

Valutazione degli **amplificati** di PCR da **DNA** genomico **fungino** mediante **corsa elettroforetica**

Obiettivo Determinare su gel di agarosio all'1.5% il peso molecolare di campioni amplificati mediante PCR con primer ITS1 e ITS4, a partire da DNA genomico di funghi.

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



Materiali e reagenti

- Tampone di corsa TBE 10X
- Acqua deionizzata
- Agarosio in polvere per elettroforesi
- Agente intercalante del DNA (vedi note)
- Tampone di caricamento 6X
- Amplificati di PCR
- Marcatore di peso molecolare
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Cilindro da 1L
- Cilindro da 100 ml
- Becher o beuta da 250 ml (resistente al calore)
- Puntali
- Provette da 1.5 ml
- Ancoretta magnetica (facoltativa)
- Scotch resistente al calore o supporto per la slitta elettroforetica
- Parafilm®
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia
- Microonde (o piastra magnetica riscaldante)
- Microcentrifuga
- Micropipette
- Apparato di corsa elettroforetica (camera, slitta e pettine)
- Generatore di differenza di potenziale
- Generatore di luce UV o luce blu



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore
- Occhiali di protezione



Tempo

40 minuti per la preparazione e il raffreddamento del gel
15 minuti per la preparazione e il caricamento dei campioni (la tempistica varia a seconda del numero di campioni)

40 minuti per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati



Procedimento

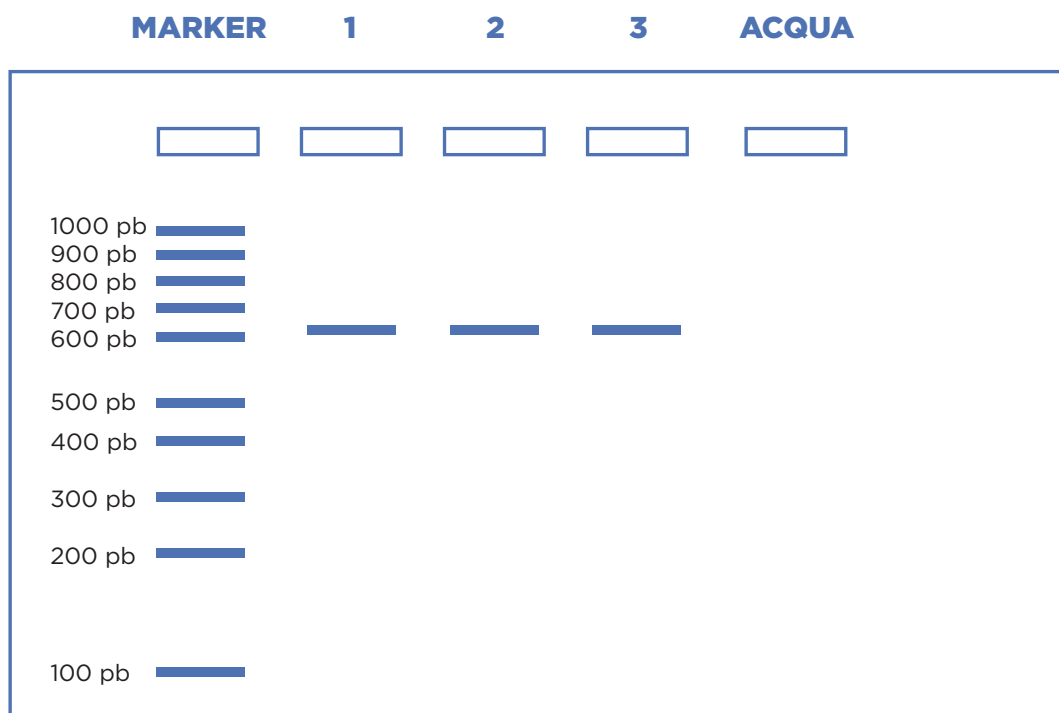
- 1.** Per eseguire questo protocollo è necessario disporre di amplificati di DNA genomico fungino, ottenuti tramite reazione di PCR con i primer ITS1 e ITS4, come da protocollo “Amplificazione di DNA genomico di funghi mediante PCR”.
- 2.** Diluire il tampone di corsa TBE 10X: trasferire 100 ml di tampone TBE 10X in un cilindro pulito da 1L e aggiungere 900 ml di acqua deionizzata (modificare i volumi a seconda della necessità). Coprire l’imboccatura del cilindro con il Parafilm® e mescolare per inversione.
- 3.** Per preparare il gel d’agarosio all’1.5%, con una bilancia pesare 1.5 g di agarosio in polvere e trasferirlo in una beuta da 250 ml.
- 4.** Aggiungere all’agarosio 100 ml di tampone TBE 1X e mescolare.
- 5.** Per favorire il completo scioglimento dell’agarosio, inserire la beuta in un forno a microonde e scaldare alla massima potenza ad intervalli di 30 secondi. In alternativa, inserire nella beuta una ancoretta e mescolare la soluzione su piastra magnetica riscaldante.
- 6.** Di tanto in tanto, agitare la beuta usando i guanti di protezione dal calore per permettere all’agarosio di sciogliersi in modo uniforme. L’agarosio è sciolto quando la soluzione diventa completamente limpida.
- 7.** Lasciare raffreddare la soluzione ad una temperatura tale per cui si riesca a maneggiare la beuta senza scottarsi (circa 50°C).
- 8.** Nel frattempo allestire la slitta elettroforetica: chiudere i due lati liberi con lo scotch e posizionare il pettine. Verificare che non ci siano spazi da cui potrebbe fuoriuscire il gel.
- 9.** Quando il gel d’agarosio sarà sufficientemente raffreddato, aggiungere l’agente intercalante e mescolare. In questo protocollo si utilizza il SYBR™ Safe 10.000X di Thermofisher (10 µl in 100 ml di gel), ma in commercio esistono tante diverse alternative (vedi note).
- 10.** Versare lentamente il gel d’agarosio ancora caldo nella slitta elettroforetica e verificare che sia distribuito in maniera uniforme. In caso di formazione

di bolle, usare un puntale per spostarle verso i bordi della slitta o dove non intacchino la corsa dei campioni.

- 11.** Lasciare solidificare il gel a temperatura ambiente per circa 30 minuti.
- 12.** Mentre il gel si raffredda, allestire la cella elettroforetica, versando il tampone di corsa TBE 1X, preparato al punto 1, fino a raggiungere le tacche laterali.
- 13.** Quando il gel si è solidificato, rimuovere lo scotch, trasferire il gel nella cella elettroforetica, verificando che il tampone lo ricopra completamente, e rimuovere delicatamente il pettine, sollevandolo in verticale rispetto al piano di lavoro (procedere con attenzione per evitare di danneggiare i pozzetti).
- 14.** Predisporre gli amplificati di PCR per il caricamento su gel: disporre tante provette da 1.5 ml vuote, che andranno numerate in ordine crescente, quanti sono i campioni di DNA da caricare. In ogni provetta, trasferire 8 μ l di campione di DNA e aggiungere con un movimento *up and down* della micropipetta 2 μ l di tampone di caricamento 6X, avendo l'accortezza di cambiare il puntale ad ogni aggiunta e di non disperdere il campione sulle pareti della provetta. Nel caso, procedere con una centrifugata di qualche secondo alla massima velocità per riportare il campione sul fondo.
- 15.** Caricamento dei campioni di DNA sul gel: nel primo pozzetto caricare il DNA marker, una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto, secondo le indicazioni della ditta fornitrice (generalmente si caricano 10 μ l di DNA marker). In questo protocollo, si è utilizzato il marcatore di peso molecolare PCR 100 bp Low Ladder della Sigma. Con un puntale pulito, prelevare il campione di DNA 1, trasferirlo nel pozzetto 2 ed eliminare il puntale. Procedere in questo modo fino al caricamento di tutti i campioni.
- 16.** Chiudere il coperchio della cella elettroforetica e collegare gli elettrodi al generatore di differenza di potenziale, prestando attenzione al codice colore degli elettrodi. L'elettrodo contrassegnato con il colore nero indica il polo negativo, mentre quello di colore rosso, il polo positivo. Prima di avviare la corsa, verificare che i pozzetti con i campioni di DNA siano vicini al polo negativo. Impostare il generatore di differenza di potenziale a 120V e avviare la corsa. Trascorsi i primi 15 minuti, abbassare il voltaggio a 80V e far correre i campioni per altri 10 minuti. La corsa dovrà durare un totale di 25 minuti.
- 17.** Al termine della corsa elettroforetica, spegnere il generatore di differenza di potenziale, aprire il coperchio della cella elettroforetica, prelevare la slitta con il gel e posizionare il gel su un apparecchio di rilevamento, come ad esempio un transilluminatore a luce UV o un apparecchio che emette luce blu

(es. Safe Imager). La luce emessa dall'agente intercalante ci darà indicazione della posizione dei frammenti di DNA all'interno del gel.

- 18.** Per stimare il peso molecolare di un frammento di DNA occorre confrontare il posizionamento della banda d'interesse rispetto a quelle del DNA marker di riferimento. Come indicato nella figura sottostante, l'amplificazione delle regioni ITS1 e ITS2 fungine, mediante primer ITS1 e ITS4, si considera avvenuta se la corsa elettroforetica evidenzia una banda compresa tra 600 e 700 pb per tutti i campioni, ad eccezione dell'acqua (controllo negativo).



Note

- Per preparare 1L di tampone di corsa elettroforetica TBE 10X pesare 121.1 g di Tris-base, 61.8 g di acido borico e 7.4 g di EDTA e scioglierli in circa 900 ml di acqua deionizzata. Mescolare e portare il volume a 1L. Il pH della soluzione dovrebbe essere circa 8.3. Conservare la soluzione a temperatura ambiente, indicando sulla bottiglia la data di preparazione. Si conserva per qualche mese.
- L'agarosio è uno zucchero, più precisamente un polimero lineare, estratto da un'alga marina. Forma una matrice semisolida paragonabile a una rete 3D, le cui maglie hanno una grandezza inversamente proporzionale alla concentrazione di agarosio utilizzata nella soluzione. Tanto maggiore è la concentrazione dell'agarosio, tanto più fitte saranno le maglie della rete tridimensionale e tanto più si riuscirà a separare frammenti lineari di DNA di piccole dimensioni. La scelta della percentuale del gel d'agarosio dipende, quindi, dalla grandezza dei frammenti che si vogliono separare durante la corsa elettroforetica. La tabella sottostante può essere un utile riferimento:

% AGAROSIO	RISOLUZIONE DI FRAMMENTI DI DNA
0.5	1000 - 30000 pb
0.7	800 - 12000 pb
1.0	500 - 10000 pb
1.2	400 - 7000 pb
1.5	200 - 3000 pb
2.0	50 - 2000 pb

- Durante la fase di scioglimento della polvere d'agarosio, non allontanarsi dal forno a microonde in modo tale da aprire lo sportello e mescolare manualmente la beuta quando la soluzione inizia a bollire.
- La funzione dell'agente intercalante è quella di posizionarsi tra i frammenti di DNA all'interno del gel. L'agente intercalante è una molecola che non solo ha altissima affinità per il DNA, ma è anche in grado di emettere luce a una precisa lunghezza d'onda quando viene colpito da una luce specifica (molecola fluorescente). Il SYBR™ Safe, ad esempio, emette luce arancione quando è colpito da raggi UV o da luce blu.
- Esistono diversi tipi di agenti intercalanti: si sconsiglia l'uso dell'etidio bromuro, vista la sua alta mutagenicità e tossicità. In commercio sono disponibili tante alternative valide e più sicure: dal SYBR™ Safe di Thermofisher, al Fluorescent Nucleic Acid Stain 20.000X di EuroSafe, al Midori Green Direct di Nippon Genetics (da aggiungere direttamente al campione di DNA e non nel gel).
- Il gel d'agarosio può essere conservato, avvolto da pellicola trasparente, a 4°C per un paio di giorni.
- Il tampone di caricamento contiene glicerolo e due coloranti (Blu di bromofenolo e Xylene cianolo). Può essere acquistato oppure preparato in laboratorio in questo modo: pesare 25 mg di Blu di bromofenolo, scioglierli in 6.7 ml di acqua deionizzata e mescolare; aggiungere 25 mg di Xylene cianolo e mescolare; aggiungere 3.3 ml di glicerolo e mescolare; creare aliquote da 0.5 ml e conservarle a -20°C.
- Il tampone di caricamento svolge molteplici funzioni:
 - aumenta la densità del campione che si sta caricando su gel, grazie alla presenza di glicerolo, consentendo al campione di depositarsi meglio sul fondo del pozzetto;
 - colora il campione, permettendo di vederlo meglio durante il processo di caricamento;
 - facilita il monitoraggio della corsa elettroforetica, dal momento che i due coloranti entrambi carichi negativamente corrono insieme al DNA durante la corsa (il Blu di bromofenolo corre come se fosse un frammento di circa 300 pb, mentre lo Xylene cianolo come un frammento di circa 4000-5000 pb).
- Il DNA marker è un campione che contiene una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Confrontando la distanza raggiunta dai frammenti di DNA cui siamo interessati con quella dei frammenti del marker è possibile stimare la lunghezza in basi e, quindi, il peso molecolare del DNA di interesse. In particolare esiste una relazione di proporzionalità inversa tra la velocità di migrazione e il logaritmo del peso molecolare dei frammenti di DNA.
- Nell'attività sperimentale proposta si utilizza il marker PCR 100 bp Low Ladder della Sigma (numero di catalogo: P1473) con frammenti che vanno da 1000 pb a 100 pb, ma in commercio esistono moltissimi tipi di marker utili allo scopo, come ad esempio 1 kb DNA Ladder della Promega (numero di catalogo: G5711) con frammenti che vanno da 10 kb a 250 pb, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder di Thermofisher (numero di catalogo: SM1331) con frammenti da 20 kb a 70 pb, oppure 1 kb DNA Ladder di NEB (numero di catalogo: N3232L) con frammenti da 10 kb a 500 pb. Scegliere il DNA marker più adatto al peso molecolare del DNA che si vuole identificare. La quantità di volume da caricare su gel è indicata dalla casa produttrice.