

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

Seconda parte

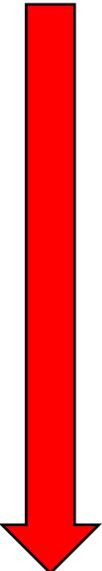
Lezione 2

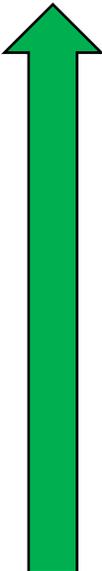
20/11/24

Dott.ssa Melania Eva Zanchetta

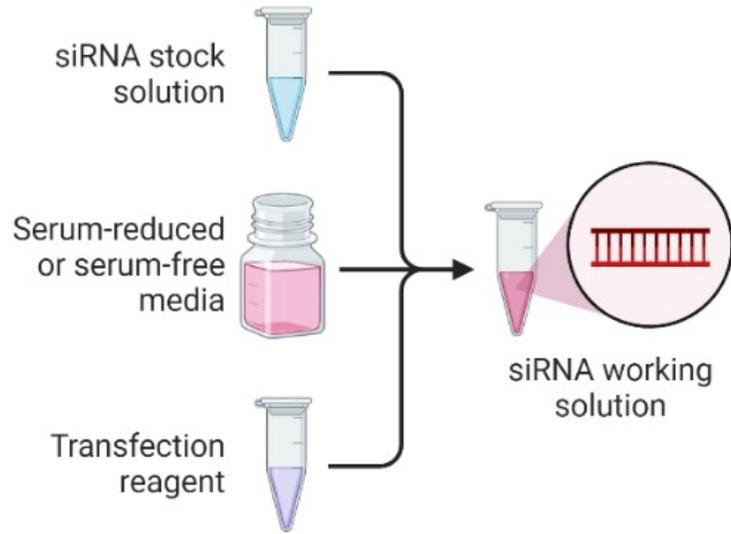
melaniaeva.zanchetta@burlo.trieste.it

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

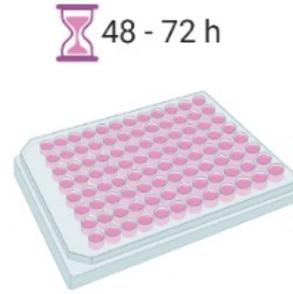
- 
- ***CCL5*** (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*)
 - Member of the Chemokines superfamily
 - CC subfamily
 - functions as one of the natural ligands for the chemokine receptor chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5)
 - Induced during the later stage of inflammation

1 Combine siRNA stock solution with media and mix gently

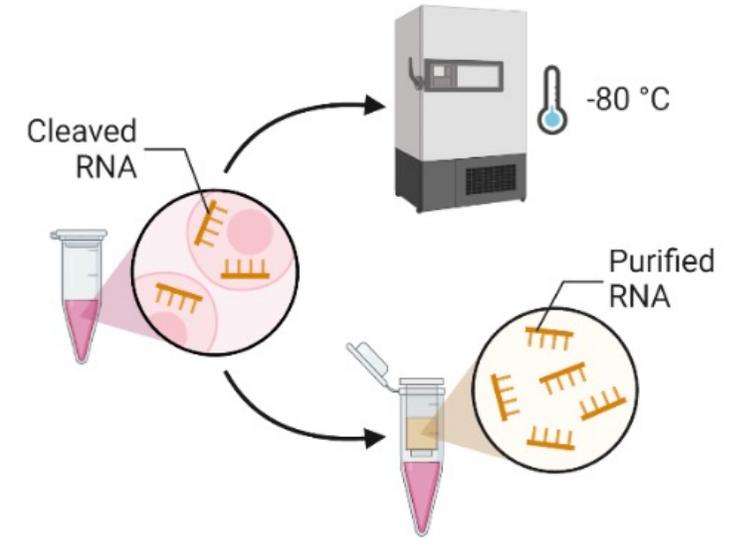


ESERCITAZIONE 1

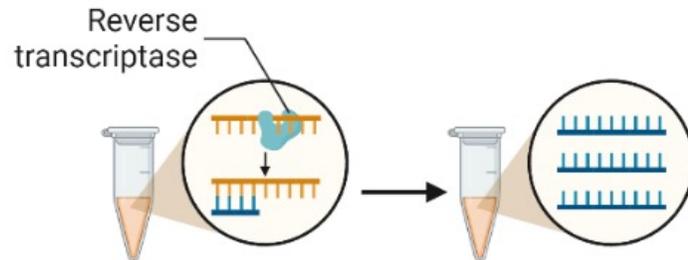
2 Add siRNA working solution to cells and incubate for 48-72 hours



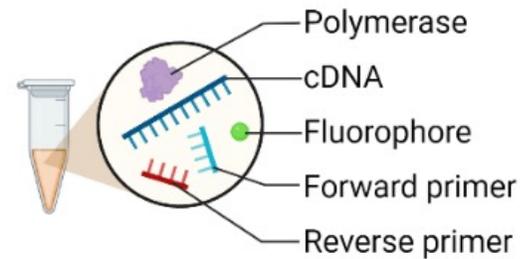
3 Collect cells and store in -80°C or proceed directly to RNA isolation



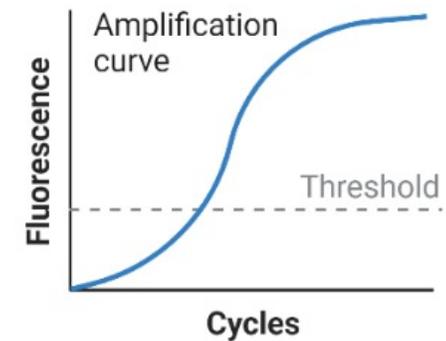
4 Reverse transcription of purified RNA to cDNA



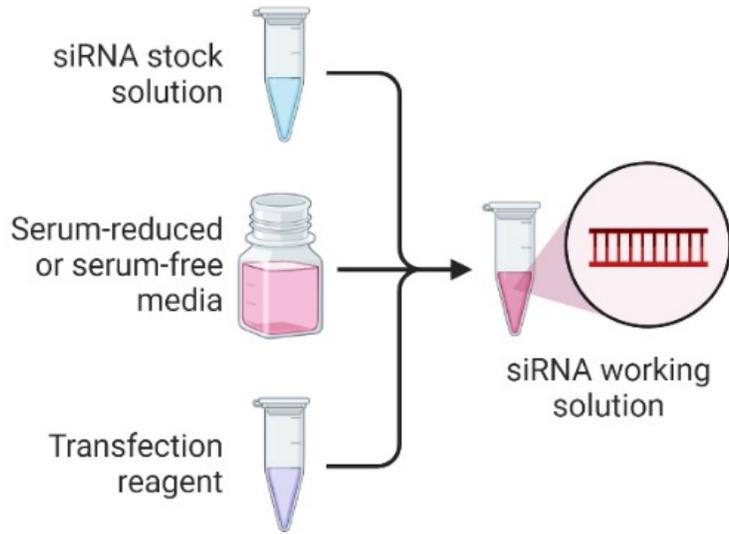
5 Store cDNA in -20°C or amplify directly by qPCR



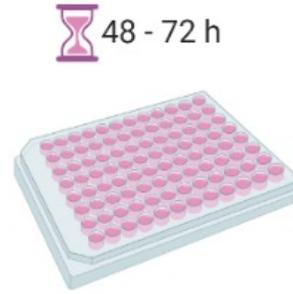
6 Measure mRNA knockdown with Ct values



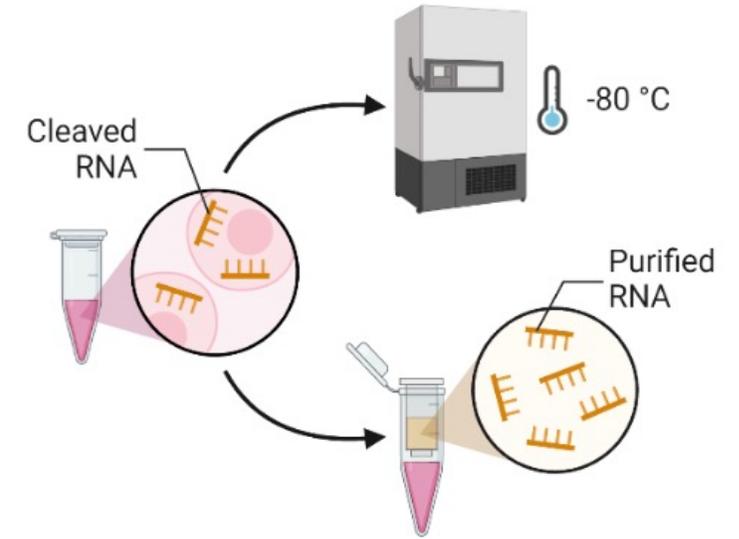
1 Combine siRNA stock solution with media and mix gently



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

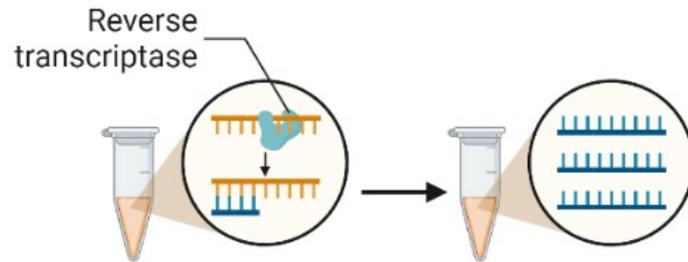


3 Collect cells and store in -80°C or proceed directly to RNA isolation

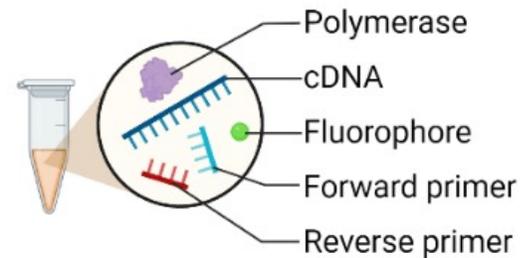


ESERCITAZIONE 2

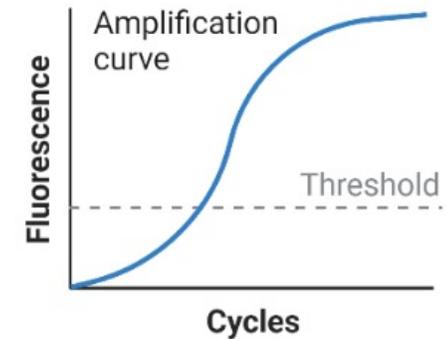
4 Reverse transcription of purified RNA to cDNA



5 Store cDNA in -20°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.

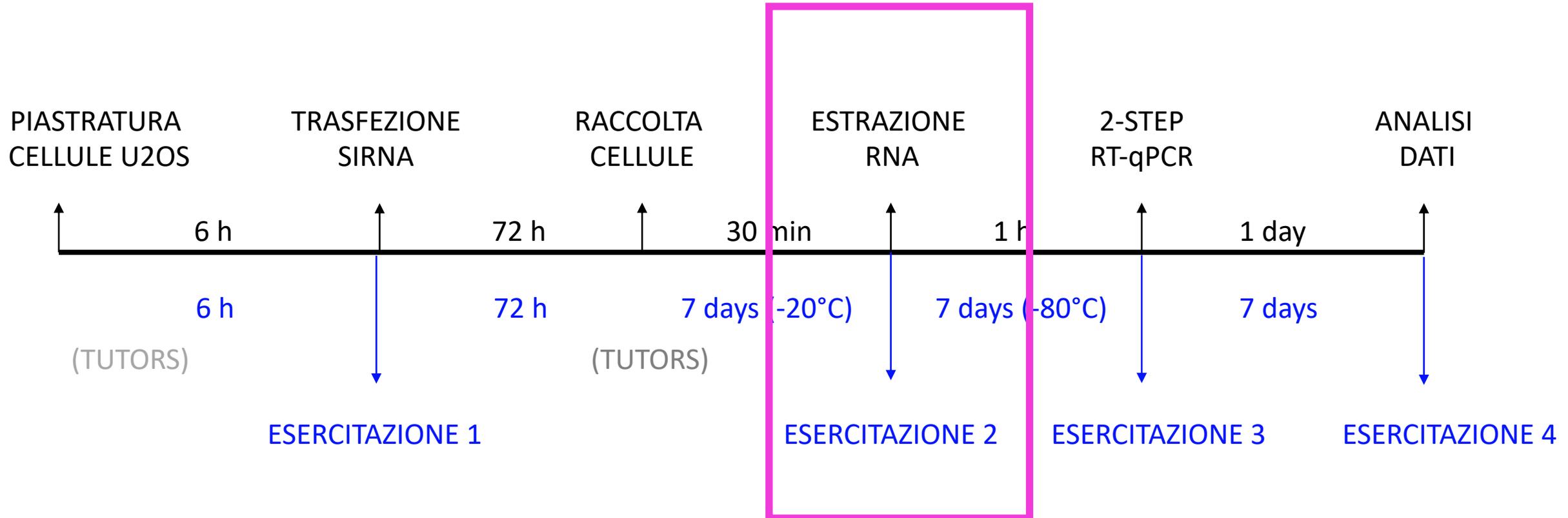
- **3- RETRO-TRASCRIZIONE DA RNA TOTALE** (Zanchetta)

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.

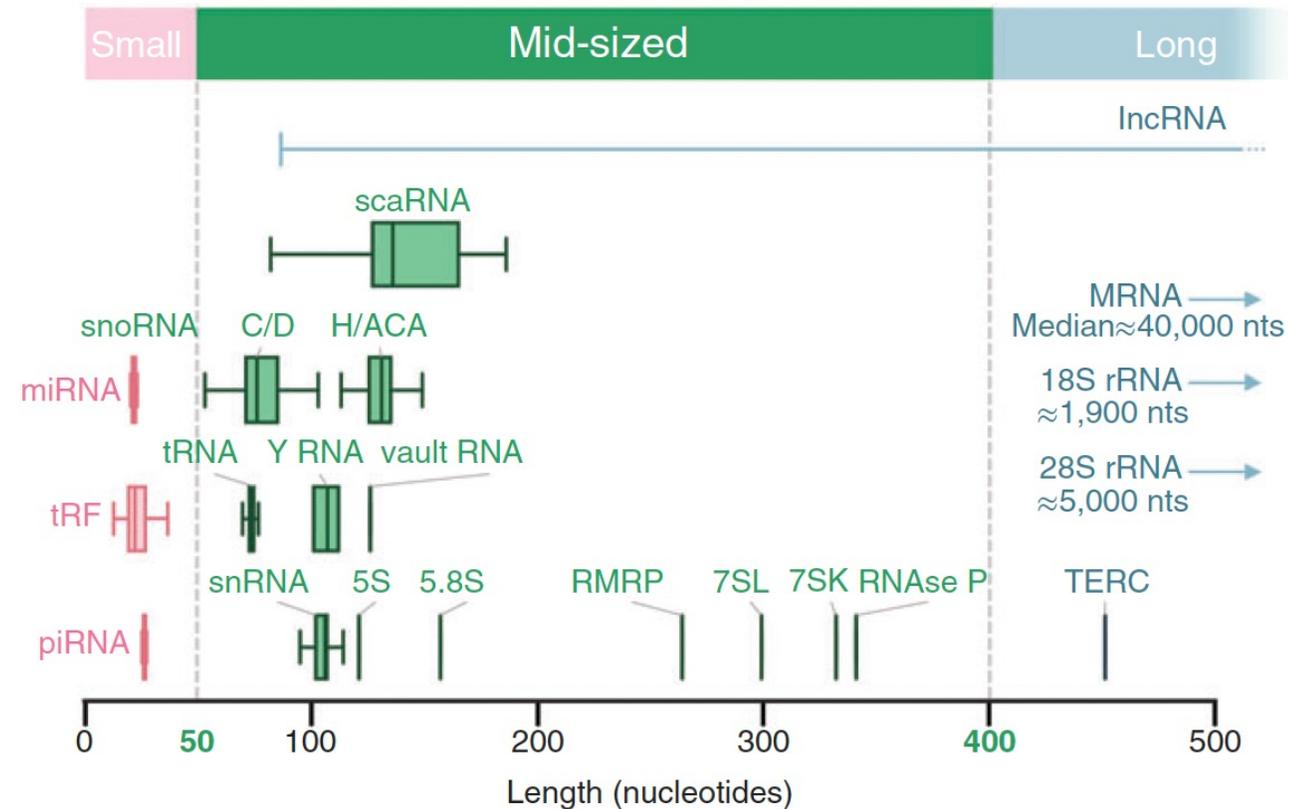
SCHEMA SPERIMENTALE



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

RNA totale

- mRNA citoplasmatico e precursori nucleari (hnRNA: heterogeneous nuclear RNA, unprocessed) 1-5%
- RNA ribosomiali (rRNA): 28S, 18S, 5,8S e 5S, con i relativi precursori 80%
- tRNA e altri piccoli RNA a localizzazione nucleare, nucleolare o citoplasmatica (es. snRNA, snoRNA, scaRNA) 15%
- Una tipica cellula di mammifero contiene circa 20-30 picogrammi di RNA



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

PRECAUZIONI

- L'estrazione dei campioni deve avvenire in tamponi di lisi contenenti inibitori delle RNasi (guanidinio tiocianato).
- Per evitare contaminazioni di DNA genomico nella preparazione dell' RNA ai tamponi di lisi sono aggiunte DNasi RNasi-free.
- L'RNA è una molecola che viene facilmente degradata dalle ribonucleasi (RNasi), per minimizzare la loro azione occorre:
 - ❖ Prestare attenzione a non introdurre RNasi esogene (indossare i guanti).
 - ❖ Utilizzare solo soluzioni e materiali sterili o trattati con DEPC (diethylpirocarbonato).
 - ❖ Conservare i campioni di RNA in ghiaccio durante la loro manipolazione.

Le RNasi non hanno bisogno di cofattori, resistono a trattamenti drastici (ebollizione prolungata, sterilizzazione in autoclave) e sono attive entro un ampio range di pH

METODICHE di ESTRAZIONE dell'RNA

- L'estrazione organica degli acidi nucleici anche nota come **estrazione mediante Fenolo-Cloroformio**
- **Estrazione con sfere magnetiche**
- **Estrazione mediante colonnine in spin**

METODICHE di ESTRAZIONE dell'RNA

ESTRAZIONE ORGANICA

- L'estrazione organica degli acidi nucleici anche nota come **estrazione mediante Fenolo-Chloroformio**
- LISI CELLULARE
- PURIFICAZIONE >> **tre fasi distinte** della soluzione: una **fase inferiore detta organica** (fenolica), un'**interfase proteica** e una **fase superiore (acquosa)**.

L'RNA SI TROVA NELLA FASE ACQUOSA

- PRECIPITAZIONE con ISOPROPANOLO
- LAVAGGIO in ETOH70%
- RISOSPENSIONE

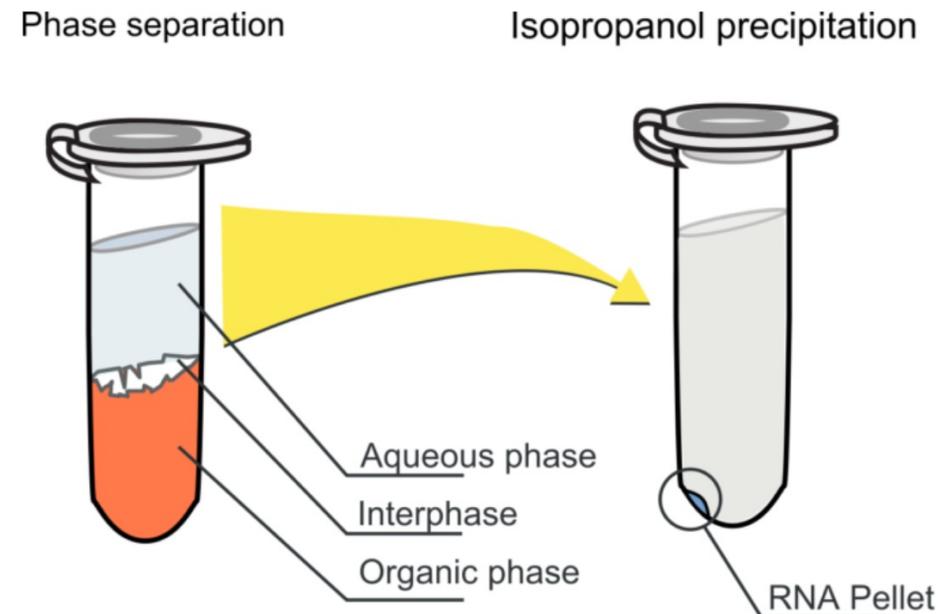


Figura 2 – A sinistra, la separazione nelle tre fasi. A destra l'RNA precipitato in seguito all'aggiunta di isopropanolo [blog.biomall.in]

METODICHE di ESTRAZIONE dell'RNA

ESTRAZIONE con SFERE MAGNETICHE

- Utilizzo di sfere con un **nucleo paramagnetico**, cioè che hanno proprietà magnetiche solo in prossimità di un campo magnetico esterno. Queste sfere sono rivestite solitamente da una **matrice di silice** in grado di legare gli acidi nucleici in presenza di Sali caotropici (=che rompono legami idrogeno)
- Le cellule sono lisate in un tampone con inibitori delle RNasi e poi incubate con le sfere magnetiche in particolari colonnine, affinché avvenga il legame tra la matrice in silice e l'RNA.
- In presenza di un campo magnetico esterno, posto al di sotto delle colonnine, le sfere sono trattenute sul fondo delle colonnine e il surnatante contenente proteine e scarti, è rimosso.
- Quando il campo magnetico viene interrotto e l'RNA così isolato è sottoposto ad una serie di lavaggi e infine è eluito dalle sfere magnetiche con acqua priva di RNasi.

METODICHE di ESTRAZIONE dell'RNA

ESTRAZIONE MEDIANTE COLONNINE

- Tecnica estrattiva detta “in fase solida”. Consiste nel legare ed isolare l'RNA in colonnine in spin contenenti una **membrana in silice** o **fibre di vetro**.
- Campioni lisati in una soluzione tamponata contenente inibitori delle Rnasi
- Si utilizza un'alta concentrazione di **sale chaotropico** (*=denatura acidi nucleici e proteine >>inibisce Rnasi, separa l'rRNA dai ribosomi...*)
- I lisati vengono fatti passare attraverso la colonnina usando la forza centrifuga e l'RNA si attacca alla matrice.
- Si effettua un lavaggio in etanolo al 70% per eliminare le proteine residue e i sali.
- L'RNA è eluito con acqua priva di RNasi.

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE RNeasy MINI KIT (QIAGEN)

- Fast procedure delivering high-quality total RNA in minutes
- Ready-to-use RNA for high performance in any downstream application
- Consistent RNA yields from small to large amounts of starting material
- No phenol/chloroform extraction, no CsCl gradients, no LiCl or ethanol precipitation (METODO «CLASSICO»)
- High-throughput processing in 96-well format and automatable protocols



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE RNeasy MINI KIT (QIAGEN)

I kit piu' utilizzati si basano sull'utilizzo di **matrici silicee**: gli acidi nucleici si legano alle particelle della matrice in presenza di **sali caotropici** (idrocloreuro (GuHCl) e isotiocianato (GuSCn) di guanidina).

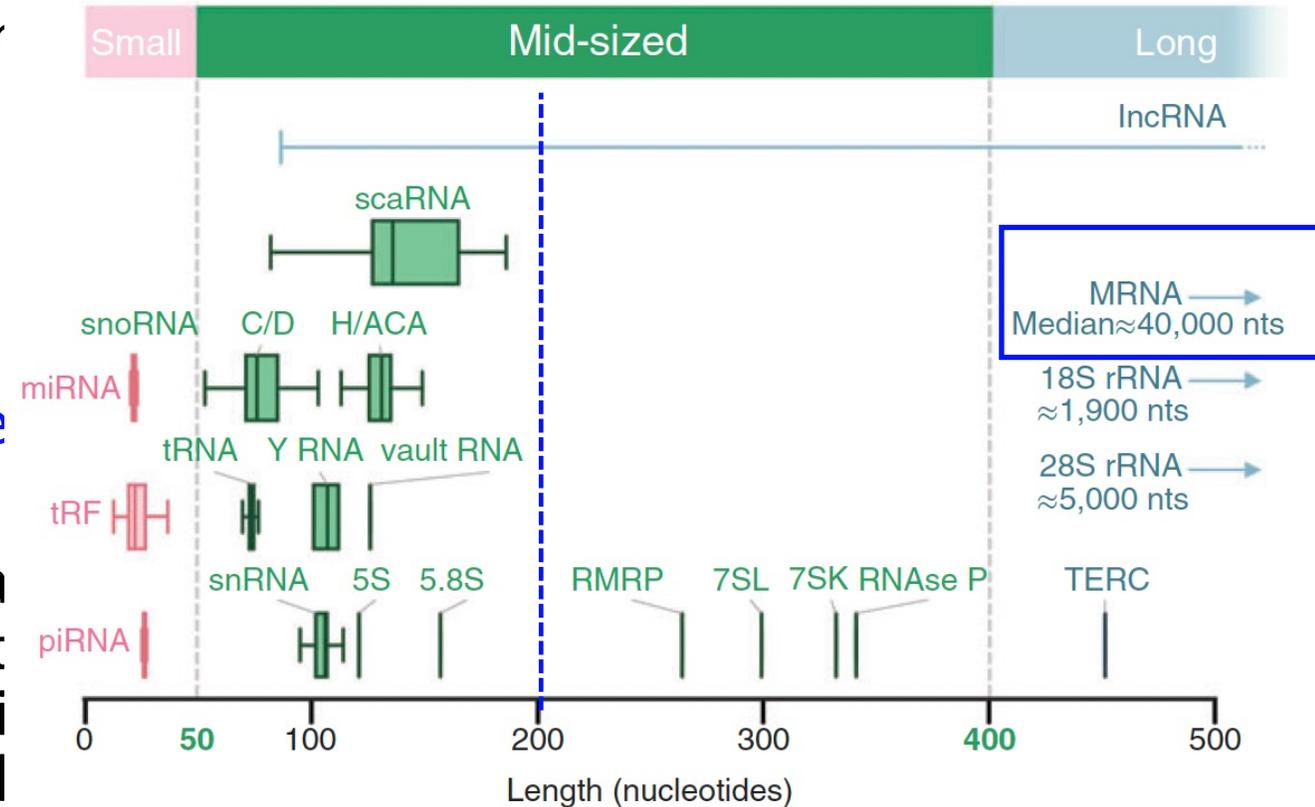
Dopo avere lavato la matrice silicea, gli acidi nucleici sono eluiti con un tampone a bassa concentrazione salina o con acqua e sono pronti per le successive reazioni



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

RNA totale

- mRNA and hnRNA (heterogeneous nuclear RNA, unprocessed) 1-5%
- rRNA 28S, 18S, 5,8S e 5S 80%
- tRNA, snRNA, snoRNA, scRNA) 15%
- Il kit consente di purificare molecole di RNA più lunghe di 200 nt
- **Arricchimento per l'mRNA**>>>la maggior parte degli RNA <200 nt (come il 5,8S rRNA, il 5S rRNA e i tRNA, che insieme comprendono il 15-20% dell'RNA totale) sono esclusi selettivamente



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

PROCEDURA E FASI

- Determinazione della quantità corretta di materiale di partenza
- Disgregazione e omogeneizzazione del materiale di partenza (CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO) + LISI CON DETERGENTI (SDS)
- RIMOZIONE PROTEINE
- Digestione DNA (DNASI)
- Legame alla colonnina
- Lavaggi (ETANOLO)
- Eliminazione contaminanti
- Eluizione

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

Determinazione della quantità corretta di materiale di partenza

Maximum binding capacity	100 µg RNA
Maximum loading volume	700 µl
RNA size distribution	RNA >200 nucleotides
Minimum elution volume	30 µl
Maximum amount of starting material	
• Animal cells	1 x 10 ⁷ *
• Animal tissues	30 mg*
• Yeast	5 x 10 ⁷ *
• Plant tissues	100 mg
• Filamentous fungi	100 mg

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE DISGREGAZIONE E OMOGENIZZAZIONE

- **Disruption:** Complete disruption of plasma membranes of cells and organelles is absolutely required to release all the RNA contained in the sample. Incomplete disruption results in significantly reduced RNA yields.
- **Homogenization:** Is necessary to reduce the viscosity of the lysates produced by disruption. Homogenization shears high-molecular-weight genomic DNA and other high-molecular-weight cellular components to create a homogeneous lysate. Incomplete homogenization results in inefficient binding of RNA to the RNeasy spin column membrane and therefore significantly reduced RNA yields.

Table 3. Disruption and homogenization methods

Sample	Disruption method	Homogenization method	Comments
Animal cells	Addition of lysis buffer	Rotor–stator homogenizer or QIAshredder homogenizer* or syringe and needle	If processing $\leq 1 \times 10^5$ cells, lysate can be homogenized by vortexing



ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE ELIMINAZIONE DNA GENOMICO

- gDNA can be removed with DNaseI digestion
- DNase digestion is not required with RNeasy Kits since RNeasy silica-membrane technology efficiently removes most of the DNA without DNase treatment.
- RNA will be used in real-time, two-step RT-PCR>>>> we recommend using the QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit. The kit provides a fast and convenient procedure, enabling cDNA synthesis and genomic DNA removal

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

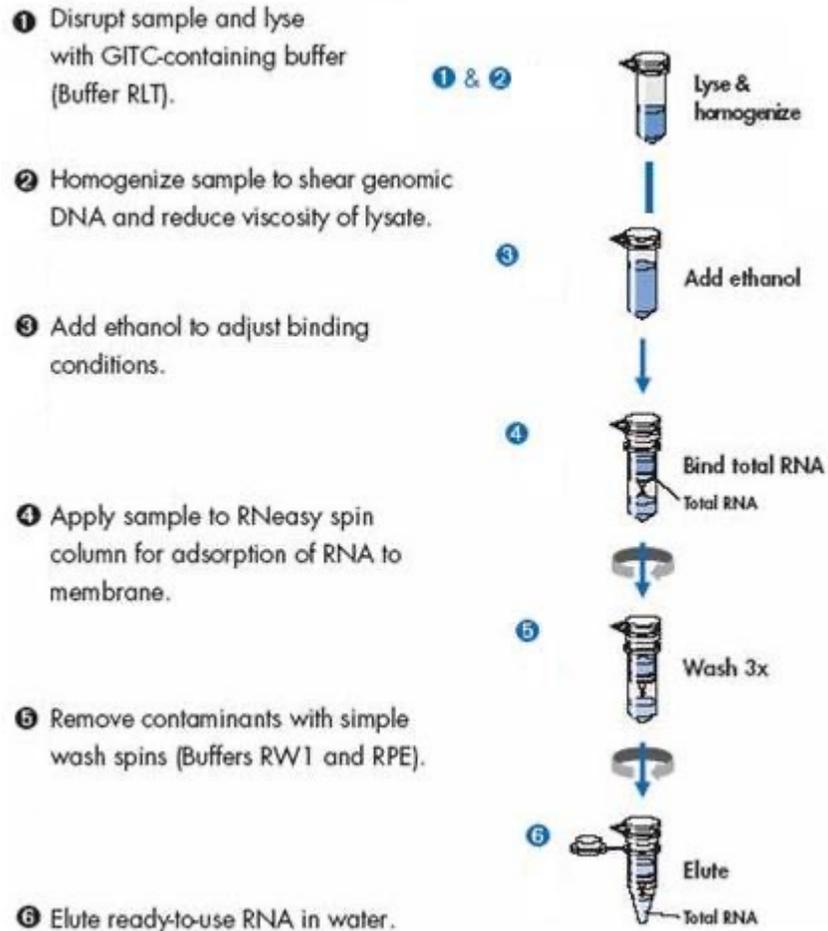
RNASEASY MINI KIT (QIAGEN)

RNeasy Mini Kit	(50)
Catalog no.	74104
Number of preps	50
RNeasy Mini Spin Columns (pink)	50
Collection Tubes (1.5 ml)	50
Collection Tubes (2 ml)*	50
Buffer RLT*†	45 ml
Buffer RW1†	45 ml
Buffer RPE‡ (concentrate)	11 ml
RNAse-Free Water	10 ml
Quick-Start Protocol	2



<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits>

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE RNeasy MINI KIT (QIAGEN)



<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits>

ISOLAMENTO DI RNA TOTALE DA CELLULE

RNAEASY MINI KIT (QIAGEN)

Deproteinizzazione

<p>CAUTION</p> 	<p>DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.</p>
---	--

Buffer RLT contains guanidine thiocyanate, Buffer RLC contains guanidine hydrochloride, and Buffer RW1 contains a small amount of guanidine thiocyanate. Guanidine salts can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing these buffers is split, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

Guanidinio tiocianato: denatura le proteine, comprese le RNasi, e separa l'rRNA dalle proteine ribosomiali

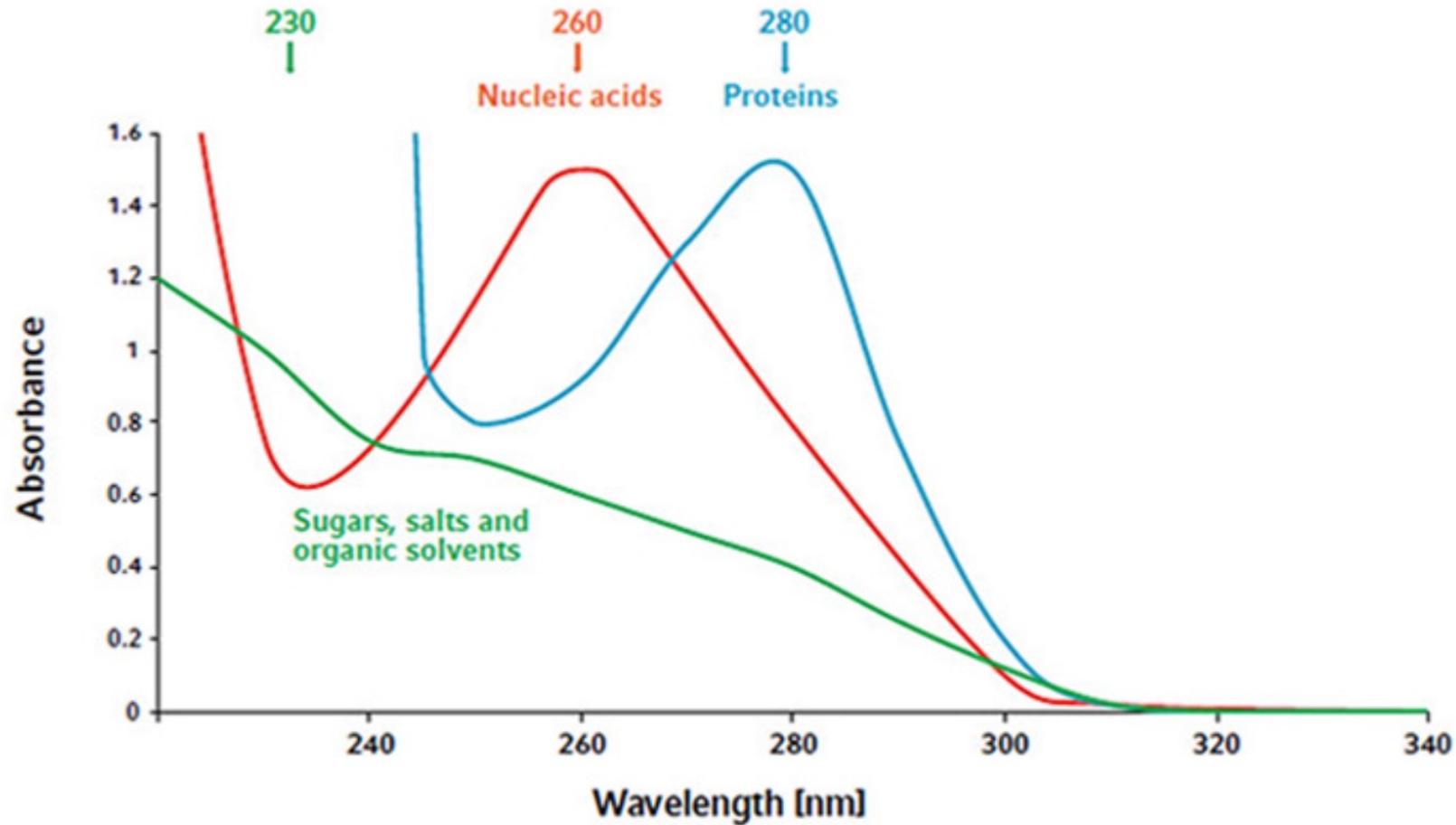
CONSERVAZIONE DELL'RNA

- L'RNA purificato può essere conservato a $-30-15^{\circ}\text{C}$ o a $-90-65^{\circ}\text{C}$ in acqua priva di RNAsi. In queste condizioni, dopo 1 anno non è rilevabile alcuna degradazione dell'RNA.

ANALISI QUANTITATIVA DELL'RNA

- La concentrazione dell'RNA estratto può essere determinata mediante analisi allo spettrofotometro UV misurando **l'assorbanza a 260 nm** (A260)
- Legge di Lambert Beer: l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della specie assorbente contenuta nel campione.
- Un'assorbanza di **1 unità a 260 nm** corrisponde a circa **40 µg di RNA per ml** (A260=1 → 40 µg/ml → 40 ng/µl).

ANALISI QUANTITATIVA DELL'RNA



ANALISI QUALITATIVA DELL'RNA

I valori di assorbanza a 230 nm e 280 nm possono essere utilizzati per determinare la purezza dell'RNA estratto:

1) Contaminazione da proteine o guanidinio isotiocianato>> può essere determinata dal rapporto delle letture a 260 nm and 280 nm = rapporto **A260/A280**

- L'RNA puro ha un rapporto A260/A280 pari a 1,9-2,1.
- Una bassa concentrazione di RNA può alterare questo valore

2) Contaminazione da EDTA, carboidrati e solventi>> può essere determinata dal rapporto delle letture a 260 nm e 230 nm = rapporto **A260/A230**

- il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2
- Una bassa concentrazione di RNA può alterare questo valore

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.

PROCEDIMENTO

PRIMA PARTE: ISOLAMENTO RNA TOTALE DA CELLULE

SECONDA PARTE: DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE di RNA ESTRATTO MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO

STRUMENTAZIONE

- Microcentrifuga (Eeguire tutte le fasi della procedura a temperatura ambiente. Durante la procedura, lavorare rapidamente. Eeguire tutte le fasi di centrifugazione a 20-25°C in una microcentrifuga standard. Assicurarsi che la centrifuga non si raffreddi al di sotto dei 20°C.

MATERIALE

- **1 pellet cellule numerato** ([stesso numero della scorsa esercitazione](#))

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