

Amplificazione di **DNA** genomico di **funghi** mediante **PCR**

Obiettivo Amplificare campioni di DNA genomico di funghi tramite PCR, utilizzando i primer universali ITS1 e ITS4, che legano le regioni conservate ITS1 e ITS2 dell'RNA ribosomiale fungino.

Autore Istituto Augusto Monti di Asti
Primo classificato Mad for Science 2018
Progetto "Funghi - Questi sconosciuti"



Materiali e reagenti

- Campioni di DNA genomico di funghi
- PCR Buffer 10X (senza $MgCl_2$)
- $MgCl_2$ 25 mM
- dNTPs 100 mM
- Primer Forward ITS1 100 μM
(5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3')
- Primer Reverse ITS4 100 μM
(5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3')
- Taq DNA Polymerase 5 U/ μl
- Acqua deionizzata sterile
- Puntali sterili
- Provette sterili da 1.5 ml
- Provette sterili da 0.2 ml per PCR
- Pennarello



Strumenti

- Micropipette
- Microcentrifuga
- Termociclatore



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

20-30 minuti per la preparazione dei campioni
Circa due ore per la reazione di amplificazione nel termociclatore



Procedimento

1. Scongelare, tenendo in ghiaccio, il DNA genomico fungino, purificato secondo il protocollo “Estrazione di DNA genomico da funghi” (sezione: “Biologia molecolare”), e i reagenti necessari alla realizzazione della PCR (PCR Buffer, $MgCl_2$, dNTPs, Primer, Taq DNA Polymerase). Centrifugare le varie provette per far scendere le goccioline presenti sulle pareti.
2. Diluire i dNTPs ad una concentrazione intermedia rispetto a quella finale richiesta dalla reazione, in modo da non trovarsi nella situazione di dover prelevare dei volumi molto piccoli con il rischio di compromettere la reazione di PCR. In particolare:
 - preparare quattro provette sterili da 1.5 ml e segnare su ognuna l’iniziale del nucleotide (A, T, C e G), la concentrazione e la data di preparazione;
 - diluire ogni nucleotide dalla concentrazione iniziale di 100 mM alla concentrazione intermedia di 10 mM (diluizione 1:10), facendo attenzione a cambiare puntale tra un nucleotide e l’altro. È possibile eseguire la diluizione che più si ritiene ottimale. Per preparare, ad esempio, 100 μ l di Adenina concentrata 10 mM, bisognerà trasferire 90 μ l di acqua deionizzata sterile nella provetta A, aggiungere 10 μ l di Adenina concentrata 100 mM e mescolare con movimento *up and down* della micropipetta.
3. Diluire i due Primer ad una concentrazione intermedia rispetto a quella finale richiesta dalla reazione di PCR, seguendo i passaggi sottostanti:
 - preparare due provette sterili da 1.5 ml e segnare su ognuna il nome del primer, la concentrazione e la data di preparazione;
 - diluire il Primer Forward ITS1 dalla concentrazione iniziale di 100 μ M alla concentrazione intermedia di 10 μ M (diluizione 1:10). È possibile eseguire la diluizione che più si ritiene opportuna. Per preparare, ad esempio, 100 μ l di Primer Forward ITS1 concentrato 10 μ M, bisognerà trasferire 90 μ l di acqua deionizzata sterile nella provetta, aggiungere 10 μ l di Primer Forward concentrato 100 μ M e mescolare con movimento *up and down* della micropipetta;
 - diluire il Primer Reverse ITS4 dalla concentrazione iniziale di 100 μ M alla concentrazione intermedia di 10 μ M (diluizione 1:10), come riportato nel punto precedente.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE INTERMEDIA
dATP	100 mM	10 mM
dCTP	100 mM	10 mM
dGTP	100 mM	10 mM
dTTP	100 mM	10 mM
ITS1	100 μ M	10 μ M
ITS4	100 μ M	10 μ M

- Prendere una provetta pulita da 1.5 ml e scrivere sul tappo la dicitura "Master Mix". Dal momento che le quantità utilizzate per le singole reazioni di PCR sono molto ridotte, si procede con la preparazione 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.
- Considerando che una singola reazione di PCR richiede un volume finale di 50 μ l, determinare i volumi di ogni singola componente di PCR da inserire nella Master Mix, come segue:

COMPONENTE	VOLUME IN 50 μ l DI MASTER MIX (1 REAZIONE)	CONCENTRAZIONE FINALE IN 50 μ l DI MASTER MIX
PCR Buffer 10X	5 μ l	1X
MgCl ₂ 25 mM	2 μ l	1 mM
dATP 10 mM	1 μ l	200 μ M
dCTP 10 mM	1 μ l	200 μ M
dGTP 10 mM	1 μ l	200 μ M
dTTP 10 mM	1 μ l	200 μ M
ITS1 10 μ M	2.5 μ l	0.5 μ M
ITS4 10 μ M	2.5 μ l	0.5 μ M
Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l	0.5 μ l	0.05 U/ μ l
Acqua	33.5 μ l	-
TOTALE	50 μl	-

6. Determinare il numero di campioni di DNA da amplificare, tenendo presente di considerare sempre un controllo positivo (ovvero un campione di DNA già testato precedentemente), un campione negativo (ovvero un campione senza materiale genetico) e almeno un campione in eccesso, in quanto nei prelievi si perde sempre qualche microlitro di materiale.
7. Calcolare il volume delle singole componenti di PCR per amplificare, ad esempio, 10 campioni (7 campioni di DNA fungino, 1 controllo positivo, 1 controllo negativo e 1 campione di eccesso) e preparare 500 µl di Master Mix secondo i volumi riportati in tabella, tenendo sempre tutte le provette in ghiaccio e cambiando puntale tra una componente e l'altra. Modificare il volume dei singoli reagenti e il volume finale di Master Mix in funzione del numero totale di campioni da analizzare.

COMPONENTE	VOLUME IN 500 µl DI MASTER MIX (10 REAZIONI)
PCR Buffer 10X	50 µl
MgCl ₂ 25 mM	20 µl
dATP 10 mM	10 µl
dCTP 10 mM	10 µl
dGTP 10 mM	10 µl
dTTP 10 mM	10 µl
ITS1 10 µM	25 µl
ITS4 10 µM	25 µl
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	5 µl
Acqua	335 µl
TOTALE	500 µl

8. Predisporre tante provette sterili da 0.2 ml per PCR quanti sono i campioni da analizzare e marcarle con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, controllo + e controllo -. Prendere nota su un foglio a parte del nome del campione associato alla numerazione.

9. Preparare il DNA genomico fungino da usare nella reazione di amplificazione: in base alla concentrazione del DNA in analisi, quantificato con lo spettrofotometro (secondo il protocollo “Quantificazione del DNA allo spettrofotometro” nella sezione “Biologia molecolare”), eseguire una o più diluizioni per ottenere una concentrazione finale di 4 ng/μl di DNA.

10. Allestire la reazione di PCR nelle provette da 0.2 ml secondo i volumi sotto riportati:

COMPONENTE	MASTER MIX	DNA	ACQUA
Campioni da analizzare (1-7)	48 μl	2 μl	-
Controllo +	48 μl	2 μl	-
Controllo -	48 μl	-	2 μl

11. Trasferire le provette da 0.2 ml nel termociclatore e impostare il seguente programma:

95°C	5 minuti	1 ciclo
95°C	40 secondi	
55°C	50 secondi	35 cicli
72°C	50 secondi	
72°C	8 minuti	1 ciclo
4°C		infinito

12. Terminato il programma di amplificazione, conservare le provette a 4°C, per alcuni giorni, oppure a -20°C.

13. Analizzare il risultato della PCR tramite elettroforesi su gel d’agarosio all’1.5%, seguendo il protocollo sperimentale “Valutazione degli amplificati di PCR da DNA genomico fungino mediante corsa elettroforetica”. La corsa elettroforetica dovrebbe evidenziare una banda tra 600 e 700 pb per tutti i campioni amplificati, ad eccezione del controllo negativo.

Note

- Per eseguire una diluizione, ovvero passare da una concentrazione ad un'altra più piccola, si utilizza la formula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ (C_1 è la concentrazione iniziale; V_1 è il volume iniziale; C_2 è la concentrazione finale; V_2 è il volume finale desiderato). Nell'eseguire la diluizione dei dNTPs, si applica la seguente formula inversa derivata alla precedente $V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$, dove C_1 è 100 mM, V_2 è 100 μ l (il volume è scelto arbitrariamente), C_2 è 10 mM e V_1 è il volume da prelevare dalla provetta a concentrazione 100 mM e da risospendere in acqua ($V_{acqua} = V_2 - V_1$) per arrivare al volume finale di 100 μ l.
- I primer sono forniti in forma liofilizzata, per cui la prima volta che vengono utilizzati devono essere ricostituiti con acqua deionizzata sterile, secondo le informazioni riportate nella scheda dati di accompagnamento al prodotto.
- I primer ITS1 e ITS4 riconoscono le regioni ITS1 e ITS2, ovvero due spaziatori genici non codificanti e interni all'RNA ribosomiale degli eucarioti. In particolare, lo spaziatore ITS1 si trova tra il gene 18S della subunità 40S e il gene 5.8S della subunità 60S ribosomiale; lo spaziatore ITS2 è collocato tra il gene 5.8S e il gene 28S entrambi della subunità 60S del ribosoma. Si tratta, quindi, di primer universali per i funghi, perché permettono di amplificare porzioni di DNA comuni a tutti i miceti.
- Nella preparazione della Master Mix iniziare sempre dal volume più grande, ovvero l'acqua, e concludere con la Taq DNA Polymerase.
- Preparare la Master Mix poco prima dell'attività sperimentale e conservarla in ghiaccio fino al suo utilizzo.
- Per il protocollo descritto, Taq DNA Polymerase, PCR Buffer 10X e magnesio cloruro sono stati acquistati dalla Sigma (numero di catalogo: D4545), mentre i nucleotidi da Solis Biodyne (numero di catalogo: 02-21-00100). È possibile realizzare il seguente protocollo anche con prodotti analoghi, acquistati da altre aziende.