

MARCATORI MOLECOLARI IN MAIS

Protocollo per l'estrazione del DNA genomico da foglia

- Porre un pezzo di foglia o di radice, tagliato con le forbici (da 2 a 3 cm), in una *ependorf* da 1.5ml sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione (e del ragazzo/a)
- Aggiungere 200µl di Tampone di Estrazione (NaCl 2M; Tris-HCl 200mM, pH 8.0; EDTA 70mM, pH 8.0; Sodium meta-bisulfite 20mM) e 100µl di SDS 5% (Sodio Dodecil Solfato)
- Macinare il tessuto con un pestello
- Incubare in stufa alla temperatura di 60°C per circa 15 minuti
- Preparare dei nuovi tubi *ependorf* per il passaggio successivo riportando i codici identificativi precedentemente assegnati ai propri campioni
- Centrifugare per 7 minuti a 13000 giri (*rpm, round per minute*)
- Trasferire 100µl di surnatante nella nuova *ependorf* preparata precedentemente
- Aggiungere 100µl di ammonio acetato 5M e 300µl di isopropanolo
- Miscelare invertendo le *ependorf* (5X)
- Centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm
- Buttare il surnatante stando attenti che il *pellet* rimanga attaccato all'*ependorf*
- Lavare il *pellet* aggiungendo 400µl di etanolo 70% e centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm
- Buttare il surnatante e lasciare asciugare il *pellet* (attaccato all'*ependorf*) in stufa a 60°C per 5-10 minuti
- Quando il *pellet* è completamente secco, risospenderlo in 20µl di TE (Tris HCl 10.0 mM-EDTA 1.0 mM pH 8.0) con RNasi (50 µg/ml)
- Incubare per 10 minuti a 37°C
- Per la PCR usare 2 µl di DNA genomico, il resto può essere conservato a -20°C.

Preparazione del gel di agarosio

- preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di "nastro adesivo di carta"
- verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia "a bolla"
- pesare 0,60 gr di agarosio e trasferirli in una beuta di vetro
- prelevare 30 ml di tampone TBE 1x in un cilindro e versarli nella beuta di vetro contenente l'agarosio
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde (circa 500V) per 1 minuto, agitando di tanto in tanto delicatamente la soluzione con una presina
- pesare la soluzione di agarosio (l'acqua del tampone, bollendo, è evaporata!) e riportare la soluzione di agarosio al peso originale, utilizzando una spruzzetta con H₂O distillata. Attenzione: far cadere l'acqua delicatamente, facendola scivolare lungo i bordi della beuta, altrimenti si formano delle bolle
- aggiungere alla soluzione di agarosio 1µl di Eurosafe quando questa raggiunge i 50°C
- versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine.
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella
- togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolari rispetto al gel

Schema della PCR

La reazione di amplificazione viene effettuata in un volume finale di 12µl così suddiviso (i volumi riportati si riferiscono ad un singolo campione):

| Quantità | Reagenti |
|----------------|--|
| 2 µl | DNA genomico (circa 10-50 ng) |
| 0,5µl + 0,5 µl | mix <i>primer bnlg1028 (forward e reverse)</i> , concentrazione di 15 pmoli/µl (15 mM) |
| 0,5 µl | dNTP (10 mM) |
| 1,2 µl | 10X Taq Buffer con MgCl ₂ |
| 0,2 µl | Taq DNA Polymerase (5 U/ µl) |
| 7,1 µl | Acqua sterile |
| Tot 12 µl | |

NOTA: microprovette BLU – R/R
ROSA – r/r
BIANCHE – R/r

Per ultimo mettere una microprovetta (C) 10 µl di mix come controllo negativo.

IMPORTANTE: ricordarsi di sostituire i puntali ogni volta che si prelevano i diversi reagenti e ogni volta che si aliquota la mix nelle singole *ependorf* !

Lo schema generale del programma di PCR utilizzato è stato il seguente :

| | | |
|-------|-------|---|
| 94°C | 2'30" | } 30 cicli temperatura di appaiamento specifica per <i>bnlg1028</i> |
| 94°C | 45" | |
| 57°C | 1' | |
| 72°C | 1'30" | |
| 72 °C | 5' | 1 unico ciclo finale di sintesi |
| 4°C | ∞ | (conservazione dei campioni) |

Una volta finita l'amplificazione, dopo circa 1,5 ore, i campioni verranno caricati nel gel per la corsa elettroforetica.

Corsa elettroforetica

- a ciascuna provetta, già contenente loading dye, aggiungere 2 µl del rispettivo campione di DNA
- centrifugare brevemente (6 sec) in una microcentrifuga eppendorf (in gergo di laboratorio, si dice "spinnare" da *spin*, centrifugare)
- nel primo pozzetto caricare 10 µl di marcatore di peso molecolare
- di seguito caricare ciascun campione (10 µl) nei singoli pozzetti, ponendosi con la punta della micropipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolare rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
- chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del *power supply*; il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo
- fissare il voltaggio al valore di 80 V: dopo che il DNA è uscito dai pozzetti, il voltaggio va alzato a 100 V; lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 40 min; osservare la migrazione del *loading dye* per valutare la migrazione del DNA, che, essendo incolore, non si può vedere. Il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 100 bp, mentre lo xilene cianolo migra alla stessa velocità di un frammento di circa 800-900 bp
- al termine della corsa elettroforetica, osservare il gel al transilluminatore

Interpretazione dei risultati della corsa elettroforetica

L'ordine di caricamento dei campioni è indicativo dato che è possibile "caricare" il gel con un ordine diverso da quello indicato nell'esempio.

M: marcatore di peso molecolare: questo marcatore si separa in bande di peso molecolare noto.

corsia 1: banda bassa associata all'allele R: campione di DNA genomico estratto da plantula omozigote R/R

corsia 2: banda alta associata all'allele r: campione di DNA genomico estratto da plantula omozigote r/r

corsia 3: presenza di entrambe le bande: campione di DNA genomico estratto da plantula eterozigote R/r.

corsia 4: bianco di PCR (campione contenente le stesse soluzioni e gli stessi tamponi utilizzati, ma che non contiene DNA). Serve per dimostrare l'assenza di DNA contaminante durante tutte le fasi di lavoro.

