

CORSO “LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE” a.a. 2025-2026

ESERCITAZIONI –II PARTE

Lezione 1

11/11/25

melaniaeva.zanchetta@burlo.trieste.it

PROGRAM

LABORATORY COURSE:

Ed C1, Monday, Tuesday , Wednesday 14:00 – 19:00; Start: 13.10.2025; End 17.12.2025; 8 exercises; 3 turni

Calendario	PART 1				PART 2			
Esercizio	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	#8
Docente Laboratorio Ed C1	Bandiera	Bandiera	Bandiera	Bandiera	Zanchetta	Zanchetta	Zanchetta + Schoeftner	Schoeftner
Tutor	Tutor 1	Tutor 1	Tutor 1+2	Tutor 1+2	Tutor 2+3	Tutor 2+3	Tutor 3	Tutor 3
Turno 1: 14:00 - 19:00; Lunedì	13.10.2025	20.10.2025	27.10.2025	10.11.2025	17.11.2025	24.11.2025	01.12.2025	15.12.2025
Turno 2: 14:00 - 19:00; Martedì	14.10.2025	21.10.2025	28.10.2025	11.11.2025	18.11.2025	25.11.2025	02.12.2025	16.12.2025
Turno 3: 14:00 - 19:00; Mercoledì	15.10.2025	22.10.2025	29.10.2025	12.11.2025	19.11.2025	26.11.2025	03.12.2025	17.12.2025
Docente per lezione introduttiva per esercitazione (1 ora); Ed. C1, Aula I; Martedì, 12:00 - 13:00	07.10.2025 - Bandiera	14.10.2025 - Bandiera	21.10.2025 - Bandiera	04.11.2025 - Bandiera	11.11.2025 - Zanchetta	18.11.2025 - Zanchetta	25.11.2025 - Zanchetta	09.12.2023 - Schoeftner

Seguire la lezione teorica in aula è importante per capire l'attività pratica che verrà fatta in laboratorio!!!!

PROGRAMMA ESERCITAZIONI - II PARTE

- **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.

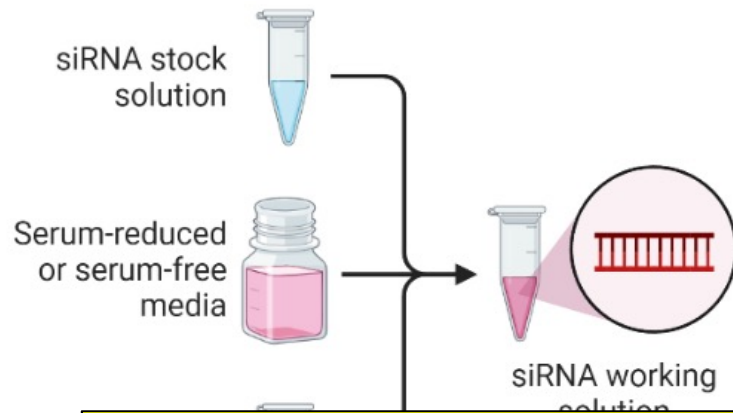
- **3- RETRO-TRASCRIZIONE DA RNA TOTALE** (Zanchetta)

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.

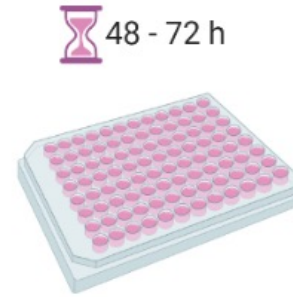
- **4- LA PCR QUANTITATIVA** (Schoeftner)

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

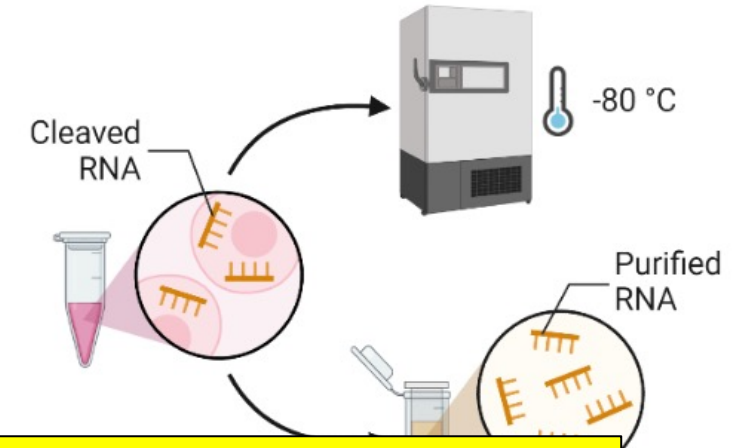
① Combine siRNA stock solution with media and mix gently



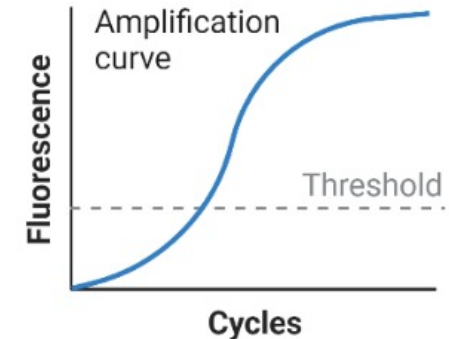
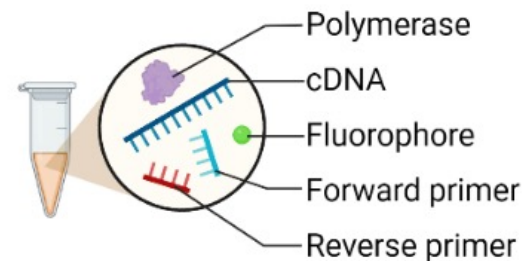
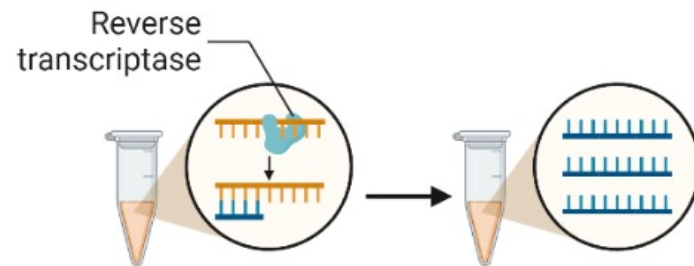
② Add siRNA working solution to cells and incubate for 48-72 hours



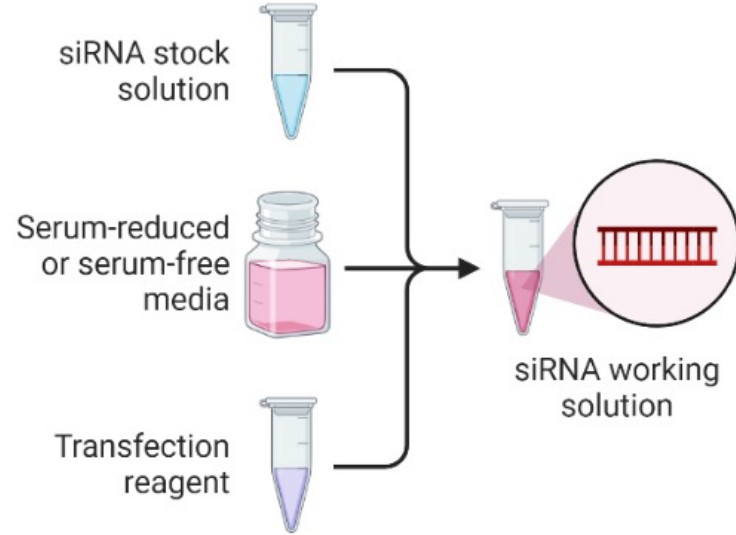
③ Collect cells and store in -80°C or proceed directly to RNA isolation



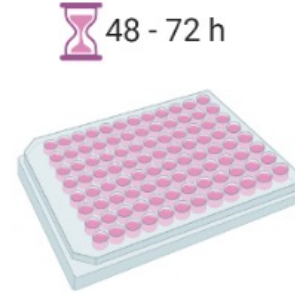
RT-PCR quantitativa:
valutazione del knock-down di un gene e valutazione
dell'effetto biologico utilizzando l'espressione di un
marker molecolare.



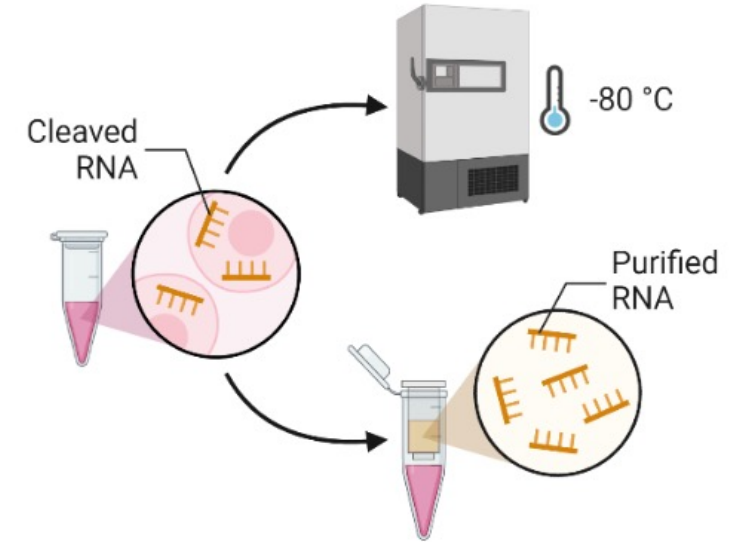
1 Combine siRNA stock solution with media and mix gently



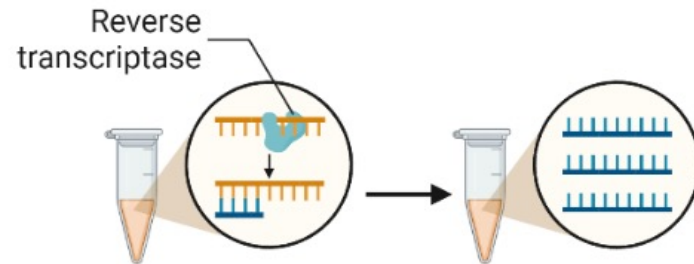
2 Add siRNA working solution to cells and incubate for 48-72 hours



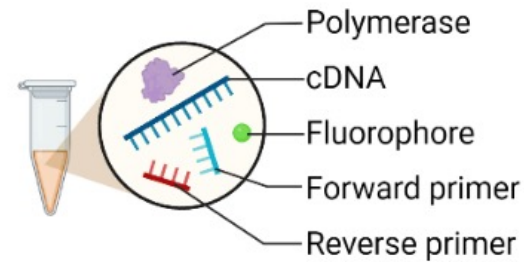
3 Collect cells and store in -80°C or proceed directly to RNA isolation



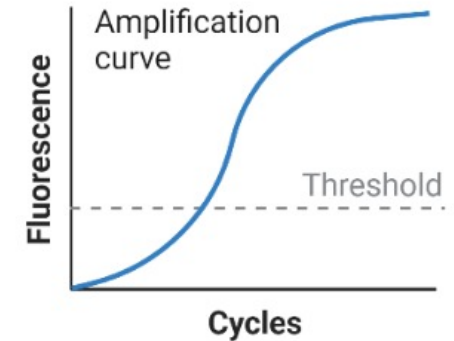
4 Reverse transcription of purified RNA to cDNA



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)

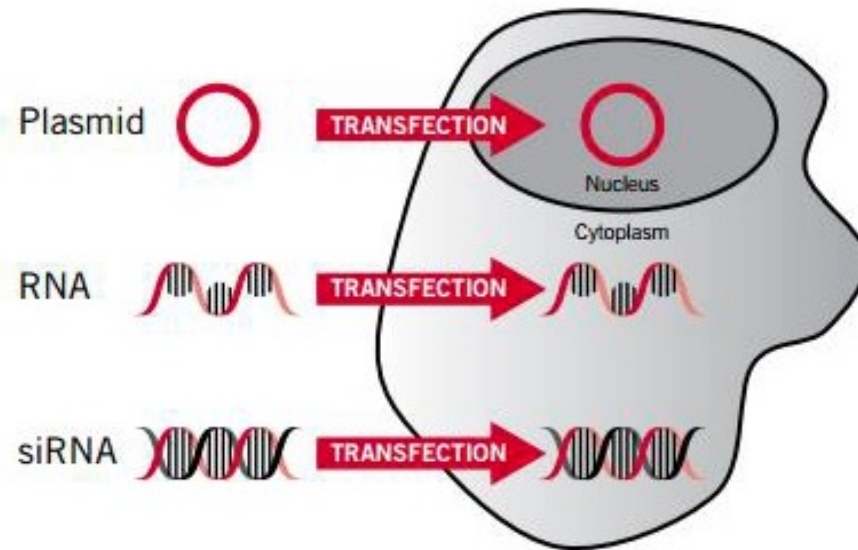
Diluizione del campione di RNA estratto in precedenza. Allestimento individuale della reazione di retro-trascrizione con l'utilizzo di kit commerciale. Diluizione del cDNA sintetizzato. Allestimento delle reazioni di RT-qPCR.

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

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

TRASFEZIONE

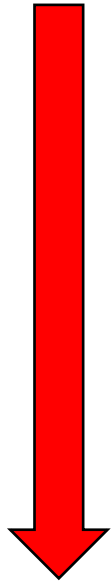
Tecnica di manipolazione genica che permette di introdurre materiale genetico esogeno (DNA, RNA) in cellule di mammifero per lo studio della funzione e dei meccanismi di regolazione GENICA



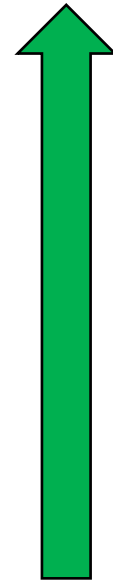
COME PIANIFICARE UN ESPERIMENTO

1. Definire lo scopo dell'esperimento
2. Scelta del modello cellulare
3. Scelta del tipo di trasfezione
4. Scelta del metodo di trasfezione
5. Scelta del tipo di silenziamento genico

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

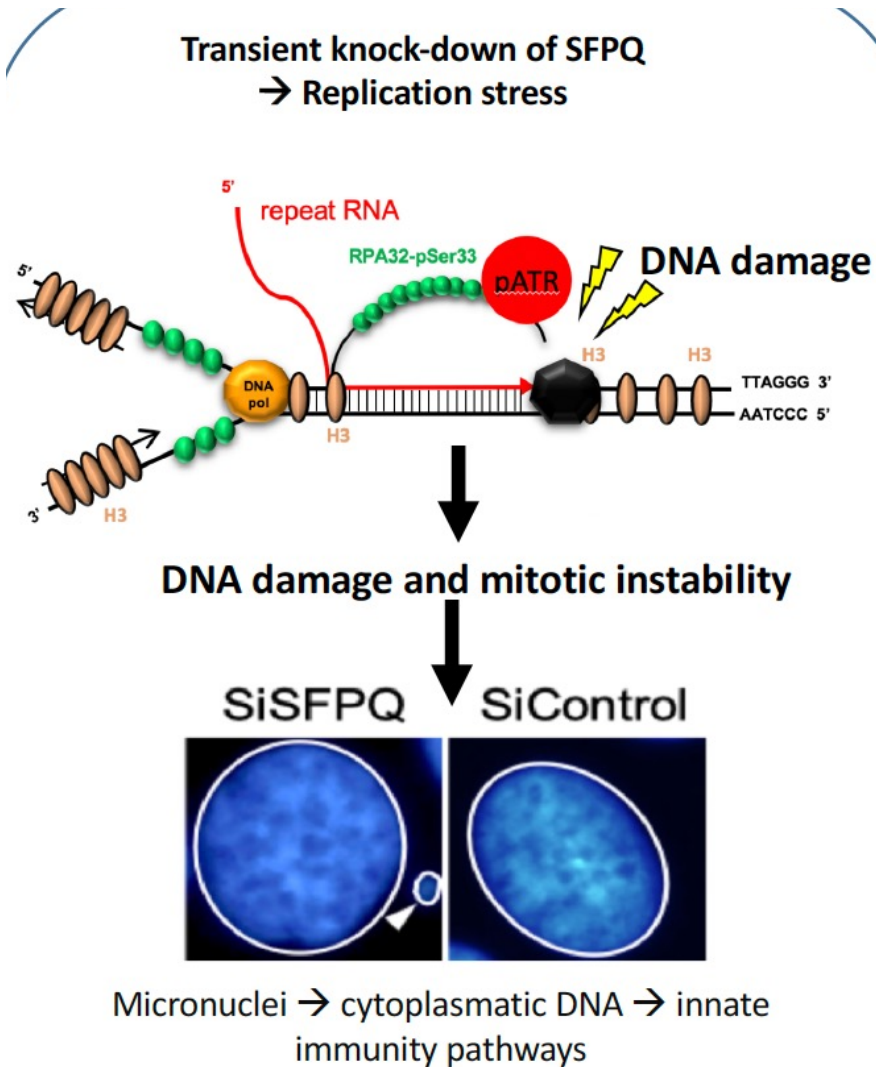


- *SFPQ* (Splicing Factor Proline And Glutamine Rich)
- DNA- and RNA binding protein
- **Loss of SFPQ results mitotic defects that lead to genome instability**



- *CCL5* (C-C Motif Chemokine Ligand 5)
- Member of the Chemokines superfamily
- **Induced during the later stage of inflammation**

Activation of IFN signalling by promoting genomic instability



Monitorare l'aumento

dell'espressione di CCL5:

- chemochina proinfiammatoria che recluta leucociti nel sito dell'infiammazione.
- chemiotattica per i linfociti T, gli eosinofili e i basofili, ma anche per i monociti, le cellule natural killer (NK), le cellule dendritiche e i mastociti.

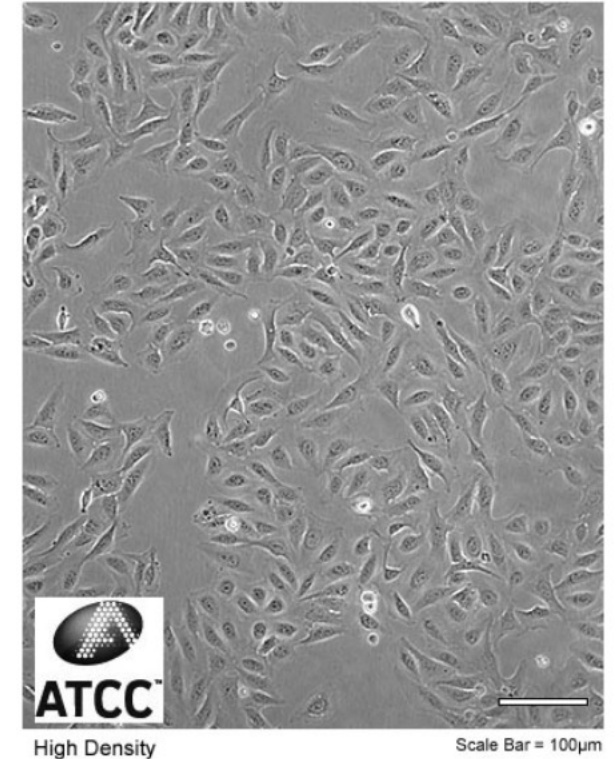
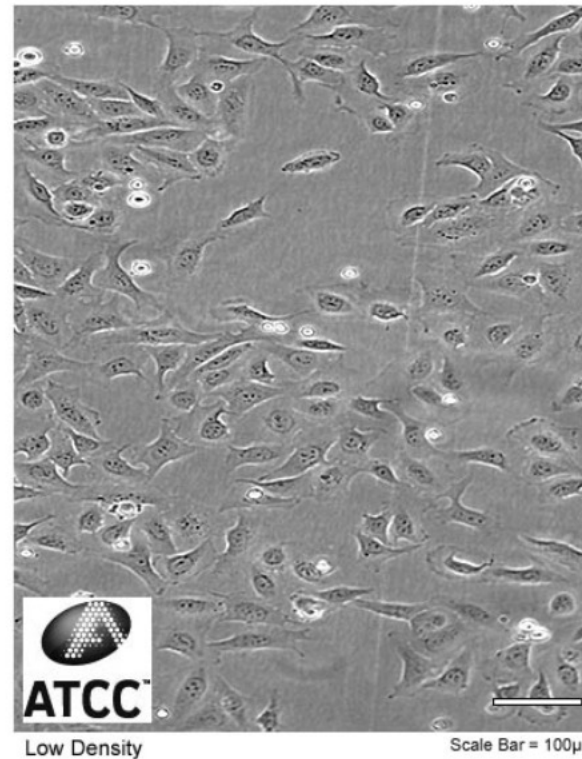
SCELTA DEL MODELLO CELLULARE

1. **Rilevanza Biologica:** linea cellulare in cui il gene di interesse è normalmente **espresso** (livelli moderati o alti) e in cui il silenziamento genico (knockdown) produce un **fenotipo osservabile e misurabile**.
2. = Il modello dovrebbe essere il più vicino possibile al contesto fisiologico o patologico che si sta studiando
3. **Efficienza di Transfezione/Trasduzione:** La capacità delle cellule di incorporare l'agente silenziante (siRNA o shRNA) è fondamentale. Alcune linee cellulari sono facili da trasfettare (es. HeLa, HEK293, U2OS), altre, come le colture primarie, sono più resistenti.
4. **Caratteristiche della Linea Cellulare: Immortalizzate vs. Primarie:** Le linee cellulari immortalizzate sono più facili da mantenere e manipolare, ma le colture primarie sono più rappresentative del tessuto *in vivo*.

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**



SCELTA DEL TIPO 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

SCELTA DEL TIPO DI TRASFEZIONE

TRANSIENTE

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

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

SCELTA DEL METODO DI TRASFEZIONE

1) METODI CHIMICI

utilizzano molecole carrier che neutralizzano o conferiscono una carica positiva agli acidi nucleici (liposomi, calcio fosfato, polimeri cationici)

2) METODI FISICI

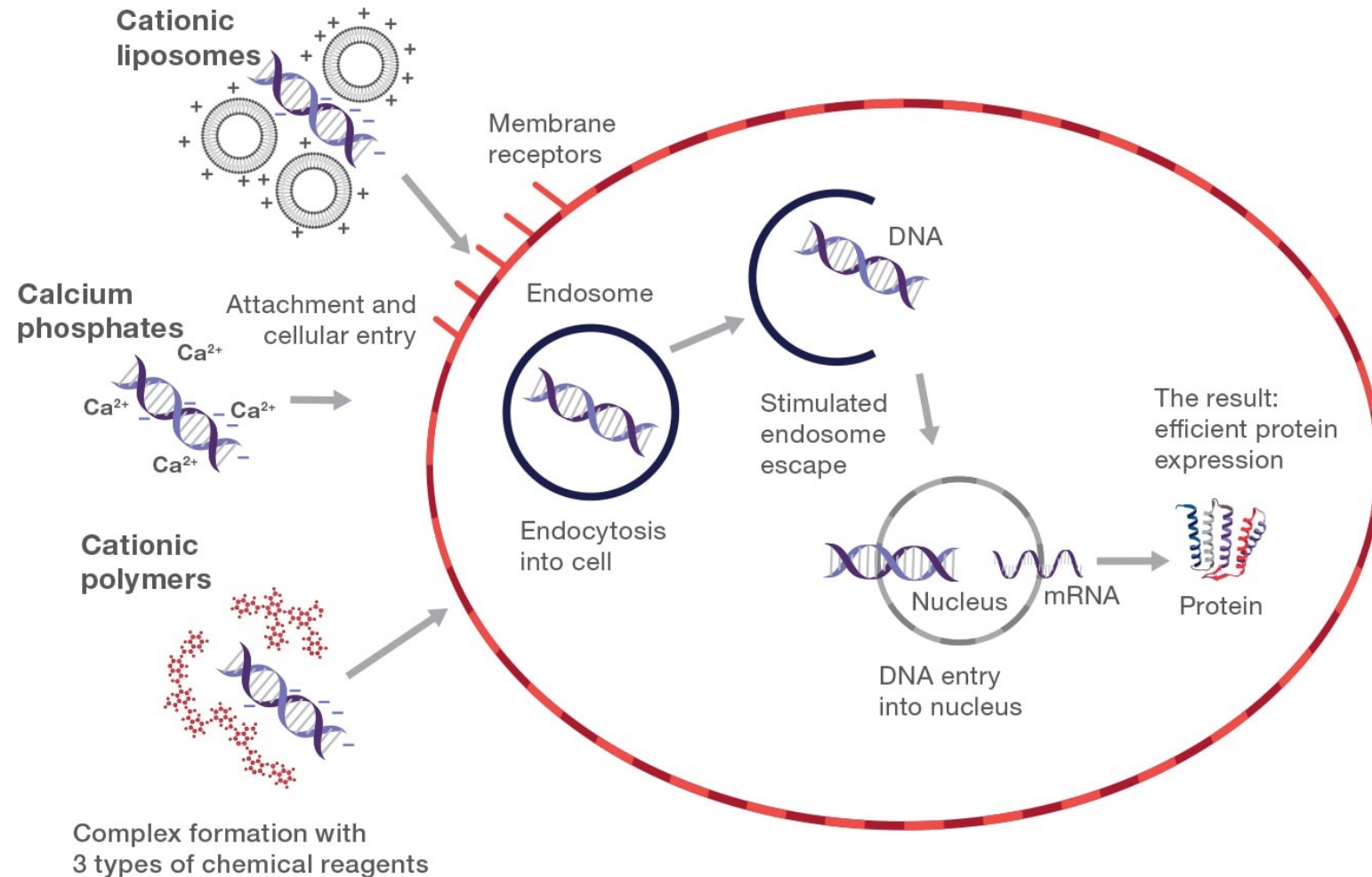
consentono di far entrare gli acidi nucleici direttamente nel citoplasma o nel nucleo della cellula senza l'uso di molecole portanti chimiche

3) METODI BIOLOGICI

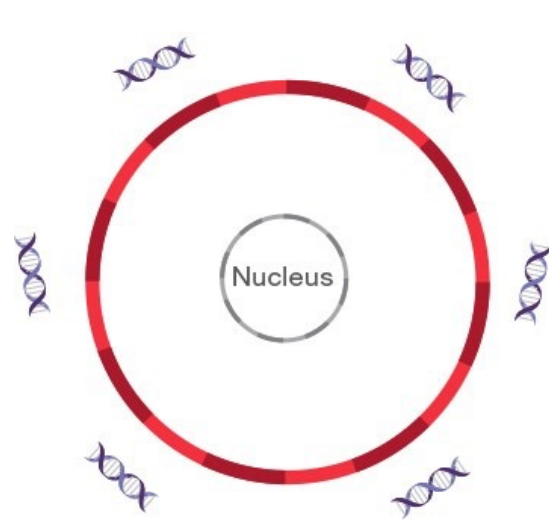
utilizzano virus geneticamente modificati per trasferire acidi nucleici nelle cellule

SCELTA DEL METODO DI TRASFEZIONE: METODI CHIMICI

La carica superficiale positiva del complesso reagente-DNA/RNA consente l'adesione alla superficie cellulare e l'ingresso tramite endocitosi.

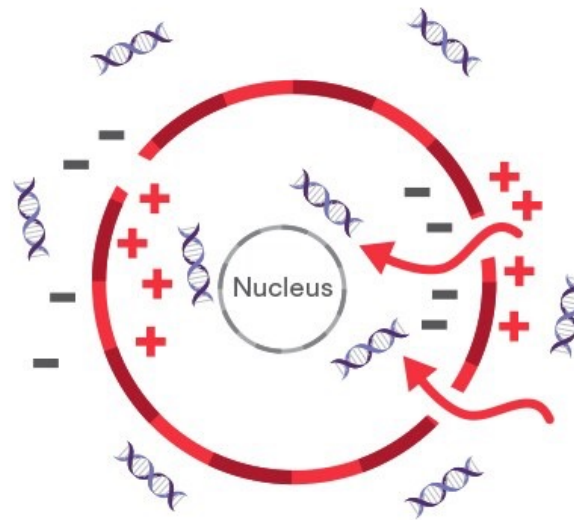


SCELTA DEL METODO DI TRASFEZIONE: METODI FISICI



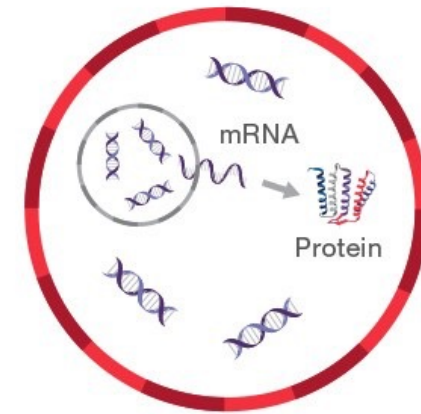
Before electroporation

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



During electroporation

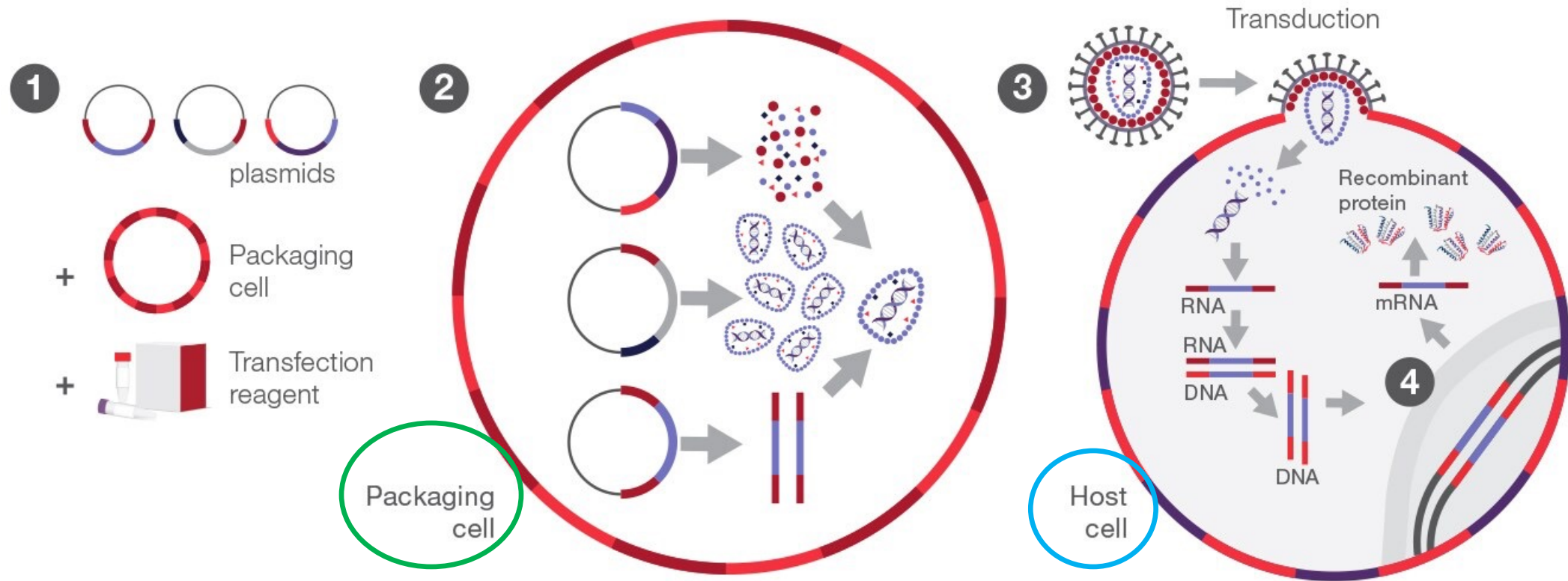
Electric field is induced across the cell membrane; pores form and DNA/CRISPR-Cas9 RNP etc. enter cells



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

SCELTA DEL METODO 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

SCELTA DEL METODO PIÙ ADATTO

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

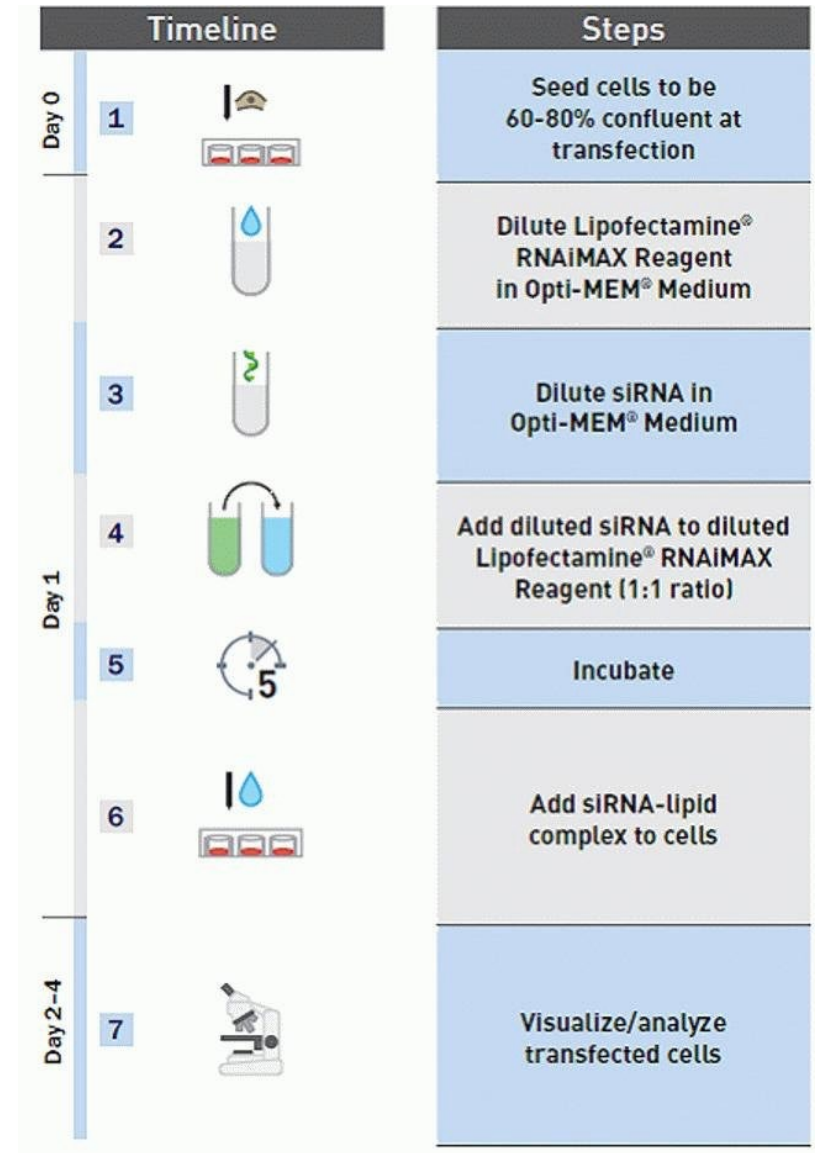
+++ Excellent for most applications; ++ Good for some applications; + Least recommended, but may be appropriate for some applications.

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



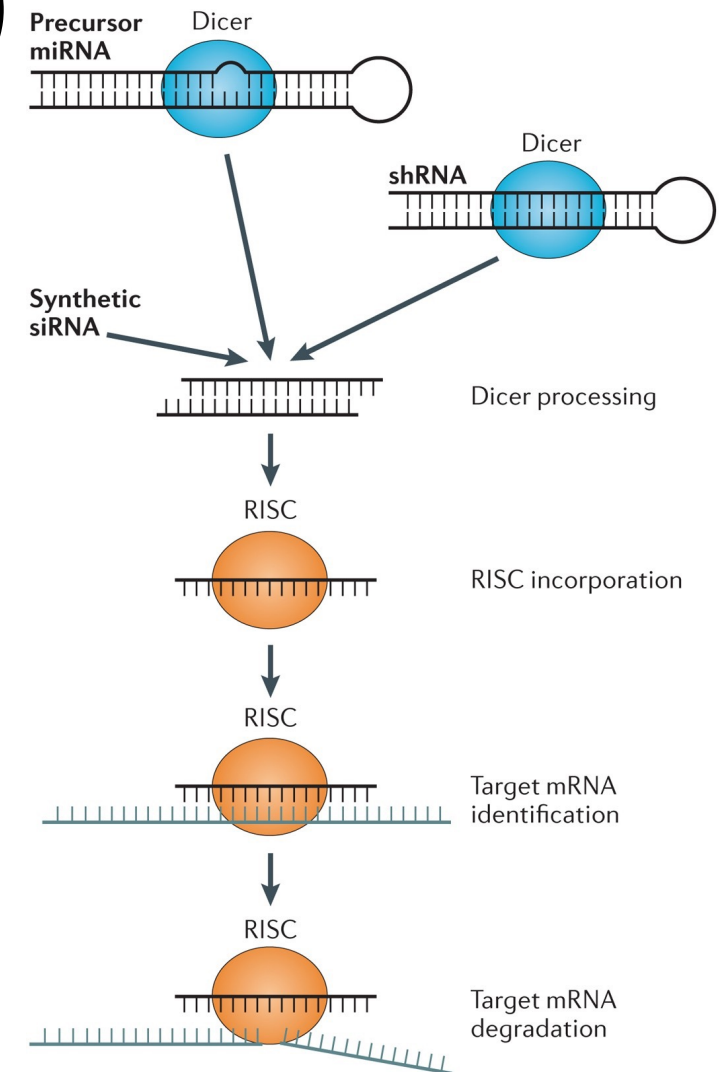
Protocollo
consigliato dalla
ditta va
ottimizzato per il
proprio
esperimento



	Gene knockout	Gene knockdown
Definition	Technique that can completely inactivate a gene.	Technique that can reduce the expression of a gene.
Study	Loss of function	Gene expression
Effect	Permanent	Temporary
Result	Loss or Altered phenotype	Phenotypic alteration at some degree
Effective	At DNA level	At mRNA level
Changes	Non-reversible	Reversible
Techniques	Homologous recombination, NHEJ, CRISPR, TALEN and artificial mutagenesis.	RNA interference using siRNA or shRNA. Some CRISPR modules.

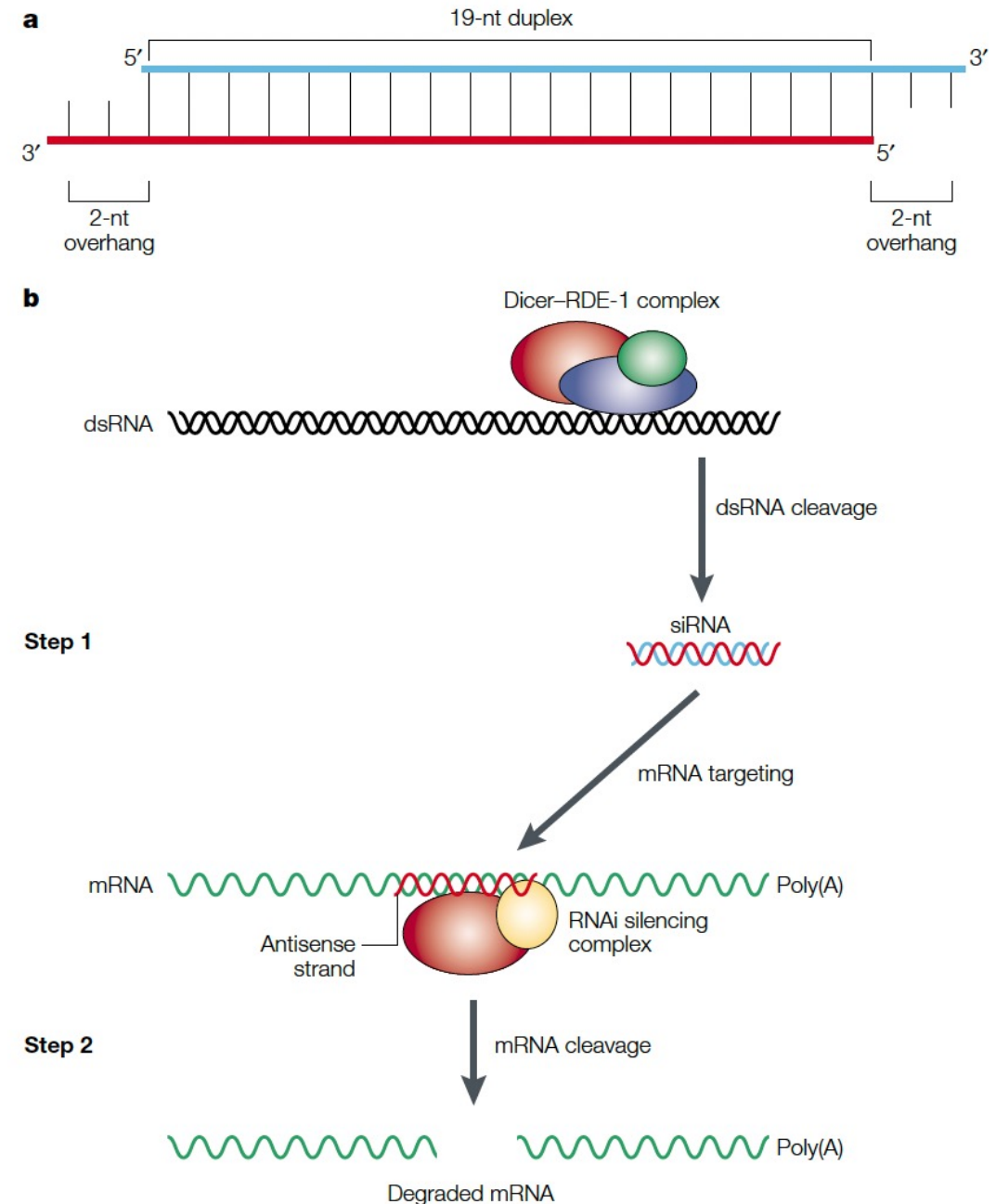
SILENZIAMENTO GENICO MEDIANTE SMALL INTERFERING RNA (siRNA)

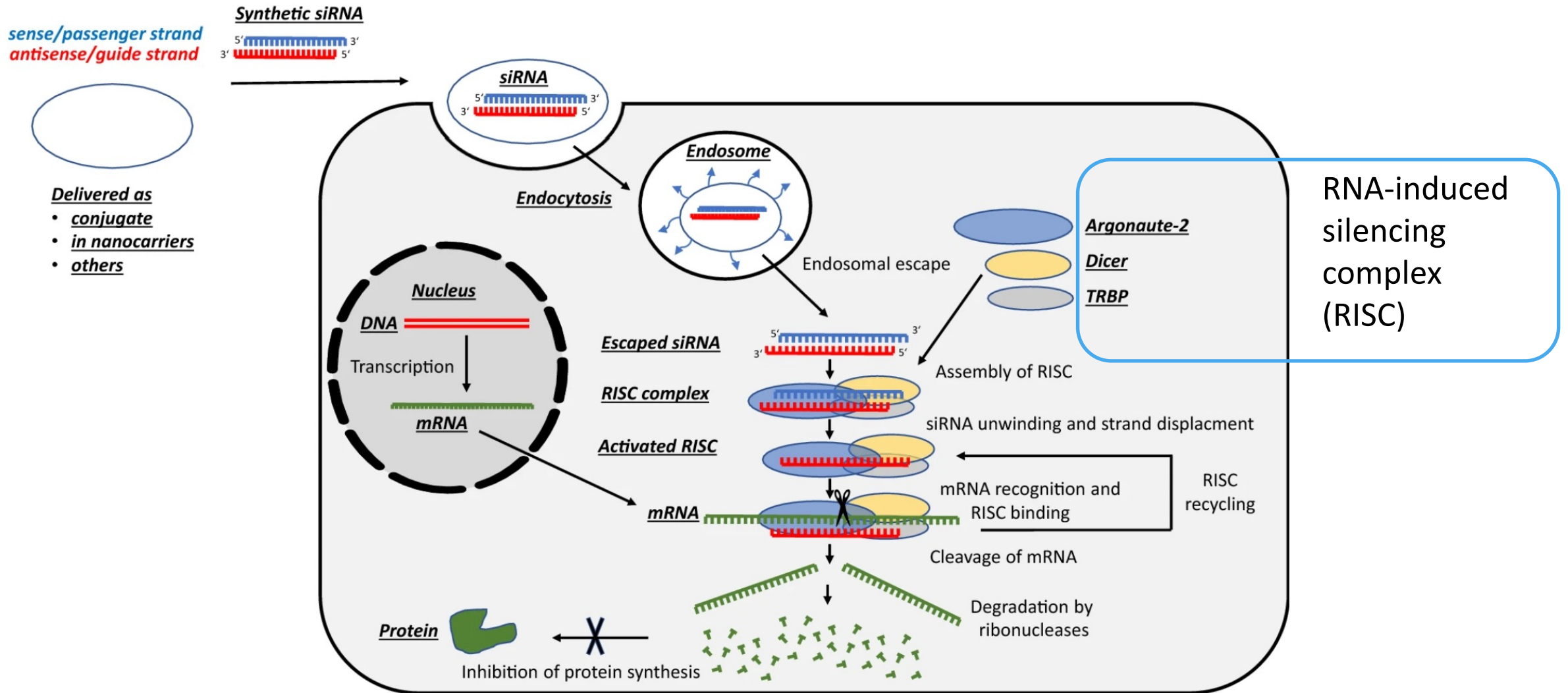
- Tecnica che permette di bloccare o ridurre temporaneamente l'espressione di uno o più geni bersaglio.
- siRNA possono down-regolare l'espressione di geni target in maniera **sequenza-specifica** tramite la degradazione dell'mRNA target (post-transcriptional gene silencing)



siRNA: MECCANISMO

1. L'RNA lungo a doppio filamento (dsRNA) viene processato dal complesso Dicer-RDE-1 per formare i siRNA/ siRNA sintetico
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

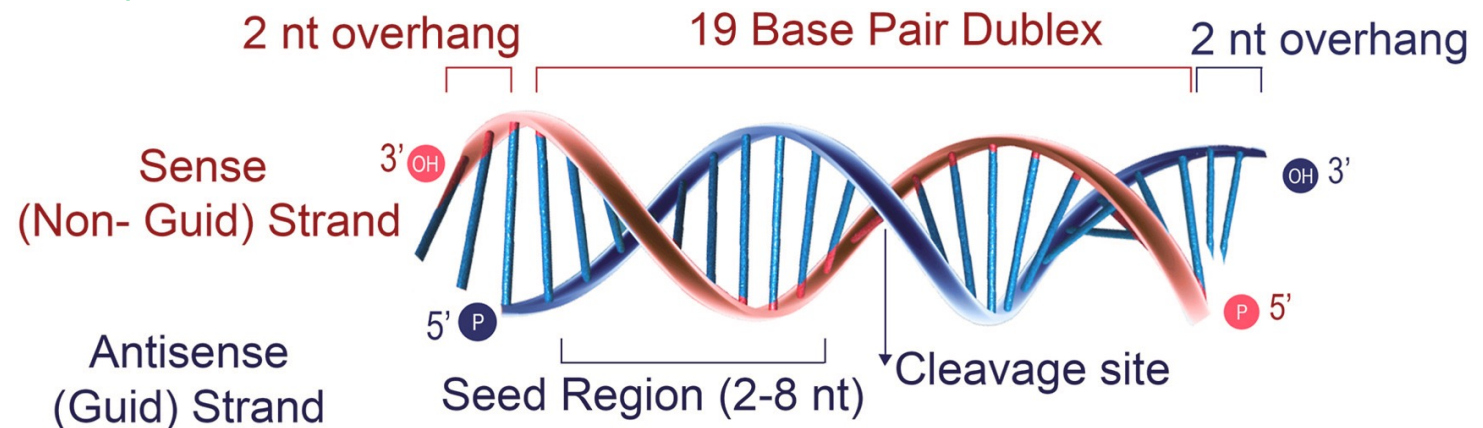




RNA-induced silencing complex (**RISC**) >> comprende diverse proteine tra cui **Argonaute-2** (Ago-2), **Dicer** e transactivation response element RNA-binding protein (**TRBP**)

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

siRNA design

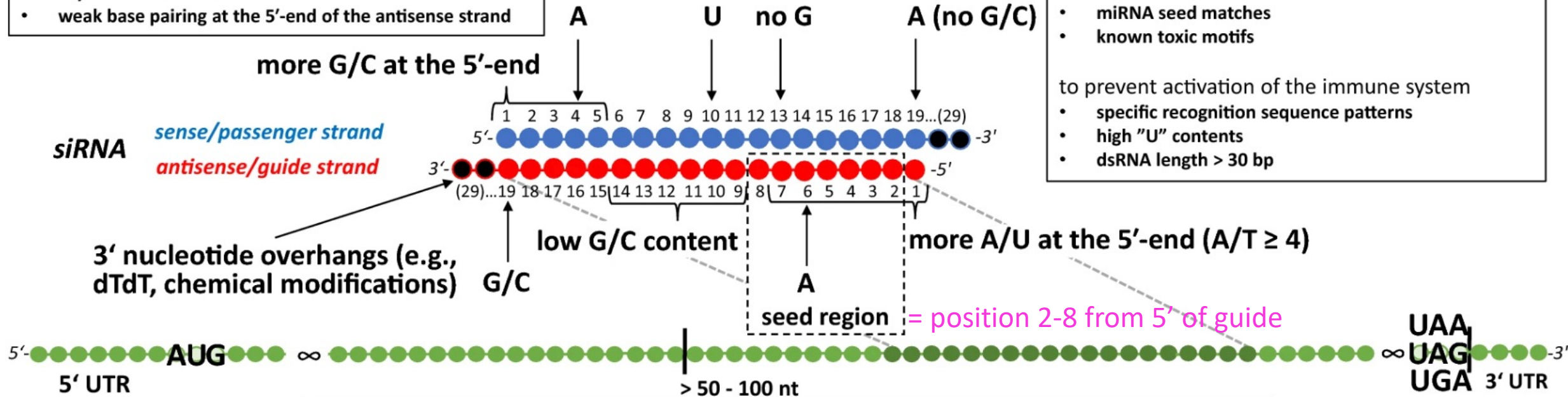
General features that should be avoided:

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



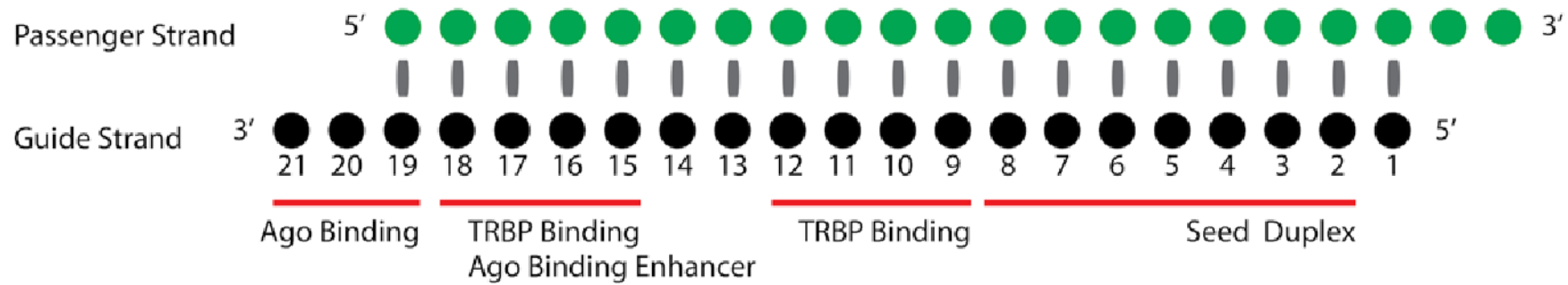
mRNA target position

- 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

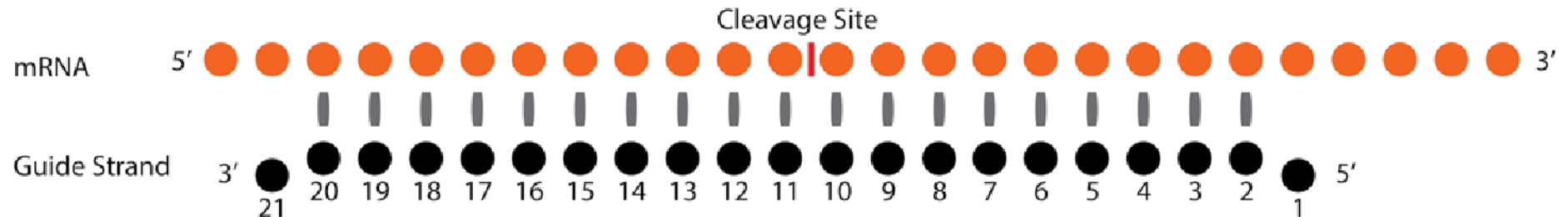
target mRNA

Mechanism of siRNA-Mediated Gene Silencing

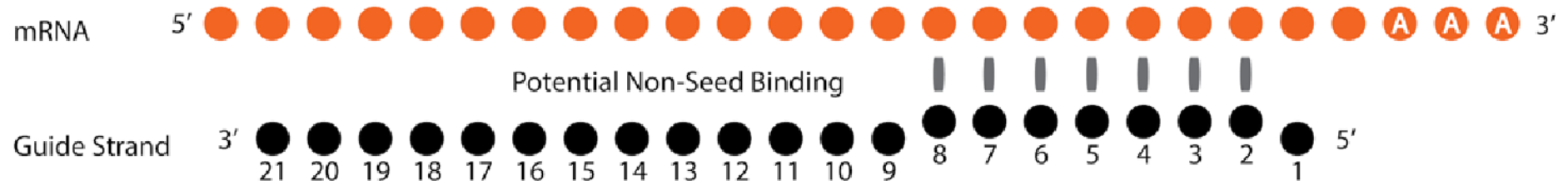
(A) siRNA Duplex



(B) On-Target



(C) Seed-Dependent Off-Target



siRNA: CONTROLLI SPERIMENTALI

- CONTROLLO NON TRATTATO (controllo di trasfezione)

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

- CONTROLLO «POSITIVO»

consente di assicurarsi che il metodo di trasfezione sia sufficiente per ottenere un silenziamento efficace (siRNA contro target noto costitutivamente espresso)

- CONTROLLO «NEGATIVO»

consente di identificare gli effetti specifici della sequenza dagli effetti delle condizioni sperimentali sulle risposte cellulari (non-targeting siRNA)

siRNA: CONTROLLI SPERIMENTALI

- CONTROLLO NON TRATTATO

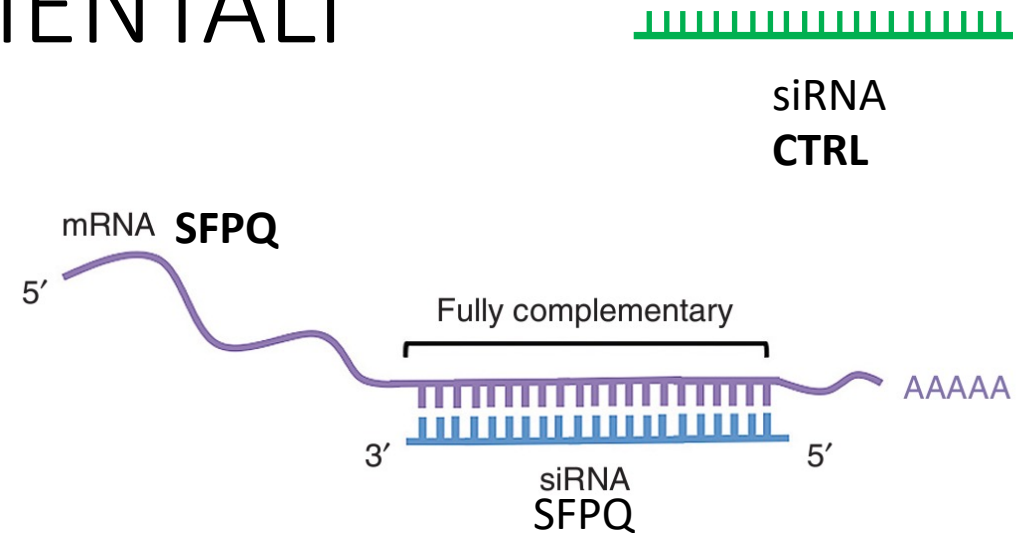
Un controllo non trattato stabilisce un riferimento per i livelli cellulari e i livelli di espressione genica (solo

- CONTROLLO «POSITIVO»

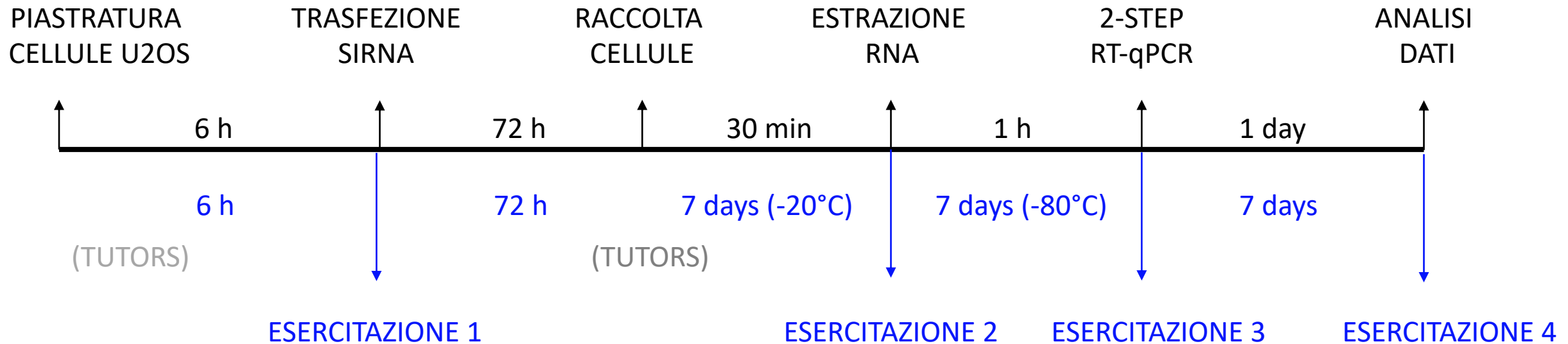
Un controllo positivo ben caratterizzato consente di assicurarsi che il metodo di trasfezione sia sufficiente per ottenere un silenziamento efficace (siRNA contro target noto costitutivamente espresso/ siRNA GFP)

- CONTROLLO «NEGATIVO»

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



SCHEMA SPERIMENTALE



PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

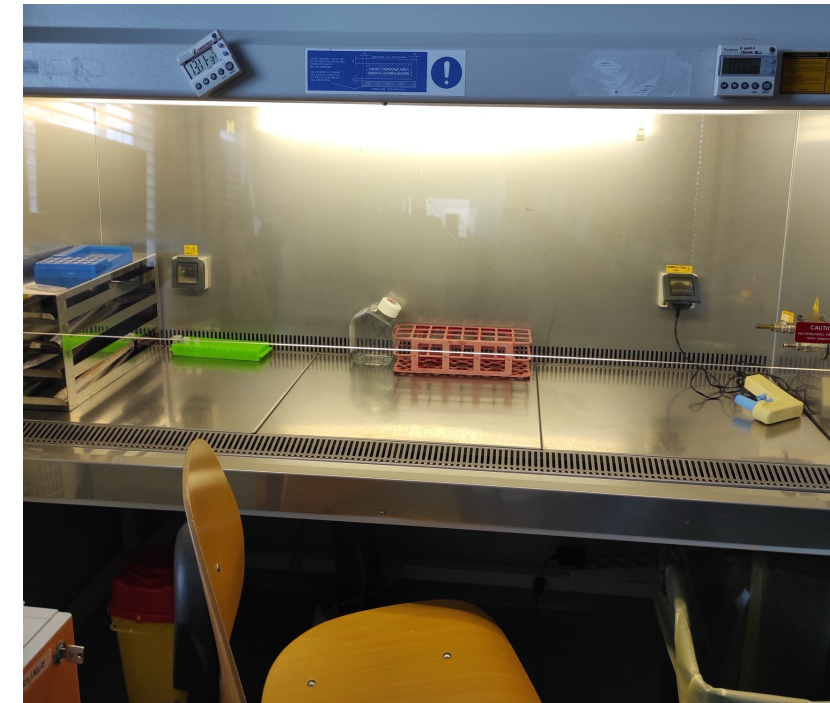
STRUMENTAZIONE:

- Pipette e puntali sterili (20, 200, 1000ul)
- Provette da 1,5 ml
- Vortex
- Microcentrifuga
- Cappa a flusso laminare (**STERILITÀ!!!!!!**)
- Incubatore a 37 °C, 5% CO₂

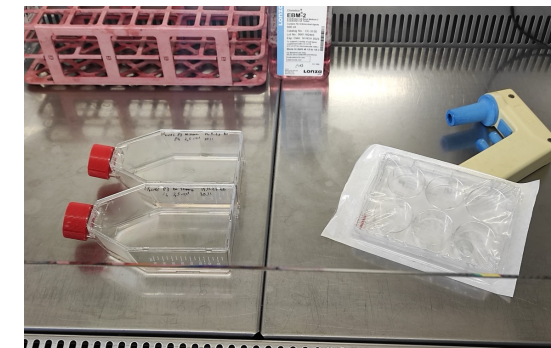
MATERIALE:

- 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™ I
Reduced
Serum Medium



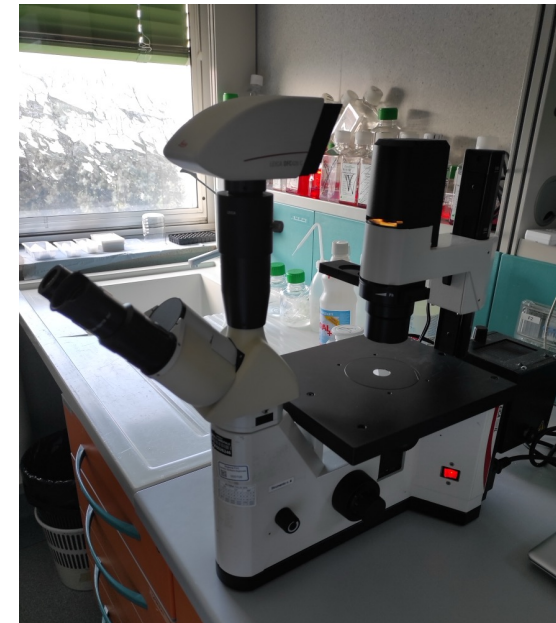
Cappa a flusso laminare consente di lavorare in ambiente sterile



PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

PROCEDIMENTO:

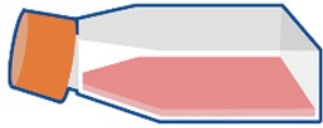
- TEMPO STIMATO PER UNA REAZIONE 25'
- PRIMA di INIZIARE:
 - 1) Controllare le cellule nelle piastre da 6 pozzetti e scegliere un numero:
(1 turno: 1-24) (2 turno 25-48) (3 turno 49 – 72)
Questo numero verrà mantenuto da ogni studente per le esercitazioni successive
 - 2) Osservare le cellule al microscopio e verificare che siano attaccate e distribuite in maniera omogenea nella piastra



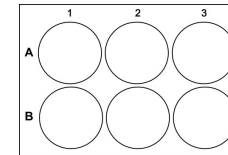
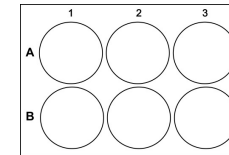
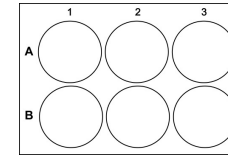
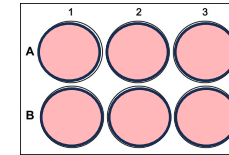
PIASTRATURA CELLULE U2OS

Durante l'esercitazione si osserveranno le cellule al microscopio per valutare confluenza, morfologia e vitalità

Contare le cellule e piastrare 120000 cellule/pozzetto



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



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

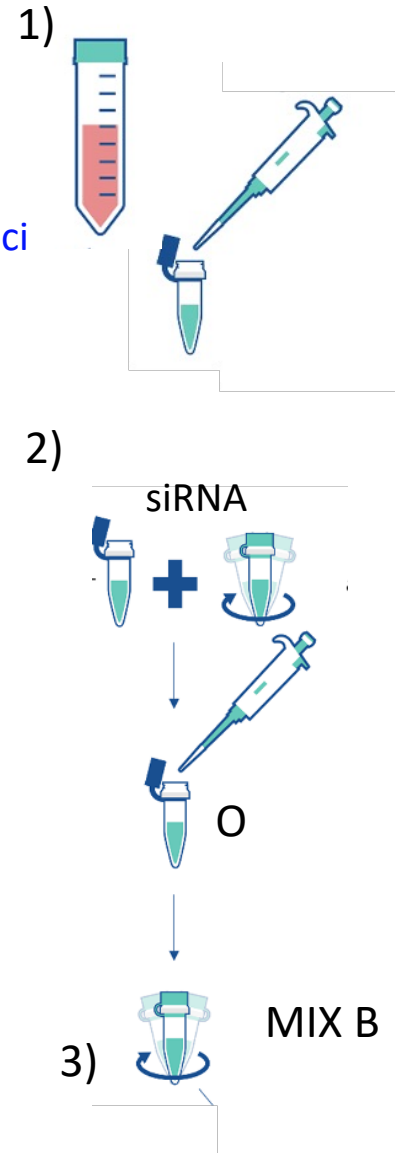
PROTOCOLLO di TRASFEZIONE

LAVORARE SOTTO CAPPa a FLUSSO LAMINARE

OPTI-MEM: terreno privo di siero e antibiotici

PREPARAZIONE SOLUZIONE CONTENENTE i siRNA (mix B):

- 1) In un tubino da 1,5 ml inserire 120 µl di soluzione O (siglare il tubino con il proprio numero)
- 2) Prelevare 30 µl di siRNA C (numero pari) OPPURE siRNA S (numero dispari) e aggiungerli nella provetta contenente la soluzione O.
- 3) Vortex 5'' e spin 5''



PREPARAZIONE MIX di TRASFEZIONE:

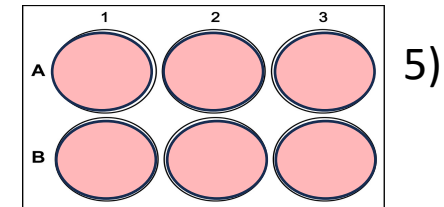
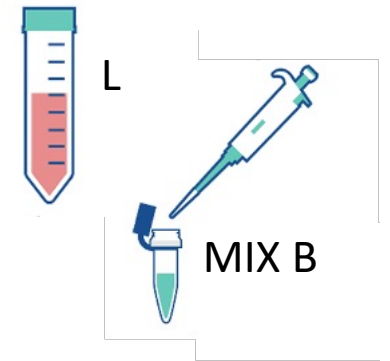
4) prelevare 150 ml di soluzione L (contenente il reagente di trasfezione) dal tubo falcon da 50 ml e inserire nella provetta contenente 150 ml di mix B senza pipettare. Vortexare 5'' e spin 5''

5) Incubare la reazione 20 min a temperatura ambiente

5) Prelevare 300 ml 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)

Muovere lentamente con movimenti circolari la piastra per mescolare bene

6) 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