

Materiali biologici

In questo file sono elencati, capitolo per capitolo, i materiali biologici da richiedere al CusMiBio (o centro simile) per realizzare gli esperimenti che abbiamo illustrato (www.cusmibio.unimi.it).

In **rosso** sono indicati i link a parti del libro.

1. Chi è il colpevole?

Sono necessari campioni di DNA prodotti con la PCR; ciascun campione è costituito da una miscela (mix) di frammenti di diverse lunghezze (bande), corrispondenti ai frammenti ottenibili per amplificazione dei microsatelliti TPOX, VWA, D5S818.

La figura riporta le lunghezze indicative, in paia di basi, dei singoli frammenti.

TPOX	Allele a : 482 pb
	Allele b : 466 pb
	Allele c : 430 pb
	Allele d : 414 pb
VWA	Allele e : 288 pb
	Allele f : 272 pb
	Allele g : 244 pb
	Allele h : 224 pb
D5S819	Allele i : 188 pb
	Allele l : 168 pb
	Allele m : 124 pb
	Allele n : 104 pb

Di seguito sono riportate le mix che rappresentano i campioni di DNA appartenenti a vittima (**V**), sospettati (**S**) e scena del crimine (**SC**) (tab. 1.1).

Per poter essere visualizzato con il SYBR Safe, in ciascun campione, in tutto 10 µl, la concentrazione del DNA deve essere di circa 10 ng/µl (100 ng totali, distribuiti nelle diverse bande presenti nel campione).

TABELLA 1.1

CAMPIONE	Mix
1 = V	b + d + e + h + l + n
2 = SC (scena del crimine) = S3 (sospettato 3)	a + d + e + h + l
S1 (sospettato 1)	a + c + e + i + n
S2 (sospettato 2)	b + d + f + g + i + m
C (bianco di PCR)	Soluzioni e tamponi utilizzati per la PCR, senza DNA

2. Identificazione degli OGM

Sono necessari campioni di DNA prodotti con la PCR e contenenti frammenti con le lunghezze indicate nella tabella seguente.

Ciascun campione contiene 10 μ l di DNA alla concentrazione di 10 ng/ μ l.

TABELLA 2.1

CAMPIONE	BANDA (lunghezza in paia di basi, pb)
1 = gene per una proteina del cloroplasto	484 pb
2 = gene per la zeina	220 pb
3 = campione	189 pb (se il transgene BT è presente)
4 = controllo positivo (presenza transgene BT)	189 pb
5 = controllo negativo (assenza transgene BT)	Nessuna banda
6 = bianco di PCR	Soluzioni e tamponi utilizzati per la PCR, senza DNA

3. Sano o malato?

Per eseguire l'intero esperimento sono necessari campioni di DNA prodotti con la PCR, della lunghezza di 376 paia di basi (pb), al cui interno è presente o non è presente un sito di restrizione per *MstII*:

allele β^A : frammento di 376 pb con presenza del sito di restrizione; i frammenti risultanti dalla digestione devono avere dimensioni di 175 pb e 201 pb;

allele β^S : frammento di 376 pb con assenza del sito di restrizione.

Ciascun campione contiene 8 μ l di DNA (10 ng/ μ l).

TABELLA 3.1

CAMPIONE	ALLELI
1 = padre (III 1)	β^A / β^S
2 = madre (III 2)	β^A / β^S
3 = primo figlio (IV 1)	β^A / β^A
4 = figlia (IV 2)	β^A / β^A
5 = bambino nato malato (IV 3)	β^S / β^S
6 = probando, in questo caso il feto (IV 4)	β^A / β^S
7 = bianco di PCR	Soluzioni e tamponi utilizzati per la PCR, senza DNA

Per risparmiare sui tempi di esecuzione dell'esperimento è possibile partire da campioni già digeriti.

In questo caso i campioni contengono 10 μ l di DNA con una miscela di frammenti di 376 pb, 201 pb e 175 pb a seconda del genotipo, come indicato nella tabella 3.2.

Le singole bande devono avere una concentrazione di 10 ng/ μ l per poter essere visualizzate con il SYBR Safe.

TABELLA 3.2

CAMPIONE	BANDE
1 = padre (III 1)	376 pb + 201 pb + 175 pb
2 = madre (III 2)	376 pb + 201 pb + 175 pb
3 = primo figlio (IV 1)	201 pb + 175 pb
4 = figlia (IV 2)	201 pb + 175 pb
5 = bambino nato malato (IV 3)	376 pb
6 = probando, in questo caso il feto (IV 4)	376 pb + 201 pb + 175 pb
7 = bianco di PCR	Soluzioni e tamponi utilizzati per la PCR, senza DNA

4. Clonaggio del DNA: bianco o blu?

Per eseguire l'intero esperimento sono necessari:

- cellule di *Escherichia coli* XL1 Blue cresciute in LB + ampicillina fino a ottenere un'OD (densità ottica) a 600 nm di 0,3, corrispondente a circa 5×10^7 cellule/ml che vengono rese competenti con un trattamento con CaCl_2 ; le cellule così ottenute vanno diluite 1/100 e suddivise in falcon contenenti 5 ml di cellule, 3,5 ml di glicerolo 88% e 2 ml di H_2O e congelate a -80°C ; per ogni studente vanno preparate aliquote da 200 μl in provette eppendorf, diluendo 1:5 con LB la preparazione conservata a -80°C ;
- plasmide pUC19 tagliato con *EcoRI* + frammenti di DNA esogeno tagliati con *EcoRI*, della lunghezza di 1300 pb; plasmide e frammenti servono per preparare la miscela di ligazione (*vedi Appendice a pag. 149*);
- campioni già pronti di plasmidi ricombinanti e non ricombinanti, digeriti e non digeriti con *EcoRI*, secondo la tabella 4.1; ciascun campione contiene 10 μl di plasmide con una concentrazione di 10 ng/ μl .

TABELLA 4.1

CAMPIONE	CARATTERISTICHE
1	plasmide pUC19 (2686 pb)
2	plasmide non digerito estratto da colonie blu (2686 pb)
3	plasmide ricombinante non digerito estratto da colonie bianche (3900 pb)
8	plasmide non ricombinante estratto da colonie blu digerito con <i>EcoRI</i> (2686 pb, linearizzato)
9	plasmide ricombinante estratto da colonie bianche digerito con <i>EcoRI</i> (2686 pb + 1300 pb)

Per eseguire solo l'attività 2 sono necessari due tipi di minicolture batteriche in LB + ampicillina:

- minicolture di *Escherichia coli* XL1 Blue trasformate con plasmide pUC19;
- minicolture di *Escherichia coli* XL1 Blue trasformate con plasmide ricombinante;
- campioni già pronti di plasmidi ricombinanti e non ricombinanti, digeriti e non digeriti con *EcoRI*, secondo la tabella 4.1.

Le minicolture si possono ottenere prelevando colonie batteriche blu o bianche da piastre già pronte, stemperandole in 500 μl di LB + ampicillina e incubandole a 37°C overnight.

A fini didattici, sarebbe opportuno poter mostrare agli studenti piastre con colonie già cresciute, in particolare:

- piastre con colonie bianche e blu: si ottengono a partire da cellule di *Escherichia coli* XL1 Blue trasformate con la miscela di ligazione e seminate su piastre di LB agar + ampicillina già trattate con IPTG e X-gal (*secondo il protocollo dell'attività 1: Bianco o blu?*);
- piastre di controllo positivo con solo colonie blu: si ottengono a partire da cellule di *Escherichia coli* XL1 Blue trasformate con il plasmide pUC19 e seminate su piastre di LB agar + ampicillina già trattate con IPTG e X-gal (*secondo il protocollo dell'attività 1: Bianco o blu?*).

Per eseguire solo la corsa elettroforetica sono necessari i campioni di DNA plasmidico indicati nella tabella 4.1, a cui si devono aggiungere i campioni 4, 5, 6, e 7, contenenti DNA plasmidico ricombinante o non ricombinante estratto rispettivamente da colonie bianche e blu, digerito con *EcoRI* (come i campioni 8 e 9).

Ciascun campione contiene 10 μl di plasmide con una concentrazione di circa 10 ng/ μl .

5. Mais blu: dal fenotipo al genotipo

Per eseguire l'intero esperimento sono necessari almeno 50 cariossidi di mais da piante di una F2, ottenute autofecondando piante eterozigoti per il gene R1 (*colored 1*): R/r.

L'allele R determina l'accumulo di antociani nell'aleurone, l'allele r determina l'accumulo di antociani nelle radici.

Per amplificare il marcatore molecolare *bnlg1028* sono necessari i primer indicati in tabella.

TABELLA 5.1

Primer forward	AGGAAACGAACACAGCAGCT
Primer reverse	TGCATAGACAAAACCGACGT

Nel caso non si possa eseguire la PCR si può fare un'elettroforesi caricando campioni di DNA già amplificati estratti da piantine di diverso genotipo. La tabella 5.2 riporta la grandezza dei frammenti di DNA in paia di basi (pb). Ciascun campione contiene 10 µl di DNA, circa 100 ng.

TABELLA 5.2

CAMPIONE	BANDA
1 = R/R	150 pb
2 = r/r	170 pb
3 = R/r	150 pb + 170 pb
4 = bianco di PCR	Soluzioni e tamponi utilizzati per la PCR, senza DNA

6. Analisi cromosomiche

Sono necessarie sospensioni di linfociti B messi in coltura con PHA (*phytohaemoagglutinin*) e in seguito con colchicina, quindi trattati con soluzione ipotonica e mantenuti in soluzione di fissaggio (metanolo + acido acetico in rapporto 3:1). Si veda alle pagine 53 e 54: **Coltura di linfociti per ottenere cromosomi metafasici**.

Per ogni studente servono circa 200-300 µl di sospensione cellulare

7. Anche i geni possono diventare reporter

Per eseguire l'esperimento sono necessarie piantine di *Arabidopsis thaliana* selvatiche e geneticamente modificate per esprimere il gene GUS sotto il controllo di un promotore sensibile al cadmio.

Le piantine sono seminate e fatte crescere in condizioni sterili su piastre contenenti terreno di coltura con o senza cadmio, secondo la composizione e le modalità indicate nel protocollo a pag. 134 ([Crescita delle piantine di *Arabidopsis thaliana*](#)).

I quattro tipi di piastre occorrenti sono riassunti nella tabella 7.1.

TABELLA 7.1

TERRENO	PIANTINE DI <i>ARABIDOPSIS</i>
senza Cadmio (C)	selvatiche (wt)
con cadmio (+Cd)	selvatiche (wt)
senza cadmio (C)	transgeniche (GUS)
con cadmio (+Cd)	transgeniche (GUS)

Per amplificare parte del cDNA del gene GUS e del gene di controllo S16 sono necessari i primer indicati in tabella.

TABELLA 7.2

PRIMER	SEQUENZA
GUS forward	ATTACGGCAAAGTGTGGGTC
GUS reverse	CAGAAAAGCCGCCGACTTCG
S16 forward	GGCGACTCAACCAGCTACTGA
S16 reverse	CGGTA ACTCTTCTGGTAACGA

Nel caso non si possano eseguire retrotrascrizione e PCR si può fare un'elettroforesi caricando campioni di DNA già pronti. La tabella 7.3 riporta la lunghezza dei frammenti di DNA amplificati a partire dal cDNA ottenuto da piantine selvatiche o transgeniche cresciute in presenza o assenza di cadmio. Le lunghezze sono indicative ed espresse in paia di basi (pb). Ciascun campione contiene 16 µl di DNA, circa 160 ng.

TABELLA 7.3

CAMPIONE	BANDE
wt C	450 pb (S16)
wt + Cd	450 pb (S16)
GUS C	450 pb (S16)
GUS + Cd	1200 pb (GUS) + 450 pb (S16)

8. Separazione e colorazione di proteine

Per eseguire l'esperimento sono necessari due tipi di estratti proteici da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (tab. 8.1) trattate con TCA (acido tricloro-acetico) in colorante di caricamento per proteine Laemlii buffer, preparati secondo il seguente protocollo.

Estrazione di proteine in TCA (per ogni campione)

- Partire da (almeno) 10 ml di cellule in fase log ($6-7 \times 10^6$ cellule/ml)
- Centrifugare 5' a 4000 rpm in falcon da 50 ml
- Scartare il supernatante, risospesndere il pellet in 1 ml di TCA 20%, trasferire la soluzione in eppendorf da 2 ml
- Centrifugare a 13 200 rpm per 1'
- Scartare il supernatante, risospesndere il pellet in 1 ml di TCA 20%
- Centrifugare a 13 200 rpm per 1'
- Scartare il supernatante, risospesndere il pellet in 50 μ l di TCA 20%
- Aggiungere palline di vetro sterili fino al menisco
- Vortexare l'eppendorf per 3'
- Aggiungere 100 μ l di TCA 5%
- Recuperare la soluzione con una micropipetta e trasferirla in eppendorf da 1,5 ml
- Centrifugare a 3000 rpm per 10'
- Scartare il supernatante, aggiungere 100 μ l di Laemlii buffer 2 \times
- Aggiungere 60 μ l di Tris Base 2M per neutralizzare il pH
- Bollire i campioni per 5' a 95 °C
- Centrifugare a 13 200 rpm per 5'
- Trasferire il supernatante in eppendorf da 1,5 ml
- Caricare il campione su gel e/o conservarlo a -20 °C

LAEMLI buffer 6 \times per proteine (NB: si deve usare 2 \times)

Per 10 ml:

- Stacking buffer 4 \times (0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,4% SDS) 7 ml
- Glicerolo 90% 3 ml
- SDS 1 g
- Ditiotreitolo 0,93 g
- Blu di Bromofenolo 1,2 mg

TABELLA 8.1

CAMPIONE	CONTENUTO
1	estratto proteico da cellule di <i>S. cerevisiae</i> non irraggiate con raggi UV
2	estratto proteico da cellule di <i>S. cerevisiae</i> irraggiate con raggi UV

Per ogni campione da caricare nel gel sono necessari 10 μ l di estratto proteico.