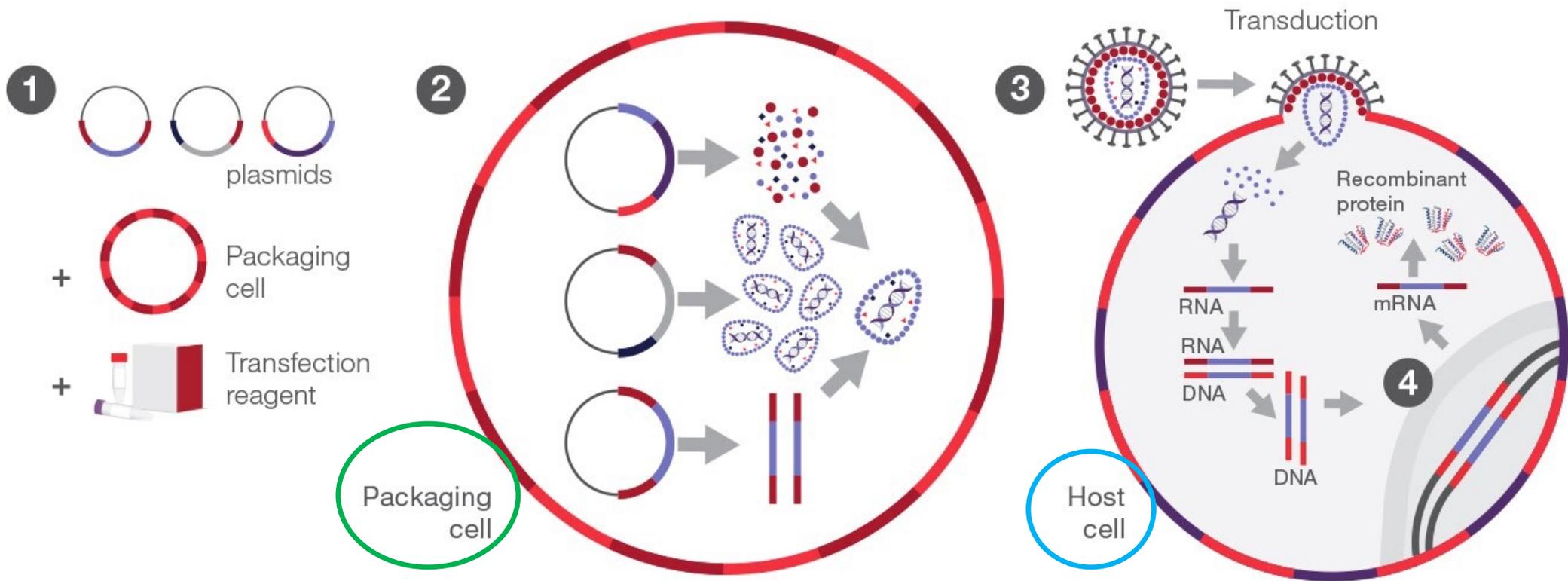


After electroporation

The cell membrane recovers, DNA/CRISPR-Cas9 RNP etc. are delivered into the cytoplasm and nucleus; this results in effective modulation of the protein expression level

# METODICHE DI TRASFEZIONE

## METODI BIOLOGICI



1. Packaging cells (e.g., 293) are transfected with 3–4 plasmids encoding the gene of interest, packaging machinery proteins, and necessary viral proteins.

2. Virus is assembled in the packaging cells containing gene of interest. It is then harvested and purified.

3. The virus infects the host cells, releasing the gene of interest.  
4. Protein expression

# METODICHE DI TRASFEZIONE

## SCELTA DEL METODO PIÙ ADATTO

<b>Selection criteria</b>	<b>Cationic lipid-based <i>Chemical method</i></b>	<b>Electroporation <i>Physical method</i></b>	<b>Viral delivery <i>Biological method</i></b>
<b>Efficiency: easy-to-transfect cells</b>	+++	+++	+++
<b>Efficiency: hard-to-transfect cells</b>	++	+++	+++
<b>Cell viability</b>	+++	++	+++
<b>Delivery of large payload (&gt;7 kb)</b>	++	+++	++
<b>High-throughput suitability</b>	+++	++	+++
<b>Ease of use</b>	+++	+++	+
<b>Biosafety</b>	+++	+++	+
<b>Cost per reaction</b>	+++	++	+

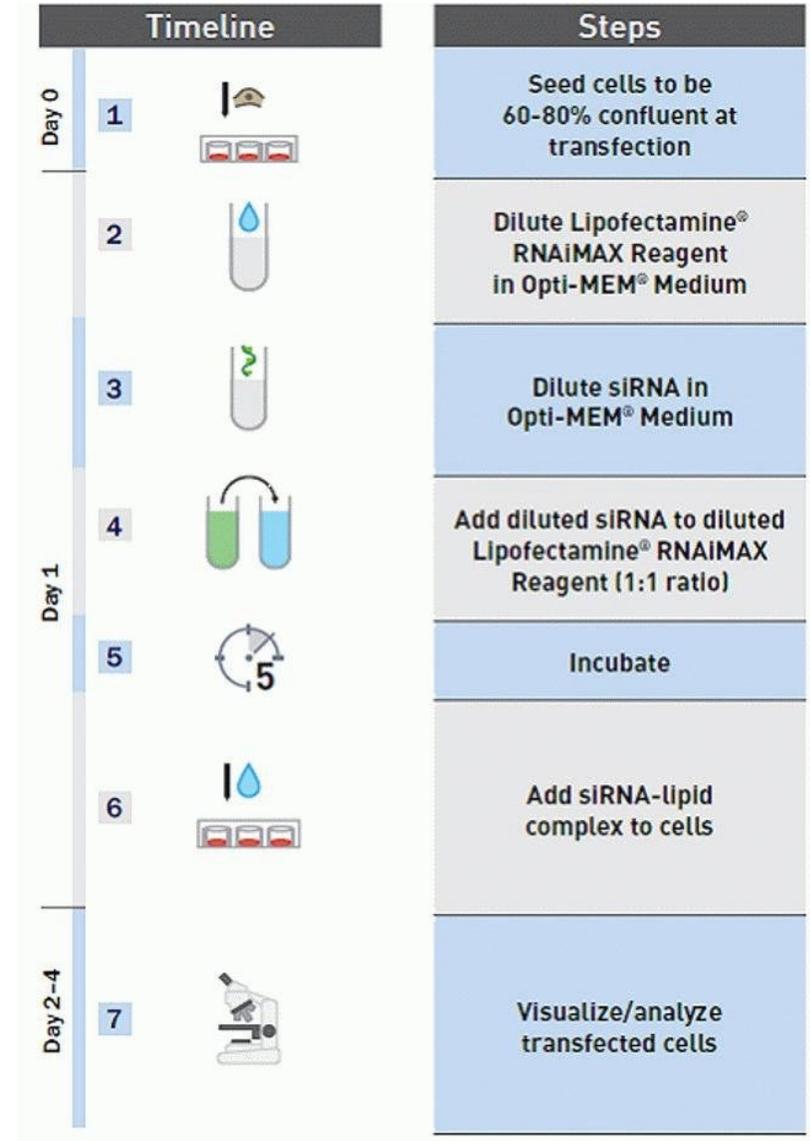
+++ Excellent for most applications; ++ Good for some applications; + Least recommended, but may be appropriate for some applications.

# LIPOFECTAMINE™ RNAiMax

- Reagente di trasfezione a formulazione lipidica cationica specifica per la veicolazione di siRNA
- Questa tecnica si basa sulla capacità di alcuni lipidi cationici di complessare il l'RNA (carico negativamente) formando dei liposomi e rilasciarlo nelle cellule fondendosi con la membrana plasmatica.
- Formazione di complessi RNA-lipide



Protocollo consigliato dalla ditta va ottimizzato per il proprio esperimento



# PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

## STRUMENTAZIONE:

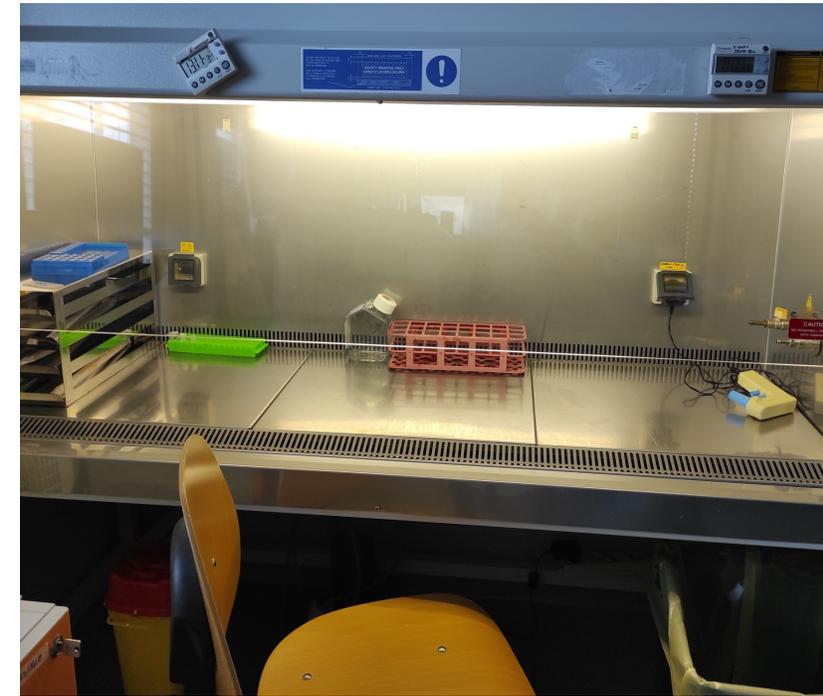
- Pipette e puntali sterili (20, 200, 1000ul)
- Provette da 1,5 ml
- Vortex
- Microcentrifuga
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

## MATERIALE:

- Piastra a 6 pozzetti con cellule U2OS
- Falcon da 50 ml con SOLUZIONE O
- Falcon da 50 ml con soluzione L
- Tubino da 1,5 ml con siRNA C (NUMERI PARI) – in ghiaccio
- Tubino da 1,5 ml con siRNA S (NUMERI DISPARI) – in ghiaccio



Opti-MEM™ 1  
Reduced  
Serum Medium



# PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

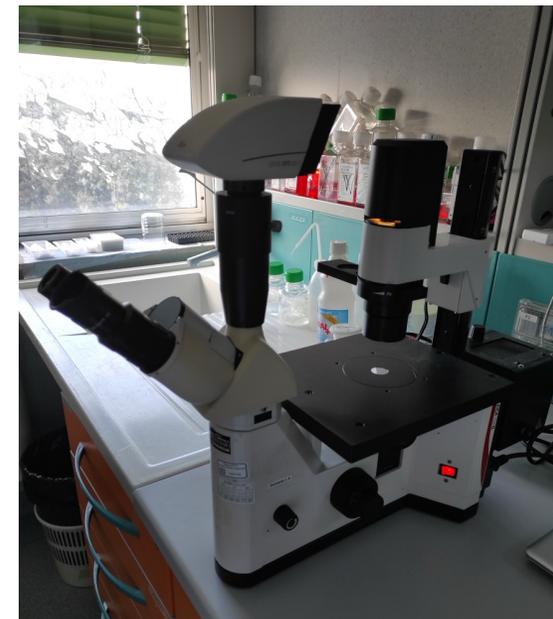
## PROCEDIMENTO:

- TEMPO STIMATO PER UNA REAZIONE 25'
- PRIMA di INIZIARE:
- 1) Controllare le cellule nelle piastre da 6 pozzetti e scegliere un numero:

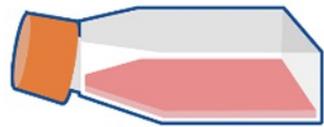
(1 turno: 1-24) (2 turno 25-48) (3 turno 49 – 72)

Questo numero verrà mantenuto da ogni studente per le esercitazioni successive

- 2) Osservare le cellule al microscopio e verificare che siano attaccate e distribuite in maniera omogenea nella piastra

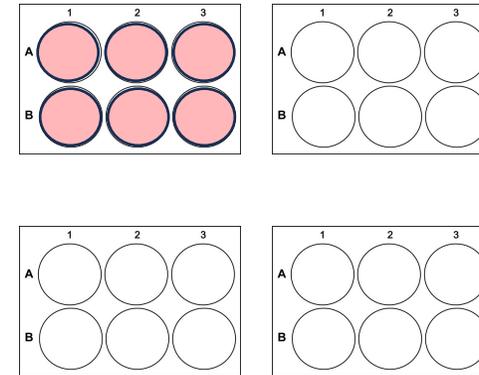


# PIASTRATURA CELLULE U2OS



Staccare le cellule con tripsina, lavare e risospendere le cellule nel terreno di coltura

Contare le cellule e piastare 120000 cellule/pozzetto



Gruppo 1: 1-24  
Gruppo 2: 25-48  
Gruppo 3: 49-72

50-60% confluenza

Le cellule crescono in terreno completo di siero e antibiotici, che generalmente vanno rimossi al momento della trasfezione

# PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

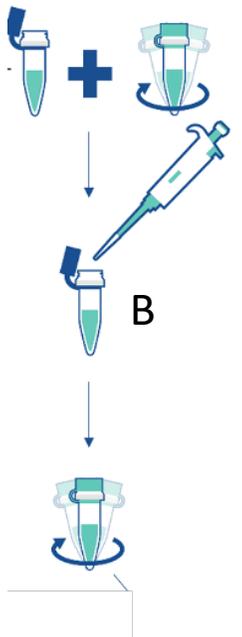
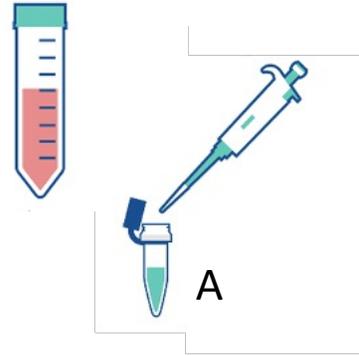
LAVORARE SOTTO CAPPAA a FLUSSO LAMINARE

3) PREPARAZIONE **SOLUZIONE CONTENENTE IL REAGENTE DI TRASFEZIONE** nella **PROVETTA A**: prelevare **150 µl** di **soluzione L** e inserirla in un tubino da 1,5 ml (siglare con numero pari o dispari da 1 a 24)

4) PREPARAZIONE **SOLUZIONE CONTENENTE i siRNA** nella **PROVETTA B**: In un nuovo tubino inserire **120 µl soluzione O** (siglare con numero pari o dispari da 1 a 24)

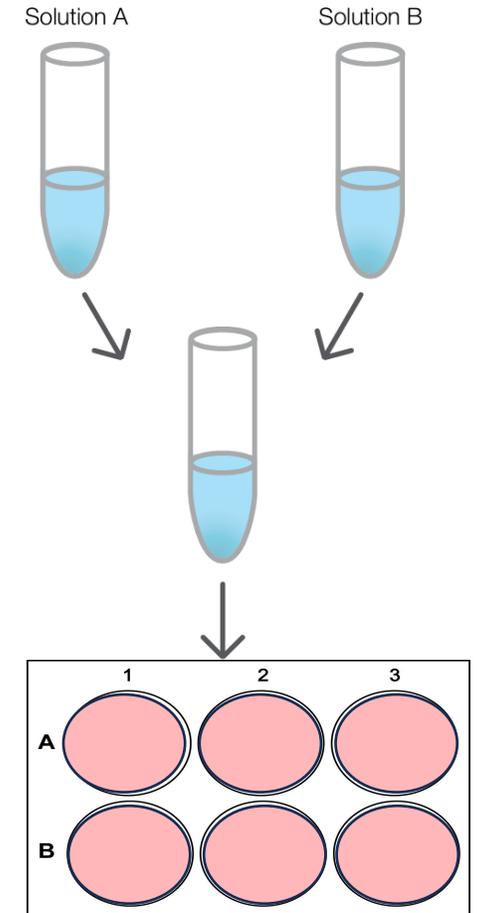
OPTI-MEM: terreno privo di siero e antibiotici

5) Prelevare **30 µl** di **siRNA C** (numero pari) OPPURE **siRNA S** (numero dispari) e aggiungerli nella **provetta B** contenente la **soluzione O**. Vortex e spin 5 sec.



# PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

- 6) Prelevare **150  $\mu$ l** della **mix A** e inserire nella provetta contenente **150  $\mu$ l** di **mix B** senza spipettare. Vortexare brevemente e spin 5 sec.
- 7) Incubare la reazione **20 min** a temperatura ambiente
- 8) Prelevare **300  $\mu$ l** della soluzione di trasfezione preparata al punto 5 e distribuire goccia a goccia sulle cellule di un pozzetto della piastra a 6 pozzetti (fare attenzione perché la soluzione è molto viscosa)
- 9) Muovere lentamente con movimenti circolari la piastra per mescolare bene
- 10) Rimettere le cellule in incubatore a 37°C. Le cellule verranno raccolte dai tutors a **72 ore** di distanza per le analisi successive.



# ISTRUZIONI STESURA RELAZIONE

Scrivere una relazione (max una pagina, Calibri 12 pt, interlinea 1.5)  
dell'attività svolta in laboratorio indicando:

- NOME E COGNOME
- DATA
- TITOLO dell'attività (cosa devo fare)
- SCOPO dell'attività (perché lo faccio)
- PROCEDURA (come lo faccio)
- RISULTATI (cosa mi aspetto di ottenere o cosa ho ottenuto)
- Eventuali commenti

Caricare il file su moodle entro 48 ore dalla fine dell'attività (ore 18)

Eventuali modifiche sulla consegna verranno comunicate

