

Studiare il polimorfismo **Alu PV92** tramite **PCR**

Obiettivo Analizzare campioni di DNA genomico umano relativamente al polimorfismo Alu PV92, tramite reazione di PCR con primer specifici e successiva elettroforesi su gel d'agarosio.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Acqua deionizzata sterile
- Puntali sterili
- Provette sterili da 0.2 ml per PCR
- Provette sterili da 1.5 ml
- Campioni di DNA genomico umano
- PCR buffer II 10X (senza magnesio)
- $MgCl_2$ 25 mM
- Miscela di dNTPs 10 mM
- Primer Forward 10 μM
(5' - GGATCTCAGGGTGGGTGGCAATGC - 3')
- Primer Reverse 10 μM
(5' - GAAAGGCAAGCTACCAGAAGCCCCAA - 3')
- AmpliTaq polimerasi 5 U/ μl
(Applied Biosystem; numero catalogo: N8080153)



Strumenti

- Micropipette
- Termociclatore
- Centrifuga (facoltativa)



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

15 minuti per la preparazione dei campioni
Circa due ore per la reazione di amplificazione
Circa un'ora per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati



Procedimento

1. Marcare due provette pulite da 1.5 ml rispettivamente con “Master mix” e “Primer mix”. Dal momento che le quantità utilizzate per le singole reazioni di PCR sono molto ridotte, si procede con la creazione di un’unica miscela contenente tutti i prodotti necessari per realizzare la PCR tranne il DNA genomico, così da evitare errori legati al prelievo di volumi molto piccoli di soluzioni liquide.
2. Per analizzare 19 campioni (16 campioni di DNA genomico, 1 controllo positivo, 1 controllo negativo e 1 campione in eccesso) preparare 1 ml di Master Mix (MM) come segue:

COMPONENTE	VOLUME IN 1 ML DI MM	CONCENTRAZIONE NELLA MM	CONCENTRAZIONE FINALE NELLA REAZIONE
PCR Buffer II 10X	250 µl	2.5X	1X
MgCl ₂ 25 mM	150 µl	3.75 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	200 µl	2 mM	0.8 mM
AmpliTaq 5 U/µl	15 µl	0.075 U/µl	0.03 U/µl
dH ₂ O	385 µl	-	-

3. Per analizzare 19 campioni (16 campioni di DNA genomico, 1 controllo positivo, 1 controllo negativo e 1 campione in eccesso) preparare 0.4 ml di Primer Mix (PM) come segue:

COMPONENTE	VOLUME IN 0.4 ML DI PM	CONCENTRAZIONE NELLA PM	CONCENTRAZIONE FINALE NELLA REAZIONE
Primer Forward 10 µM	20 µl	0.5 µM	200 nM
Primer Reverse 10 µM	20 µl	0.5 µM	200 nM
dH ₂ O	360 µl	-	-

4. Preparare Master Mix e Primer Mix poco prima dell'attività sperimentale e conservarle in ghiaccio. Modificare il volume finale di MM e PM in funzione del numero totale di campioni da analizzare, considerando che nei prelievi si perde qualche microlitro di materiale.
5. Predisporre tante provette sterili da 0.2 ml per PCR quanti saranno i campioni da analizzare più due (una per il controllo positivo, effettuato con DNA genomico noto, cioè di cui si conosce il polimorfismo; una per il controllo negativo, effettuato senza l'aggiunta del DNA genomico). Marcare le provette con numeri crescenti e con "+" e "-".
6. Preparare ogni campione come segue:

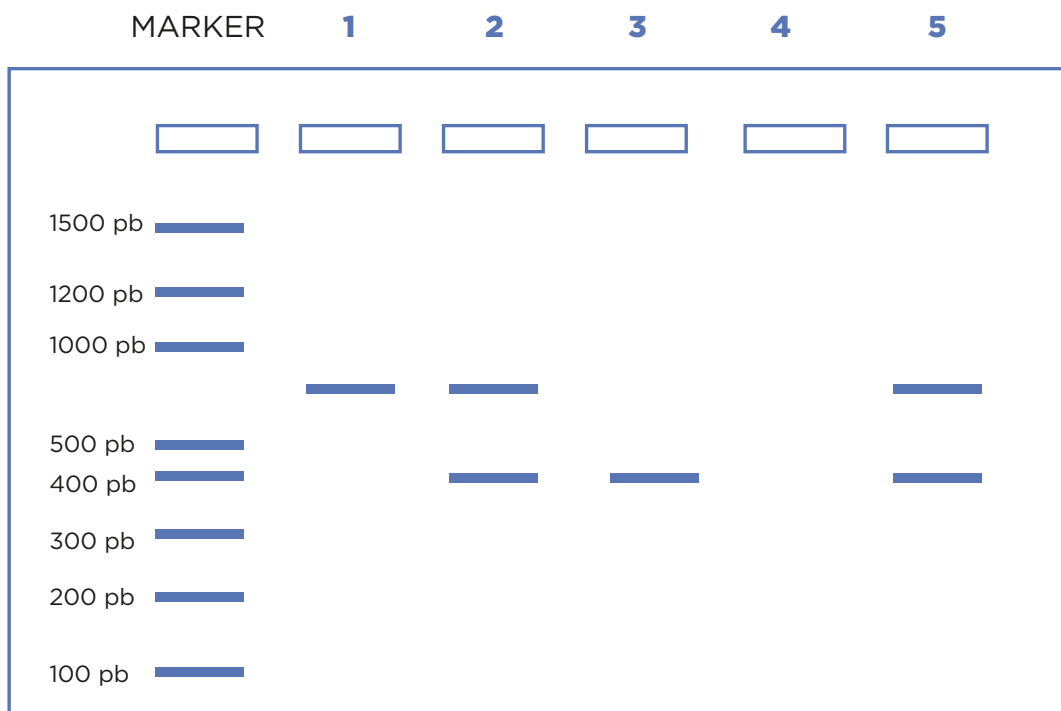
CAMPIONE	MM	PM	DNA GENOMICO	dH ₂ O
Campioni da analizzare (1-16)	20 µl	20 µl	10 µl	-
Campione positivo (+)	20 µl	20 µl	10 µl	-
Campione negativo (-)	20 µl	20 µl	-	10 µl

7. Impostare il termociclatore con il seguente programma:

95°C	2 minuti	1 ciclo
94°C	30 secondi	
60°C	30 secondi	30 cicli
72°C	2 minuti	
72°C	10 minuti	1 ciclo
4°C		infinito

8. Analizzare il risultato della PCR tramite elettroforesi su gel d'agarosio, preparando un gel al 2% e seguendo il protocollo sperimentale "Preparazione del gel d'agarosio" nella sezione "Biologia molecolare".
9. Predisporre i campioni per il caricamento su gel come descritto nel protocollo "Elettroforesi su gel d'agarosio" nella sezione "Biologia molecolare", caricando circa 20 µl di prodotto di PCR per ogni campione e impostando la differenza di potenziale a 150V per circa 30 minuti.
10. Porre il gel sul transilluminatore e analizzare il risultato della PCR.

11. Il risultato dell'analisi è riprodotto nell'immagine sottostante. Nel primo pozzetto è stato caricato il DNA Marker. Il campione 1 è omozigote per l'inserzione Alu PV92 e dà luogo a un'unica banda della lunghezza di circa 715 pb, il campione 2 è eterozigote e mostra due bande, rispettivamente di 715 pb (inserzione dell'elemento Alu) e di 415 pb (nessuna inserzione), il campione 3 è omozigote negativo e presenta un'unica banda di 415 pb senza inserzione dell'elemento Alu. Il campione 4 è il controllo negativo e non presenta alcuna amplificazione, dal momento che non è stato utilizzato DNA genomico, mentre il campione 5 è il controllo positivo e mostra la presenza di entrambi i frammenti (con e senza inserzione).



Note

- Le ripetizioni Alu, classificate come elementi SINE (Short Interspersed Elements), sono lunghe circa 300 paia di basi e prendono il loro nome dal fatto che all'incirca alla metà della loro sequenza è presente un sito riconosciuto dall'enzima di restrizione Alu I. Il genoma umano contiene circa 1 milione di elementi Alu, uno ogni 2000 paia di basi. Gli elementi Alu rappresentano uno dei più abbondanti elementi trasponibili presenti nel nostro genoma.
- Il polimorfismo Alu PV92, analizzato tramite questo protocollo sperimentale, si trova sul cromosoma 16 ed è presente in due varianti, detti alleli: una variante corta, senza l'inserzione dell'elemento Alu, e una variante lunga con l'inserzione. Utilizzando una coppia di primer specifica che fiancheggia questa regione, è possibile amplificare il DNA genomico e scoprire se un determinato individuo possiede in entrambe gli alleli l'inserzione (omozigote positivo o +/+), non la possiede (omozigote negativo o -/-) oppure se un allele la possiede e l'altro no (eterozigote o +/-). Il polimorfismo Alu PV92 non ha alcun significato patologico: non è associato a una malattia specifica né a sue predisposizioni, pertanto si presta ad essere analizzato anche in classe.
- L'analisi del polimorfismo Alu nel locus PV92 consente di introdurre la genetica delle popolazioni e permette di evidenziare, con l'approccio sperimentale, la diversità genetica che c'è tra gli individui. Una possibile continuazione dell'attività sperimentale può essere quella di far calcolare agli studenti la frequenza allelica dell'inserzione, cioè la percentuale con cui l'allele con l'inserzione Alu è presente nella "popolazione classe" o nella "popolazione scuola".
- A volte nel gel è possibile visualizzare delle bande spurie, cioè non specifiche. Se sono nella parte bassa del gel (al di sotto di 100 paia di basi) si tratta dei dimeri del primer che non sono stati incorporati nella reazione di PCR. A volte compaiono frammenti tra i 1000-1500 pb che potrebbero essere il risultato della formazione di eteroduplex tra molecole a singolo filamento di 415 pb e 715 pb.