***SERVIZIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE***

***( S. B. M. )***

**Il compito principale del Servizio di Biologia Molecolare e' quello di fornire ai ricercatori una serie di facilitazioni che consentano agli stessi di poter effettuare esperimenti con maggiore semplicita', velocita' e riproducibilita'.**

Il Servizio di Biologia Molecolare e' a disposizione dei ricercatori per eventuali consulenze o richieste di materiale dalle ore **10.00** alle ore **13.00** di tutti i giorni feriali; si prega pertanto di regolarsi in merito.

Il rispetto delle regole da noi adottate e' necessario per poter mantenere l'organizzazione in efficienza e per poter aumentare il numero delle facilitazioni da offrire.

**I ricercatori sono pregati di collaborare all'espansione del servizio** con nuove proposte ed eventuali suggerimenti. Le nuove proposte saranno vagliate ed eventualmente accettate in rispetto alla fattibilita' ed al valore generale delle stesse.

**5)Batteriologia:**

LB LB Top Agar

LB Top Agarosio

SB NZY Top Agarosio

CaCl2 1M

SOB MgCl2 1M

SM piastre LB

MgSO4 1M piastre LB+amp [100 µg/ml] (rosso)

Glucosio 20% piastre LB+tet [30 µg/ml] (blu)

Maltosio 20% piastre NZY (viola)

-il materiale è reperibile in un armadio sito nel corridoio del Servizio di Biologia Molecolare al terzo piano. Le piastre per batteriologia sono conservate in un frigo nello stesso corridoio.

-per richieste particolari (grandi quantità di mezzi, nuovi mezzi, piastroni, etc.), compilare il modulo allegato e consegnarlo con almeno quattro giorni di anticipo.

**-Si prega di attenersi alle regole sottoelencate al fine di permettere il regolare svolgimento dei nostri compiti:**

=> le bottiglie prelevate dal Servizio vanno tenute separate dalla vetreria di uso corrente e dovranno essere restituite al piu' presto dopo averle sciacquate con acqua corrente e distillata. **NON USARE SAPONE!**

Le bottiglie pulite andranno riposte su una mensola indicata con "*BOTTIGLIE USATE*" nello stesso armadio da cui erano state prelevate.

=> le bottiglie utilizzate per l'acqua sterile, vuote, vanno collocate nell'apposito spazio, evitando di confonderle con le altre.

=> le bottiglie utilizzate per colture cellulari, vuote, vanno sciacquate e riposte sulla mensola collocata nell'anticamera della tissue culture.

**MODULO RICHIESTA**

**SERVIZIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

DATA....../....../........

NOME...................................

GRUPPO..............................

tel.: ........................

===========================================================

**RICHIESTA:**

===========================================================

**QUANTITA':**

===========================================================

**Commenti:**

(tempi di sterilizzazione, ricetta, storaggio, particolarità, etc.)

===========================================================

**consegna necessaria il** : ....../....../.......

**RICETTE BATTERIOLOGIA**

A) MEZZI LIQUIDI

1) **LB** x 10 lt (pH 7)

tryptone 100 g. (OXOID)/(DIFCO)

NaCl 100 g.

yeast extr. 50 g. (OXOID)/(DIFCO)

H2O 10 lt.

-AUTOCLAVARE

2) **SB (Super Broth)** x 10 lt (pH 7.2)

Soluzione {A}

tryptone 120 g. (OXOID)/(DIFCO)

yeast extr. 240 g. (OXOID)/(DIFCO)

glicerolo 50 ml

H2O 9000 ml

Soluzione {B}

K2HPO4 125 g.

KH2PO4 38 g.

H2O 1000 ml

-AUTOCLAVARE {A} e {B} separatamente.

-Far raffreddare a temperatura ambiente

-Unire {A} e {B}

(Alternativamente mischiare {A} e {B} e sterilizzare mediante filtrazione)

3) **SOB** x 1 lt

tryptone 20 g. (OXOID)/(DIFCO)

yeast extr 5 g. (OXOID)/(DIFCO)

\*NaCl 5M 2 ml

KCl 1M 2.5 ml

H2O 1 lt.

-AUTOCLAVARE

-Far raffreddare a 55°C

-**SOC:** Aggiungere:

\*MgCl2 1M 10 ml

\*MgSO4 1M 10 ml

\*glucosio 1M 20 ml

B) MEZZI SEMISOLIDI

1) **piastre LB Agar** x 1 lt

tryptone 10 g.

NaCl 10 g.

yeast extr 5 g.

H2O 1 lt.

mescolare

agar 15 g.

-AUTOCLAVARE

-Far raffreddare a circa 60°C

-(Aggiungere gli antibiotici se richiesti)

-Versare nelle piastre (flambare per eliminare le bolle)

-Far solidificare

-Conservare a 4°C capovolte

Antibiotici:

ampicillina => [100 µg/ml]

tetraciclina => [ 30 µg/ml]

2) **piastre NZY Agar** x 1 lt

NaCl 5 g.

MgSO4-7H2O 2 g.

Yeast extract 5 g.

Tryptone 10 g.

H2O 1 lt.

mescolare e portare a **pH 7.5** con NaOH 1N mescolare

agar 15 g.

-AUTOCLAVARE

-Far raffreddare a circa 60°C

-(Aggiungere gli antibiotici se richiesti)

-Versare nelle piastre (flambare per eliminare le bolle)

-Far solidificare

-Conservare a 4°C capovolte

3) **LB top Agar [7g/lt]**  x 500 ml

Tryptone 5 g.

NaCl 5 g.

H2O 0,5 lt.

mescolare

Agar 3,5 g.

AUTOCLAVARE aliquote da 100 ml in bottiglie da 250 ml

4) **LB top Agarosio [7g/lt]** x 500 ml

Tryptone 5 g.

NaCl 5 g.

H2O 0,5 lt.

mescolare

Agarosio 3,5 g.

AUTOCLAVARE aliquote da 50 ml in bottiglie da 100 ml

100 ml in bottiglie da 250 ml

200 ml in bottiglie da 500 ml

5) **NZY top Agarosio [7g/lt]** x 1000 ml

NaCl 5 g.

MgSO4-7H2O 2 g.

Yeast extract 5 g.

Tryptone 10 g.

H2O 1 lt.

mescolare e portare a **pH 7.5** con NaOH 1N

agarosio 7 g.

AUTOCLAVARE in aliquote da 50 ml in bottiglie da 100 ml

100 ml in bottiglie da 250 ml

200 ml in bottiglie da 500 ml

C) SOLUZIONI

1) **Glucosio 20%** x 1 lt

glucosio 200 g.

H2O bidist ad 1 lt

-sterilizzare per filtrazione (0.22 µm)

-conservare ad R.T. in aliquote da 50 ml in Falcon.

2) **Glucosio 1M** x 100 ml

glucosio 18 g.

H2O deionizzata 90 ml

-riscaldare i 90ml di H2O sterile

- aggiungere un po' per volta il glucosio

(usare un magnetino sterile; attenzione a non far caramellare)

-portare il volume a 100 ml con H2O deionizzata

-filtrare (0,22 µm) ed aliquotare in Falcon da 50ml

3) **KCl 1M** x 1 lt

KCl 74.56 g.

H2O bidist ad 1 lt

4) **Maltosio 20%** x 1 lt

Maltosio 200 g.

H2O bidist ad 1 lt

-sterilizzare per filtrazione (0.22 µm)

-conservare ad R.T. in aliquote da 50 ml in Falcon

5) **NaCl 5M** x 1 lt

Na Cl 292,2 g.

H2O bidist ad 1 lt

-AUTOCLAVARE

6) **MgSO4 1 M** x 1 lt

MgSO4-7H2O 246,48 g.

H2O bidist ad 1 lt

-AUTOCLAVARE in aliquote da 100 ml

7) **CaCl2 1M** x 1 lt

CaCl2-2H2O 147,02 g.

H2O bidist ad 1 lt

-AUTOCLAVARE in aliquote da 100 ml

8) **SM (TRIS Phage buffer)** x 1 lt

Na Cl 5,8 g.

MgSO4-7H2O 2 g.

TRIS-Cl 1 M (pH 7,5) 50 ml

gelatina 2% (in H2O) 5 ml

H2O bidist ad 1 lt

-AUTOCLAVARE in aliquote da 250 ml

-far raffreddare

-conservare ad R.T.

9) **MgCl2 1 M** x 1 lt

MgCl2-6H2O 203,3 g.

H2O bidist ad 1 lt

-AUTOCLAVARE in aliquote da 100 ml

10) **TRIS–Cl 1 M pH 7,5** x 1 lt

TRIS base 121,1 g.

HCl concentrato circa 65 ml

H2O 800 ml

-controllare il pH

-portare ad 1 lt

-AUTOCLAVARE

12) **Gelatina 2%** in H2O

-AUTOCLAVARE

13) **Ampicillina [100 mg/ml]** in H2O

-sterilizzare mediante filtrazione (0.22 µm)

-conservare a -20°C in aliquote da 1 ml al riparo dalla luce

14) **Tetraciclina [5 mg/ml]** in Etanolo

-conservare a -20°C in aliquote da 1 ml al riparo dalla luce

15) **Kanamicina [25 mg/ml]** in H2O

-sterilizzare mediante filtrazione (0.22 µm)

-conservare a -20°C in aliquote da 2 ml

**6) Colture Cellulari:**

PBS 10x

PBS 1X

F-12

DMEM

**RICETTE**

1) **PBS 10X** x 5 lt

NaCl 400 g.

KCl 10 g.

Na2HPO4 72 g.

KH2PO4 12 g.

-aggiungere 4 lt di H2O

-portare a pH 7.3 con HCl

-portare a volume

-Sterilizzare mediante filtrazione

2) **PBS 1X** x 5 lt

NaCl 40 g.

KCl 1 g.

Na2HPO4 7.2 g.

KH2PO4 1.2 g.

-aggiungere 4 lt di H2O

-portare a pH 7.3 con HCl

-portare a volume

-Sterilizzare mediante filtrazione

3) **F-12 pH 7.1** x 10 lt

-versare in 8 lt di H2O bidistillata:

F-12 (Sigma-code: F6636) 116.2 g.

NaHCO3 (Bicarbonato di Sodio) 26.76 g.

-portare a pH con HCl

-portare a volume

-filtrare (filtro da 0,2 µm)

-mettere in bottiglie sterili e conservare a 4°C

4) **DMEM pH 7.1** x 10 lt

-versare in 8 lt di H2O bidistillata:

Dulbecco's MEM (Gibco-code: 074-02100P) 133.8 g.

(aspettare che la polvere precipiti in soluzione e poi agitare)

NaHCO3 (Bicarbonato di Sodio) 26.76 g.

C3H3O3Na (piruvato di sodio) 1.1 g.

-portare a pH con HCl

-portare a volume

-filtrare (filtro da 0,2 µm)

-mettere in bottiglie sterili e conservare a 4°C

**7) Stock Reagenti per la Biologia Molecolare:**

-**RNase A** - DNAse-free [10 mg/ml] (aliquote da 500 µl)

in TRIS 10 mM pH7.5-NaCl 15 mM (tenuto 15' a 100°C)

-**DNase I** [10 mg/ml] (aliquote da 50 µl)

in TRIS 50 mM pH7.5-MgCl2 10 mM-DTT 1 mM-glicerolo 50%

-**Proteinase K** [10 mg/ml] (aliquote da 500 µl)

in TRIS 10 mM pH7.5-CaCl2 1 mM

-**Ampicillina** [100 mg/ml] in H2O (aliquote da 1 ml)

-**Tetraciclina** [5 mg/ml] in etanolo (aliquote da 1 ml)

-**X-Gal** (confezioni da 100 mg)

-**IPTG** (confezioni da 1 g)

-**PCR dNTP Mix** 10X (2 mM)-(aliquote da 200 µl)

-**DNA molecular weight markers**:

a)  Hind III [0,5 µg/µl] (Promega) (aliquote da 20 µl)

b)  Hind III + EcoR I [0,5 µg/µl] (Promega) (aliquote da 20 µl)

c) ladder 100 [1 µg/µl] (Pharmacia) (aliquote da 20 µl)

d) ladder 1000 [0,5 µg/µl] (Pharmacia) (aliquote da 20 µl)

**-Glicogeno** [20 mg/ml] (aliquote da 200 µl)

**-Carrier RNA:** [5 mg/ml] (aliquote da 1 ml)

RNA: Ribonucleic acid from **yeast** (Boehringer Cat. N. 109223)

PREPARAZIONE DI CARRIER RNA

-Sciogliere 1 g di RNA in 100 ml H2O.

-Aggiungere 10 ml di 10% SDS e 500 µl di proteinase K [10mg/ml]

-Incubare 2 - 6 hours at 50°C.

-Estrarre con 100 ml fenolo saturato in H2O finche' scompare l'interface.

-Aggiungere 1/10 di 3M NaAcetato e 2 volumi di etanolo.

-Lasciare in ghiaccio per 30'.

-\*(ci si puo' fermare e lasciare l'RNA at -20oC)

-Spin 10' a 4000 rpm.

-Lavare il pellet con Etanolo 70%.

-Sciogliere in 50 ml di: 50mM Tris pH7.5

10 mM MgCl2

1 mM CaCl2

Aggiungere 100µl di DNaseI [10 mg/ml].

Incubare a 37oC per 60'.

Aggiungere 5 ml di SDS 10% and 250 µl proteinase K [10 mg/ml].

Incubare 2 hrs a 50 oC.

Estrarre con fenolo saturato in H2O (3x).

Estrarre con cloroformio (3x).

Aggiungere 1/10 di 3M Na-acetato e 2 volumi di etanolo.

Lasciare in ghiaccio per 30'.

\*(ci si puo' fermare e lasciare l'RNA at -20oC)

Spin 10' a 4000 rpm.

Lavare il pellet con 70% etanolo (3x).

Risospendere ad una concentrazione di 10 mg/ml.(una diluizione 1:1000 in H2O dovrebbe leggere 0.2 a 260 nm).

Conservare a -20°C.

**-Carrier DNA (sonicated Salmon Sperm DNA):** [10 mg/ml] (aliquote da 1 ml)

PREPARAZIONE DI CARRIER DNA

Sciogliere 1g di **salmon testes** DNA (Sigma cat # D-1626) in 100 ml di H2O.

Mix overnight su rotating wheel.

Sonicare (5x) con la punta grande a output 7 per 30" lasciando raffreddare il campione in ghiaccio ogni volta per 5'

Estrarre (3x) con fenolo saturato in Tris pH 8.0.

Estrarre (3x) con cloroformio.

Aggiungere 1/10 di Na-acetato 3M e 2 volumi di etanolo.

Lasciare 30' in ghiaccio

Spin 5' a 4000 rpm.

Lavare il pellet 3 volte con etanolo 70%.

Risospendere in H2O ad una concentrazione di 10 mg/ml.

(una diluizione 1:1000 in H2O dovrebbe leggere 0.2 a 260 nm).

Conservare a -20°C.

-**pBS PCR-Screening:** (caratterizzazione diretta da colonia)

T3 PCR primer (25 mer): 5'-GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG A-3'

T7 PCR primer (25 mer): 5'-GCG CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA G-3'

**P**relevare una colonia singola con uno stecchino pulito ed agitarlo brevemente in 20 µl della **PCR-mix** .

**Non dimenticare di prelevare un controllo negativo!**

**U**sare lo stesso stecchino per inoculare le colonie nel tubo corrispondente e crescerle O.N. a 37°C.

**E**seguire la seguente reazione di PCR:

lysis step 95°C 5 min

30 cicli: 94°C 1 min

52°C 1 min

72°C 2 min

elongation step finale: 72°C 5 min

cooling step (se senza olio) 25°C 15 min

**C**ontrollare mediante gel di agarosio i prodotti di PCR, caricando 10 µl di ogni campione.

**PCR-mix:**

MgCl2 25 mM 1.2 µl

buffer 10x 2 µl

dNTP 2 mM 2 µl

T3 PCR primer [50 pmol/µl] 0.4 µl

T7 PCR primer [50 pmol/µl] 0.4 µl

H2O 13 µl

Taq DNA Pol [0.5 u/µl] 1 µl

La Taq DNA polymerase [5 u/µl] e' diluita 1/10 in H2O.