

SOS AMBIENTE

1) Contrassegnare 2 tubi eppendorf da 1,5 ml (2 per ogni studente: una per il saggio istochimico, uno per l'estrazione dell'RNA)

2) Trasferire un paio di piantine dalla piastra petri o dal vasetto, in ogni eppendorf

A) Saggio istochimico

Aggiungere alle piantine 600 µl di soluzione di colorazione così composta: 50 mM NaPi (pH = 7,0) [tampone sodio fosfato, mantiene il pH desiderato nel mezzo di reazione], 0,5 mM ferricianide [accelera la formazione del prodotto finale di reazione e ne previene l'ossidazione, 0,1 % (v/v) di TritonX-100 [un tensioattivo usato per permeabilizzare le membrane], X-gluc (0,5 mg ml⁻¹) [derivato dell'acido glucuronico, la sua idrolisi provoca la comparsa della colorazione blu nei tessuti] veicolato in DMSO (dimetilsolfossido, rende solubile X-gluc).

Incubare a 37 °C (5-36 ore).

B) Estrazione dell'RNA

- Aggiungere 300 µl di tampone di estrazione [EB (pH = 8,0); 2M NaCl, 200mM Tris-HCl, 70mM EDTA, 20mM sodio meta-bisulfito] e 100 µl di SDS 5% [sodio dodecil solfato, tensioattivo]
- macinare il tessuto con il pestello
- incubare in termostato a 60 °C per circa 15 min
- preparare delle eppendorf per il passaggio successivo riportando i codici identificativi
- centrifugare per 7 min a 13000 rpm (round per min)
- trasferire 150 µl di surnatante nella nuova eppendorf (preparata precedentemente)
- aggiungere 150 µl di ammonio acetato 5M e 300 µl di isopropanolo (precipitazione acidi nucleici, DNA + RNA)
- miscelare invertendo le eppendorf
- centrifugare per 5 min a 13000 rpm
- eliminare il surnatante, verificando che il pellet rimanga attaccato alla eppendorf (per svuotare il microtubo si può capovolgerlo o utilizzare una micropipetta per prelevare il surnatante)
- lavare il pellet aggiungendo 500 µl di etanolo 70% e centrifugare per 2 min a 13000 rpm
- eliminare il surnatante e lasciare asciugare il pellet (attaccato alla eppendorf) in termostato a 60 °C per 5-10 min, lasciando il tappo della eppendorf aperto
- quando il pellet è completamente secco, risospenderlo in 50 µl di acqua DEPC (diethyl pyrocarbonate, un inibitore delle RNAsi) contenente DNAsi.

C) Sintesi del filamento di cDNA e amplificazione dei geni target (RT-PCR)

- siglare 2 tubini da PCR (uno per S16, l'altro per GUS)

- preparare 2 miscele, REACTION MIX 2X, una per GUS e una per S16 contenenti i seguenti reagenti: trascrittasi inversa, polimerasi, dNTPs, MgCl₂, buffer ottimale per far lavorare i due enzimi: 10 µl
- aggiungere nella REACTION MIX il primer forward (senso - S16dir o GUSdir): 1 µl
- aggiungere nella REACTION MIX il primer reverse (antisenso - S16rev o GUSrev): 1 µl
- si ottengono 12 µl di miscela in tubini da PCR
- aggiungere in ogni tubino 2 µl di RNA (ogni studente avrà un tubino per S16 e uno per GUS);
- incubare in termoblocco da PCR secondo il seguente protocollo:
 - 50 °C per 20 min (sintesi del cDNA)
 - 94 °C per 2 min (denaturazione iniziale)

 - 25 cicli:
 - 94 °C per 15 sec (denaturazione)
 - 54 °C per 30 sec (annealing)
 - 72 °C per 45 sec (estensione)

 - 72 °C per 10 min (estensione finale)

D) Visualizzazione degli amplificati mediante corsa elettroforetica

- preparare 30 ml di gel di agarosio all'1% con 30 ml di TBE e 0,3 g di agarosio
- aggiungere nella beuta 1 µl di colorante per acidi nucleici "EuroSafe" e miscelare
- versare la soluzione così ottenuta, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi in cui è stato precedentemente inserito il pettine (utilizzare un pettine a denti piccoli o due pettini a denti larghi in ogni gel)
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min.
- togliere il nastro adesivo e il pettine
- a PCR terminata, miscelare un'aliquota (2µl) di prodotto di PCR al colorante fornito in concentrazione 2X (8 µl)
- caricare su gel di agarosio 10 µl della miscela così ottenuta. In una corsia caricare il marcatore di peso molecolare.
- far correre per circa mezz'ora e procedere con la visualizzazione su transilluminatore

E) Analisi del saggio istochimico

- osservare le piantine; se necessario, procedere ai lavaggi con etanolo
- sostituire la soluzione di colorazione con 1 ml di etanolo
- incubare per qualche minuto
- sostituire con nuovo etanolo (procedere a diversi lavaggi per permettere all'eventuale colorazione blu di emergere; le foglie devono diventare quasi bianche).