

Amplificazione **PCR** e **corsa elettroforetica** di campioni di **DNA** genomico di **lievito**

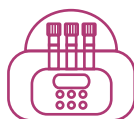
Obiettivo Utilizzare i primer universali ITS1 e ITS4 per amplificare tramite PCR le regioni conservate ITS1 e ITS2 dell'RNA ribosomiale dei lieviti e osservarne il risultato su gel d'agarosio al 2.5%.

Autore Istituto Nicola Pellati di Nizza Monferrato (AT)
Primo classificato Mad for Science 2017
Progetto "Biodiversità e Uva"



Materiali e reagenti

- Campioni di DNA genomico di lievito
- PCR Buffer 10X con $MgCl_2$
- Miscela di 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
- Provette sterili da 0.2 ml per PCR
- Tampone di corsa TBE 10X
- Agarosio in polvere per elettroforesi
- Agente intercalante del DNA
- Tampone di caricamento 6X
- Marcatore di peso molecolare
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Cilindro da 1L
- Cilindro da 100 ml
- Becher o beuta da 250 ml (resistenti al calore)
- Provette da 1.5 ml (sterili e non)
- Acqua deionizzata (sterile e non)
- Ancoretta magnetica (facoltativa)
- Scotch resistente al calore o supporto per la slitta elettroforetica
- Puntali (sterili e non)
- Parafilm®
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia
- Micropipette
- Microcentrifuga
- Termociclatore
- Microonde (o piastra magnetica riscaldante)
- Apparato di corsa elettroforetica (camera, slitta e pettine)
- Generatore di differenza di potenziale
- Generatore di luce UV o luce blu
- Congelatore $-20^{\circ}C$



Sicurezza

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



Tempo

Circa tre ore per la preparazione dei campioni e la reazione di PCR
Circa 1 ora e 30 minuti per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati
(le tempistiche variano a seconda del numero di campioni)



Procedimento

- 1.** Scongela, tenendo in ghiaccio, il DNA genomico di lievito, purificato secondo il protocollo “Estrazione di DNA genomico da lievito” (sezione: “Biologia molecolare”), e i reagenti necessari alla reazione di PCR (PCR Buffer con $MgCl_2$, dNTPs, Primer, Taq DNA Polymerase). Centrifugare le varie provette per far scendere le goccioline presenti sulle pareti.
- 2.** Diluire la miscela di 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 una provetta sterile da 1.5 ml e riportare la dicitura “dNTPs”, la concentrazione e la data di preparazione;
 - diluire la miscela di dNTPs dalla concentrazione iniziale di 100 mM alla concentrazione intermedia di 10 mM (diluizione 1:10). Per preparare, ad esempio, 100 μ l di soluzione di dNTPs concentrata 10 mM, bisognerà trasferire 90 μ l di acqua deionizzata sterile nella provetta, aggiungere 10 μ l di dNTPs concentrati 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). 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 e nella tabella sottostante.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE INTERMEDIA
dNTPs	100 mM	10 mM
ITS1	100 μ M	10 μ M
ITS4	100 μ M	10 μ M

- Preparare una provetta pulita da 1.5 ml e scrivere sul tappo "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.
- Considerando che una singola reazione di PCR richiede un volume finale di 20 μ l (conteggiando anche 2 μ l di campione di DNA), determinare i volumi di ogni singola componente di PCR da inserire nella Master Mix, come segue:

COMPONENTE	VOLUME IN 20 μ l DI MASTER MIX (1 REAZIONE)	CONCENTRAZIONE FINALE IN 20 μ l DI MASTER MIX
PCR Buffer 10X con MgCl ₂	2 μ l	1X
dNTPs 10 mM	0.5 μ l	250 μ M
ITS1 10 μ M	0.5 μ l	0.25 μ M
ITS4 10 μ M	0.5 μ l	0.25 μ M
Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l	0.2 μ l	0.05 U/ μ l
Campione di DNA	2 μ l	-
Acqua	14.3 μ l	-
TOTALE	20 μl	-

- 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 di lievito, 1 controllo positivo, 1 controllo negativo e 1 campione di eccesso) e preparare 180 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 180 µl DI MASTER MIX (10 REAZIONI)
PCR Buffer 10X con MgCl ₂	20 µl
dNTPs 10 mM	5 µl
ITS1 10 µM	5 µl
ITS4 10 µM	5 µl
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	2 µl
Acqua	143 µl
TOTALE	180 µl

8. Predispone 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 -. Tenere nota su un foglio a parte del nome del campione associato alla numerazione.
9. Allestire la reazione di PCR nelle provette da 0.2 ml secondo i volumi sotto riportati:

COMPONENTE	MASTER MIX	DNA	ACQUA
Campioni DNA da analizzare (1-7)	18 µl	2 µl	-
Controllo +	18 µl	2 µl	-
Controllo -	18 µl	-	2 µl

- 10.** Trasferire le provette da 0.2 ml nel termociclatore e impostare il seguente programma:

95°C	5 minuti	1 ciclo
95°C	60 secondi	
55°C	60 secondi	35 cicli
72°C	90 secondi	
72°C	7 minuti	1 ciclo
4°C		infinito

- 11.** Terminato il programma di amplificazione, analizzare il risultato della PCR tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 2.5%, avendo cura di caricare 10 µl di reazione di PCR e di conservare il volume restante. Seguire i protocolli della risorsa "Allestimento di elettroforesi di DNA su gel d'agarosio" (sezione: "Biologia molecolare") per preparare il gel d'agarosio al 2.5% (adattare la quantità di agarosio da pesare alla percentuale scelta) e per caricare i campioni di DNA da visualizzare.
- 12.** Impostare il generatore di differenza di potenziale a 100V e lasciare correre i campioni di DNA per circa 30 minuti.
- 13.** Al termine della corsa elettroforetica, analizzare 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.
- 14.** Come indicato nella figura sottostante, l'amplificazione delle regioni ITS1 e ITS2, 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).
- 15.** Conservare l'amplificato di PCR a -20°C.

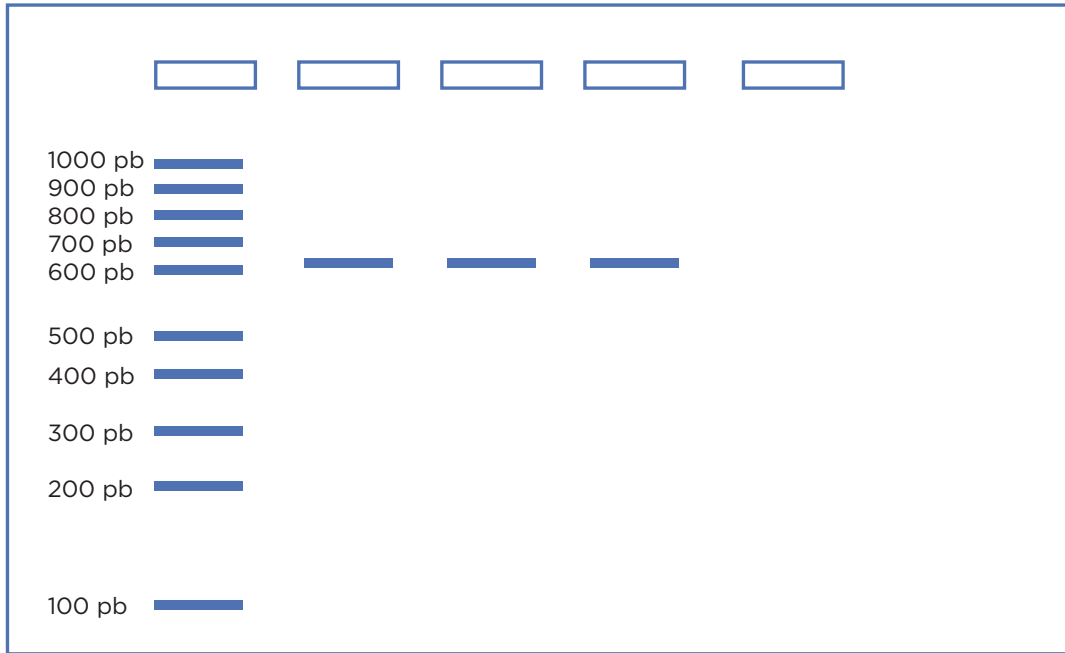
MARKER

1

2

3

ACQUA



Note

- 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, perché permettono di amplificare porzioni di DNA comuni a tutti i lieviti.
- 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 di accompagnamento al prodotto.
- 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 dalla 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 risospingere in acqua ($V_{acqua} = V_2 - V_1$) per arrivare al volume finale di 100 μ l.
- I primer e i dNTPs diluiti devono essere conservati a -20°C per essere utilizzati nella successiva reazione di amplificazione tramite PCR, senza la necessità di eseguire una nuova diluizione intermedia della soluzione madre.
- Il volume finale di una singola reazione di PCR può essere modificato, passando proporzionalmente dai 20 μ l finali fino ad un massimo di 50 μ l. Questo è consigliato per evitare di prelevare dei volumi troppo piccoli, soprattutto se non in possesso di micropipette idonee, e per avere un volume di PCR adeguato a compiere anche una analisi RFLP con tre enzimi di restrizione, ognuno dei quali richiede 5 μ l di DNA (per questo protocollo consultare la risorsa "Analisi RFLP per identificare le specie di lieviti isolati dagli acini d'uva").
- 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 e PCR Buffer 10X con magnesio cloruro (numero di catalogo: EP0705) e i nucleotidi (numero di catalogo: 10297018) sono stati acquistati da Thermofisher. È possibile realizzare il seguente protocollo anche con prodotti analoghi, acquistati da altre aziende.
- I campioni di DNA amplificati possono essere conservati a 4°C, per alcuni giorni, oppure a -20°C per tempi più lunghi. Non è, quindi, necessario procedere subito con la determinazione del peso molecolare degli amplificati mediante corsa elettroforetica.
- Per preparare il gel d'agarosio al 2.5%, bisogna pesare 2.5 g di agarosio in polvere da sciogliere in 100 ml di tampone TBE 1X.
- Per informazioni aggiuntive relative alla preparazione del gel d'agarosio e alla corsa elettroforetica di DNA, leggere le note dei protocolli della risorsa "Allestimento di elettroforesi di DNA su gel d'agarosio" (sezione: "Biologia molecolare").