



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**PIANO NAZIONALE
LAUREE SCIENTIFICHE**



Cosa c'è per cena? identificazione analitico-molecolare di un ipotetico polpettone

Docenti:

Prof. Marilena Formato, formato@uniss.it Dr. Gabriele Nieddu, ganiemdu@uniss.it Dr.ssa Manuela Galioto, galioto@uniss.it	Prof. Claudia Crosio, ccrosio@uniss.it ; Dr. Ciro Iaccarino, ciaccarino@uniss.it Dr. Mauro Rassu, maurassu@uniss.it Dr.ssa Simona Sanna, simosanna@uniss.it
---	--

Dipartimento di Scienze Biomediche

Referente Progetto PLS-Sassari: Prof. Marilena Formato

Dipartimento di Scienze Biomediche

E-mail: formato@uniss.it

1. Conoscenze propedeutiche

1.1 Le molecole biologiche: gli acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono molecole biologiche complesse presenti in diverse zone della cellula. Il termine «acido nucleico» deriva dal fatto che queste molecole sono state trovate per la prima volta all'interno del nucleo. I principali acidi nucleici sono il DNA e l'RNA.

La funzione del DNA (acido desossiribonucleico) è quella di contenere le informazioni necessarie alla produzione delle proteine e di trasmettere le informazioni ereditarie. DNA sta per *Deoxyribo Nucleic Acid*; è una complessa sostanza chimica che si trova nel nucleo di tutte le cellule e porta l'informazione per lo sviluppo degli organismi.

- Il DNA è il **materiale ereditario** responsabile delle caratteristiche degli individui e quindi delle somiglianze e differenze tra gli stessi.
- Il DNA è unico, diverso da individuo a individuo, eccetto che per i **gemelli monozigotici**, il cui DNA è identico.
- Il DNA è visualizzato sotto forma di **cromosomi** durante la divisione cellulare.

1.2 La struttura del DNA

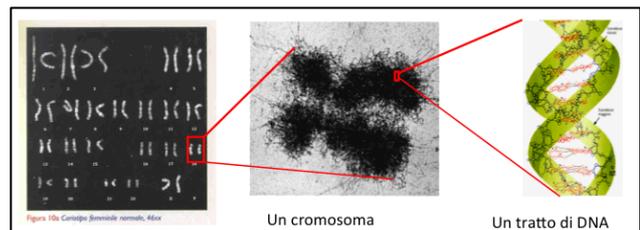
La molecola del DNA è un polimero, ossia è un insieme di tanti monomeri: i nucleotidi. Ogni nucleotide è costituito da tre componenti: un gruppo fosfato, uno zucchero (desossiribosio) e una base azotata. La molecola di DNA è formata da due catene **polinucleotidiche** avvolte l'una intorno all'altra con andamento destrorso. Le due catene sono **antiparallele**, cioè i due singoli filamenti sono orientati uno in direzione 5' → 3' e l'altro 3' → 5'. Gli scheletri zucchero fosfato si trovano all'esterno, le basi azotate all'interno. Le basi delle due catene sono unite tra loro mediante legami a idrogeno. Le **basi sono complementari** e il loro appaiamento è:

A=T Adenina - Timina

G≡C Guanina - Citosina

L'informazione genetica risiede nella sequenza di basi

Il nostro genoma è costituito da circa 30.000 geni ossia tratti di DNA, che codificano per proteine



1.3 La sequenza genica per l'individuazione di una specie

Il codice a barre del DNA (DNA Barcoding) è una sequenza di DNA che identifica in modo univoco ogni specie vivente, proprio come il codice a barre di un prodotto identifica ogni oggetto in vendita in un negozio.

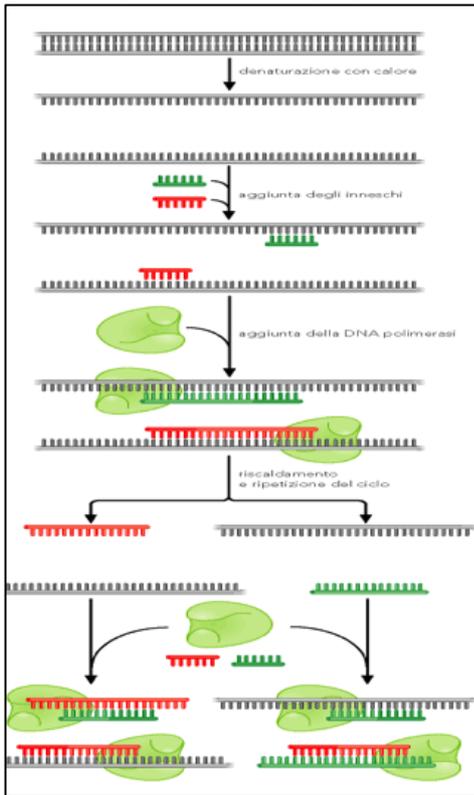
I geni "barcode" sono stati individuati e scelti in quanto la loro sequenza è molto conservata, ma significativamente diversa tra le varie specie; tali geni sono dei marcatori affidabili per identificare rapidamente le diverse specie, a partire da un campione di DNA.

Requisiti di un gene barcode La sequenza di un gene barcode deve essere sufficientemente diversa tra specie e specie in modo che ogni sequenza identificata possa essere univocamente attribuita ad una unica specie di origine. Dal momento che, in molti geni, si osservano variazioni di sequenza anche all'interno di una specie, la variazione tra specie diverse (inter---specie) deve essere maggiore della variazione all'interno della stessa specie (intra---specie). Il gene codificante per citocromo b mitocondriale è stato identificato come marcatore per materiale animale, già nel 1989.

1.4 La reazione a catena della polimerasi (PCR)

Oggi la tecnica più utilizzata per isolare specifiche sequenze di DNA è quella della **reazione a catena della polimerasi (PCR)**. Si tratta di una tecnica innovativa che consiste nell'amplificazione specifica di tratti di DNA mediante reazioni a catena della DNA polimerasi. Il principio è molto semplice. Data una sequenza di DNA a doppio filamento e due corte sequenze oligonucleotidiche (primer), di cui una complementare ad un tratto di filamento ad una estremità del DNA da amplificare (forward primer) e l'altra complementare ad un altro tratto posto all'altra estremità (reverse primer), in presenza di una DNA polimerasi termostabile e di una miscela di desossinucleotidi trifosfati in appropriate condizioni di reazione, è possibile far copiare numerosissime volte il tratto compreso tra i due primer, semplicemente facendo variare ciclicamente la temperatura di reazione.

Infatti, raggiunta la temperatura di denaturazione (circa 95°C), la doppia elica si apre (fase di denaturazione), rendendo disponibile lo stampo per una eventuale sintesi delle catene complementari.



Quando la temperatura si abbassa, in virtù delle loro minori dimensioni e della loro concentrazione, i primer si legheranno (fase di appaiamento o annealing) al DNA stampo prima che si rinaturino e, in presenza di una DNA polimerasi con un optimum di temperatura elevato (circa 72°C), inizierà la sintesi di DNA a partire dai primer (fase di sintesi del DNA o extension), procedendo lungo i filamenti singoli. Al termine del primo ciclo di PCR da una doppia elica di DNA se ne ottengono due. Ripetendo il ciclo "denaturazione – annealing – extension" numerose volte (in genere da 20 a 30), si ottiene una massiccia amplificazione specifica di un dato tratto di DNA che può quindi essere analizzato e studiato in dettaglio.

Il metodo di analisi del DNA mediante PCR presenta vantaggi molto evidenti:

- ◆ è molto rapido (da 60 a 90 minuti),
- ◆ la manualità è semplicissima,
- ◆ è automatizzato,
- ◆ i risultati sono visualizzabili con facilità mediante elettroforesi del DNA

Importanti ambiti di utilizzo della PCR sono la diagnosi prenatale di malattie genetiche e le indagini di medicina legale (sia civile che penale).

I termociclatori

Il successo della PCR è dovuto in gran parte alla possibilità di far avvenire l'intero processo in modo automatico all'interno di strumenti detti termociclatori (thermal cycler), in grado di variare ciclicamente la temperatura tra le varie fasi di ogni ciclo di PCR. Il costo di un thermal cycler si aggira sui 5.000 euro.

Un esempio di profilo di amplificazione standard impostato mediante un termociclatore è il seguente:

denaturazione del DNA: 30 sec a 94°C	30-35 cicli
appaiamento (annealing) dei primers: 30 sec a 50°-60°C	
sintesi (extension) di DNA: 30 sec- 5 minuti a 72°C	

La Taq polimerasi

Il successo della PCR è stato possibile grazie anche all'uso di una DNA polimerasi termostabile estratta da batteri termofili (che vivono ad elevate temperature). Una DNA polimerasi utilizzata nelle reazioni della PCR è la **Taq polimerasi**, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*. L'isolamento di DNA polimerasi termostabili ha sollevato gli operatori dall'ingrato compito di aggiungere enzima fresco ad ogni ciclo di reazione!

scelta dei primer

Per ogni PCR, è necessario usare due primer (forward e reverse). La scelta della coppia di primer è critica per una buona riuscita della PCR, ovvero per ottenere amplificazione specifica di un tratto di DNA. I primer devono essere "disegnati" a livello di sequenze uniche nel genoma (presenti una sola volta), in modo che possano appaiarsi al DNA solo nella zona di interesse e non in altre zone.

1.5. Il DNA mitocondriale ed il gene citocromo b

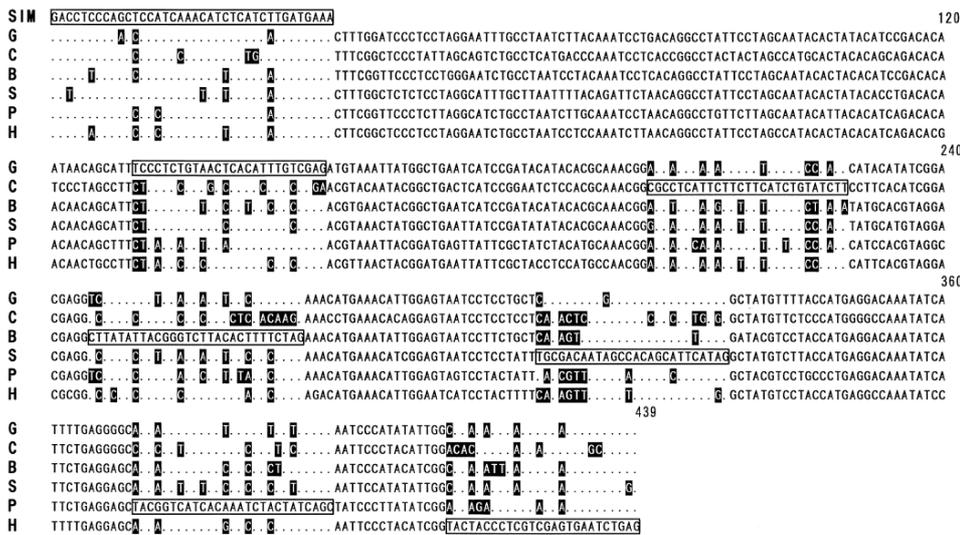
I mitocondri sono organuli fondamentali per la sopravvivenza: senza di essi le cellule eucariotiche non potrebbero produrre l'energia necessaria allo svolgimento delle funzioni vitali. I mitocondri delle cellule eucariotiche derivano dalla simbiosi tra due organismi unicellulari: per sopperire alle proprie esigenze metaboliche, l'antenato della cellula eucariotica sarebbe "entrata in società" con un batterio particolarmente efficiente nel convertire nutrienti e ossigeno in energia. Nell'uomo, il DNA mitocondriale è lungo circa 17 kb e contiene al suo interno 37 geni, la cui sequenza, a differenza dei geni cellulari, non è interrotta da alcun introne. 13 dei geni mitocondriali codificano per proteine necessarie al corretto svolgimento della fosforilazione ossidativa. Il DNA mitocondriale presenta le seguenti peculiarità:

Lo studio del DNA mitocondriale è più facile per i seguenti motivi:

- Ha minori dimensioni rispetto al DNA nucleare;
- Vi è la presenza di più copie di mt-DNA nella cellula (da 100 a 1000);
- è anche molto più resistente del DNA nucleare alla degradazione;
- I geni mitocondriali non possiedono introni.

Risulta quindi idoneo all'identificazione di specie di differenti organismi mediante lo studio delle sue sequenze nucleotidiche.

Tra i geni più studiati del DNA mitocondriale (mt-DNA) c'è quello codificante per il **citocromo b (cyt b)**. Come mostrato nella figura l'allineamento delle sequenze codificanti per tale gene in specie differenti (G= goat-capra; C= chichen-pollo; B=cattle-bovino; S=sheep-pecora; P=pig-maiale; H=horse-cavallo) mostra delle regioni ad alta omologia e delle regioni identificative di ciascuna specie. L'acronimo SIM indica la regione su cui è stato disegnato il primer *forward* che nonostante le differenze riesce ad apparirsi alle sequenze di tutte le specie elencate (vedi dopo, paragrafo PCR).

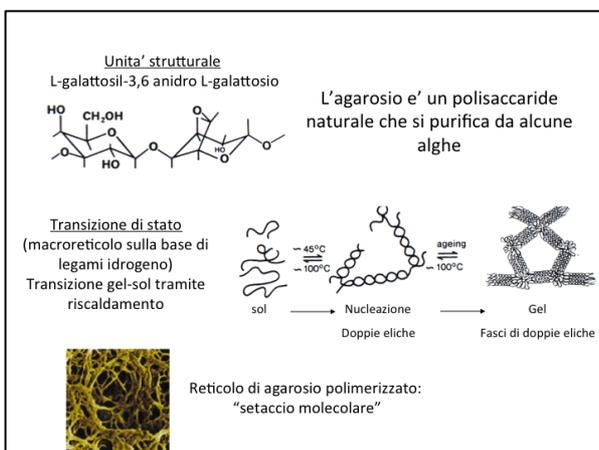


T. Matsumoto et al./Meat Science 51 (1999) 143-148

Fig. 1. Nucleotide sequences of the primers and target region on cytochrome b gene. Open boxes indicate the common forward primer SIM and complementary sequences of species-specific reverse primer. Dots and closed boxes indicate identical and different nucleotides to the primer sequences, respectively.

1.6 Elettroforesi di acidi nucleici in gel d'agarosio

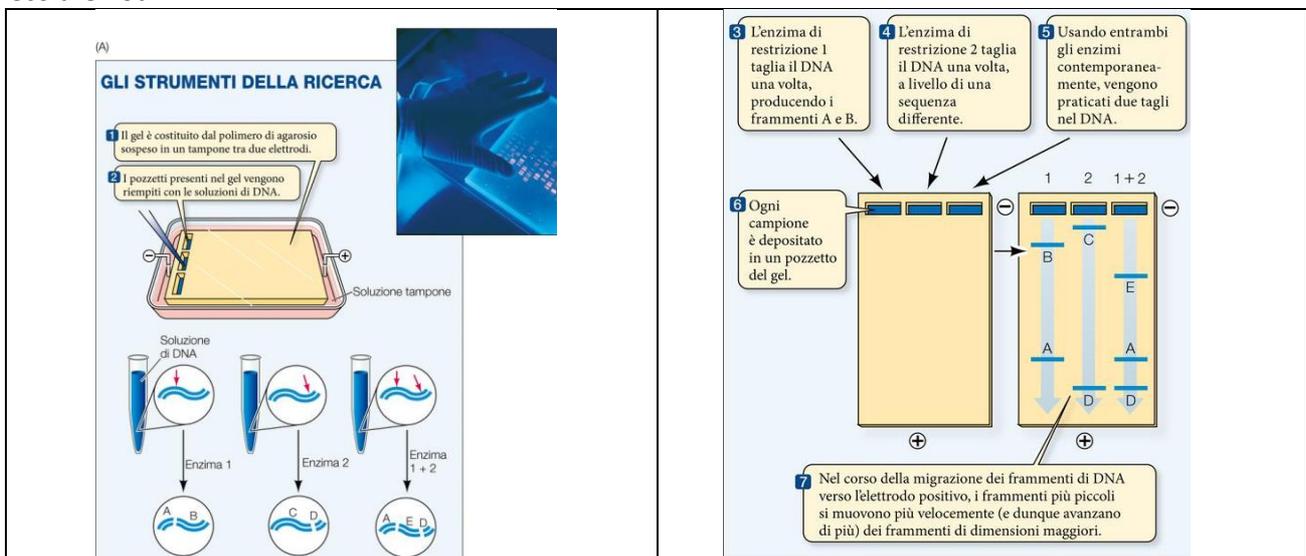
Per separare i frammenti di DNA dopo PCR o taglio con gli enzimi di restrizione si utilizza un gel di agarosio un polisaccaride che si ricava dalle alghe. Il gel è posto in uno stampo di forma rettangolare; a una delle estremità del gel si trovano delle piccole cavità verticali chiamate pozzetti, allineate a formare una fila. Ogni campione, composto da una miscela di frammenti di DNA e colorato con una sostanza blu, viene depositato (o «caricato») in un pozzetto, quindi si applica al gel un campo elettrico, con il polo negativo posizionato vicino ai pozzetti e il polo positivo all'estremità opposta.



A pH neutro, il DNA è carico negativamente grazie alla presenza dei gruppi fosfato; poiché le cariche opposte si attraggono, i frammenti di DNA migrano verso il polo positivo del campo elettrico. Il gel funziona da «setaccio molecolare»: le molecole piccole, infatti migrano attraverso l'agarosio più velocemente di quelle grandi. Dopo un certo intervallo di tempo si interrompe la corrente elettrica e si esamina la distanza percorsa dai frammenti; per visualizzare il DNA si usa un colorante che diventa fluorescente quando viene esposto alla luce ultravioletta

<p>Tampone di corsa TAE (Tris/Acido acetico) Tris-acetato 0.04M EDTA 0.001M</p>	<p>Soluzioni di caricamento Sono costituite da un colorante La loro funzione e': aumentare la densità del campione, Colorare il campione, rendere visibile la corsa elettroforetica</p>
--	--

- I gel sono preparati sciogliendo l'agarosio all'1-1,5% (peso/volume) in TAE, portato alla temperatura di ebollizione.
- Prima che il gel polimerizzi si aggiunge SYBR safe.
- Il gel, lasciato brevemente a raffreddare viene colato in un lettino da elettroforesi di un apparato orizzontale.
- Una volta polimerizzato il gel è posto nell'apparato ed immerso in un tampone di corsa, TAE.
- I campioni da analizzare vengono diluiti in acqua e "loading buffer". Il "loading buffer" appesantisce il campione, facendolo andare sul fondo del pozzetto e consente al contempo di seguire la corsa elettroforetica.
- Si caricano i campioni su gel e si applica una differenza di potenziale di 50/120 V per un tempo variabile dai 5 ai 60 minuti.
- Si visualizzano infine le bande degli acidi nucleici ponendo il gel sotto raggi UV: il SYBR safe che si è intercalato alle basi appare, in queste condizioni, fluorescente.
- Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori con lunghezza in paia di basi (pb) e peso molecolare noti

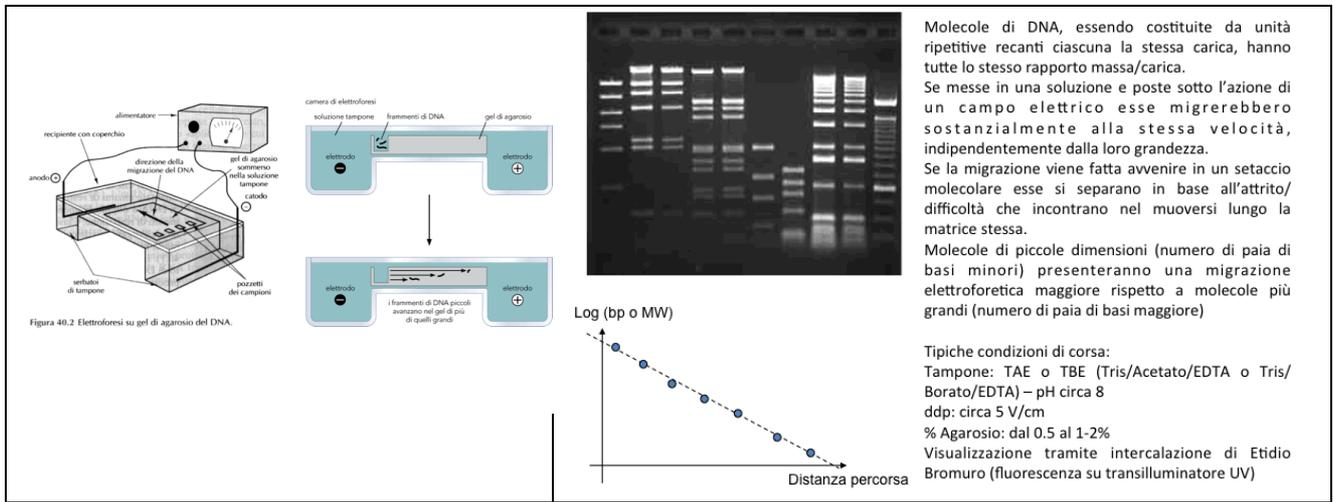


Parametri che influenzano la velocità di migrazione del DNA nei gel di agarosio

- Dimensioni del DNA: le molecole lineari di dsDNA migrano a velocità inversamente proporzionali al logaritmo in base 10 del numero di paia di basi. Le molecole più grandi sono sottoposte a maggiori forze di attrito, e inoltre incontrano maggiore ostacolo nel trovare una via attraverso i pori del gel rispetto alle molecole più piccole. La relazione semilogaritmica descritta fa sì che non vi sia una spaziatura uniforme, lungo il gel, tra bande di DNA differenti tra loro dello stesso numero di paia di basi; invece, quando la dimensione delle molecole sale verso l'estremo superiore dello spettro di dimensioni analizzato, la velocità di migrazione diminuisce e il potere di risoluzione cade notevolmente.

Diagramma semilogaritmico: dimensioni del DNA (kb oppure bp) sull'asse Y logaritmico; cm oppure mm percorsi a parità di tempo sull'asse X lineare.

- Concentrazione di agarosio: Esiste una relazione lineare tra il logaritmo della mobilità elettroforetica del DNA e la concentrazione del gel; questa relazione varia a seconda del valore di una costante (coefficiente di ritardo) collegata alle proprietà del gel e alla taglia e forma delle molecole migranti.



SCOPO DELL'ATTIVITA'

L'incessante spinta alla produzione di alimenti a basso costo può indurre alcuni produttori a mettere sul mercato prodotti che sono dichiarati in etichetta come derivanti da una certa specie animale, quando in realtà ne contengono altre di minor pregio e quindi di minor costo e con componenti nutrizionali differenti. Basti pensare ai numerosi scandali riguardanti mozzarelle di bufala nelle quali di latte di bufala ve ne è ben poco, o pesce che dopo essere stato trasformato (e quindi reso irriconoscibile) passa da una specie a un'altra più pregiata, o carni separate meccanicamente che anziché essere di puro suino vengono "diluite" con specie dal minor costo di mercato.

I soggetti potenzialmente interessati ad applicare metodi analitici in grado di accertare la specie di provenienza di un certo prodotto o di una certa materia prima sono vari: le autorità competenti in materia di sicurezza alimentare e antifrode, ma anche vari protagonisti della filiera alimentare quali i clienti che acquistano materie prime da trasformare e ne vogliono accertare la conformità a quanto pattuito, o le catene della grande distribuzione che debbono garantire adeguati standard qualitativi dei loro prodotti a marchio. I metodi d'indagine sono ascrivibili a due categorie:

1) Metodi basati sul riconoscimento proteico

I metodi tradizionali sono di tipo immunologico, elettroforetico o cromatografico. Tali metodi si basano tutti sull'analisi delle proteine.

2) Metodi basati sul riconoscimento genetico

L'analisi di un gene mitocondriale, il citocromo b, consente di identificare la specie carnea di campioni aventi una dubbia origine. Il gene è molto variabile tra specie e specie, ma estremamente conservato a livello intraspecifico: amplificando tramite PCR una determinata sequenza interna al gene, si ottengono frammenti specie-specifici di diversa lunghezza che, analizzati mediante elettroforesi, individuano il tipo di carne (equina, bovina, ovina...).

Il mistero del polpettone ed il riconoscimento analitico delle carni

Dopo l'acqua, le proteine sono le sostanze più abbondanti nelle cellule e sono coinvolte nella maggior parte dei processi biologici che si svolgono in esse.

Nell'organismo umano si trovano più di 100000 tipi di proteine diverse. Grazie alla loro varietà, le proteine svolgono molte funzioni, tra cui:

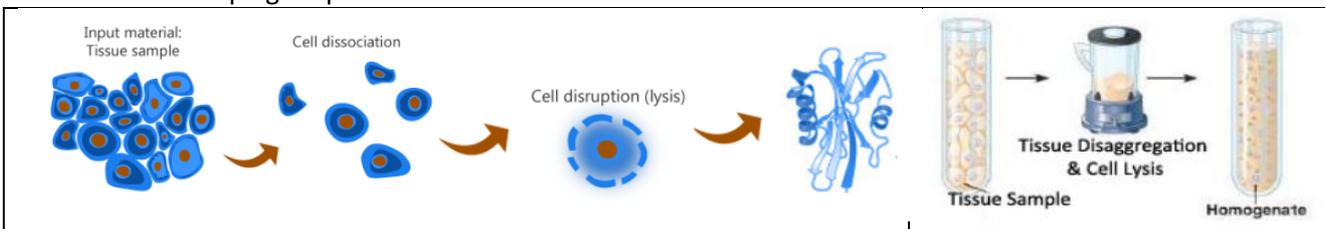
- facilitano le reazioni chimiche che avvengono nelle cellule (ruolo di enzimi),
- regolano l'entrata e l'uscita di alcune sostanze dalle cellule (proteine di membrana),
- servono come sostegno e sono coinvolte nel movimento cellulare (proteine strutturali).

Alcune proteine formano strutture visibili a occhio nudo, come le ragnatele e i capelli. Le macromolecole proteiche sono polimeri lineari di amminoacidi.

La prima tappa nell'isolamento delle proteine prevede l'estrazione dalla cellula. Tale processo avviene mediante un'omogeneizzazione che distrugge il tessuto e rilascia i componenti intracellulari in sospensione.

L'omogeneizzazione viene anche usata come fase preliminare per la purificazione parziale di organuli cellulari per gli studi sulla compartimentazione metabolica. Per il successo della omogeneizzazione sono molto importanti:

- la scelta del tessuto di partenza
- le proprietà fisiche e chimiche della soluzione fisiologica adoperata
- il metodo impiegato per la distruzione delle cellule



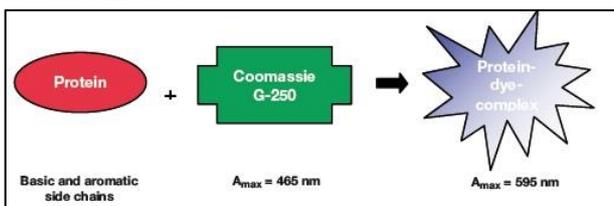
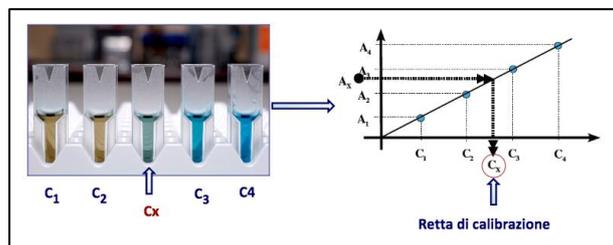
Le procedure di omogeneizzazione per la purificazione delle proteine implicano necessariamente una fase di distruzione cellulare con metodi che possono essere meccanici, chimici ed enzimatici. La scelta del metodo dipende dalla natura della parete/membrana cellulare.

Il contenuto proteico può successivamente essere quantificato utilizzando metodi colorimetrici come il dosaggio mediante saggio Bradford, e le proteine successivamente purificate mediante procedure di frazionamento basate sulle proprietà chimico-fisiche della proteina di interesse. Pur perdendo in parte la proteina desiderata si mira ad eliminare in maniera selettiva le altre componenti dalla miscela.

Caratteristica della proteina	Procedura di purificazione
Solubilità	Salting out
Carica ionica	Cromatografia a scambio ionico Elettroforesi Focalizzazione isoelettrica
Polarità	Cromatografia idrofobica
Dimensioni	Cromatografia per filtrazione su gel SDS-PAGE Ultracentrifugazione
Specificità di legame	Cromatografia per affinità

Quantificazione di proteine.

Reagenti specifici vengono incubati con quantità NOTE di una proteina standard (es. Albumina da siero bovina- BSA) e si ottiene una retta di calibrazione. Poi si fa reagire con lo stesso colorante un volume noto di miscela di proteine e si relaciona l'assorbanza con la quantità sulla retta di calibrazione.



Dosaggio mediante Metodo di Bradford (legame con coloranti). Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine (mediante formazione di complessi non covalenti con gli amminoacidi basici) provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (50% acido fosforico).

Elettroforesi SDS-PAGE (PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis).

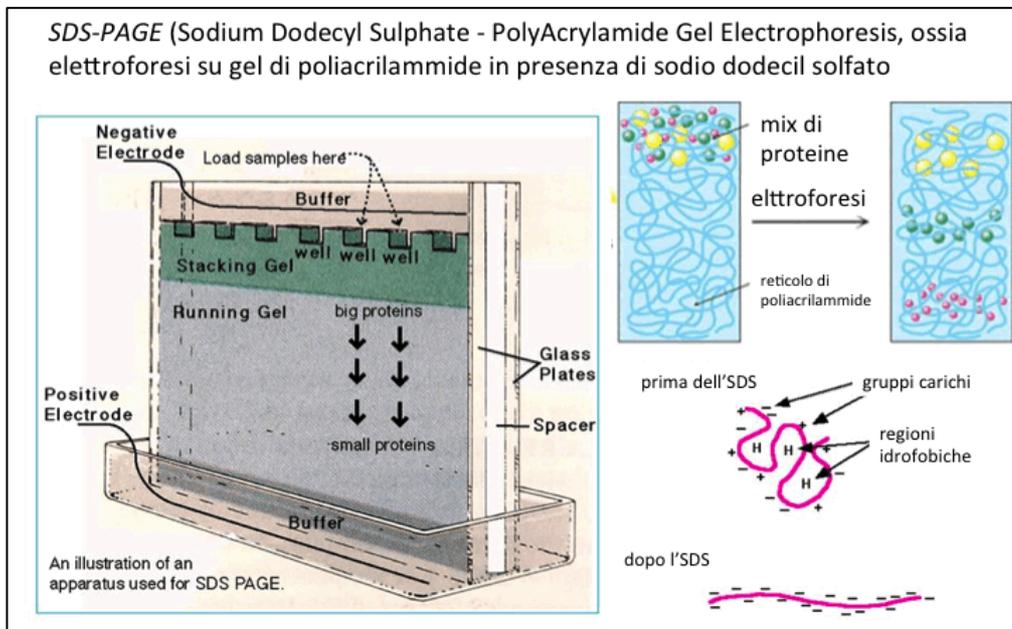
Le proteine hanno una carica totale positiva o negativa che dipende dallo stato di ionizzazione delle catene laterali degli aminoacidi costituenti.

L'elettroforesi è la tecnica che si basa sulla diversa migrazione, attraverso un mezzo fluido e sotto l'influsso di un campo elettrico, di particelle cariche, siano esse ioni o polielettroliti macromolecolari. Le proteine sono dei polielettroliti anfoteri e migrano in un campo elettrico in funzione del rapporto carica/massa. La carica, a sua volta dipende dai pK dei gruppi ionizzabili presenti nelle catene laterali degli aminoacidi costituenti e dal pH del mezzo.

Alla metà degli anni 1960 è stata sviluppata una versione perfezionata di elettroforesi, comunemente nota come SDS-PAGE (PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis), basata sull'utilizzo di un supporto inerte costituito da un gel di poliaccrilamide e del sodio dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico. Esso agisce legandosi alle proteine con legami idrofobici che ne determinano la denaturazione in seguito allo svolgimento delle catene polipeptidiche. L'aggiunta di un agente riducente completa la denaturazione determinando la rottura dei ponti disolfuro intra ed inter-molecolari. Il complesso polipeptide-SDS così formato, assume la forma di un bastoncino con uniforme carica negativa. Sottoposte all'azione di un campo elettrico migreranno tutte verso il polo positivo (anodo). La loro separazione avverrà solo in funzione dei diversi pesi molecolari, dato che il rapporto SDS/proteina, fatta eccezione per alcune proteine, è costante.

Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione della acrilamide con N-N-metilenbisacrilamide. Nel processo di polimerizzazione intervengono un iniziatore che è l'ammonio persolfato, ed un catalizzatore che è la tetrametiletildiamina (TEMED). L'acrilamide così attivata reagisce con un'altra molecola di acrilamide innescando una serie di reazioni a catena che continueranno fino a quando non si saranno esaurite le molecole di acrilamide. La presenza della bisacrilamide, che crea dei ponti tra i polimeri lineari di acrilamide, determina la formazione di un vero e proprio reticolo a maglie. La grandezza di queste maglie e quindi la porosità del gel, dipende dalla concentrazione del copolimero (generalmente tra il 7% e il 15%) e dal rapporto acrilamide/bisacrilamide.

Grazie alla presenza di SDS le proteine migrano dal polo negativo al polo positivo sulla base della massa molecolare (il gel funge da setaccio molecolare). Esse infatti hanno la stessa forma, poiché denaturate, hanno tutte carica negativa e uno stesso rapporto carica/massa.



PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford

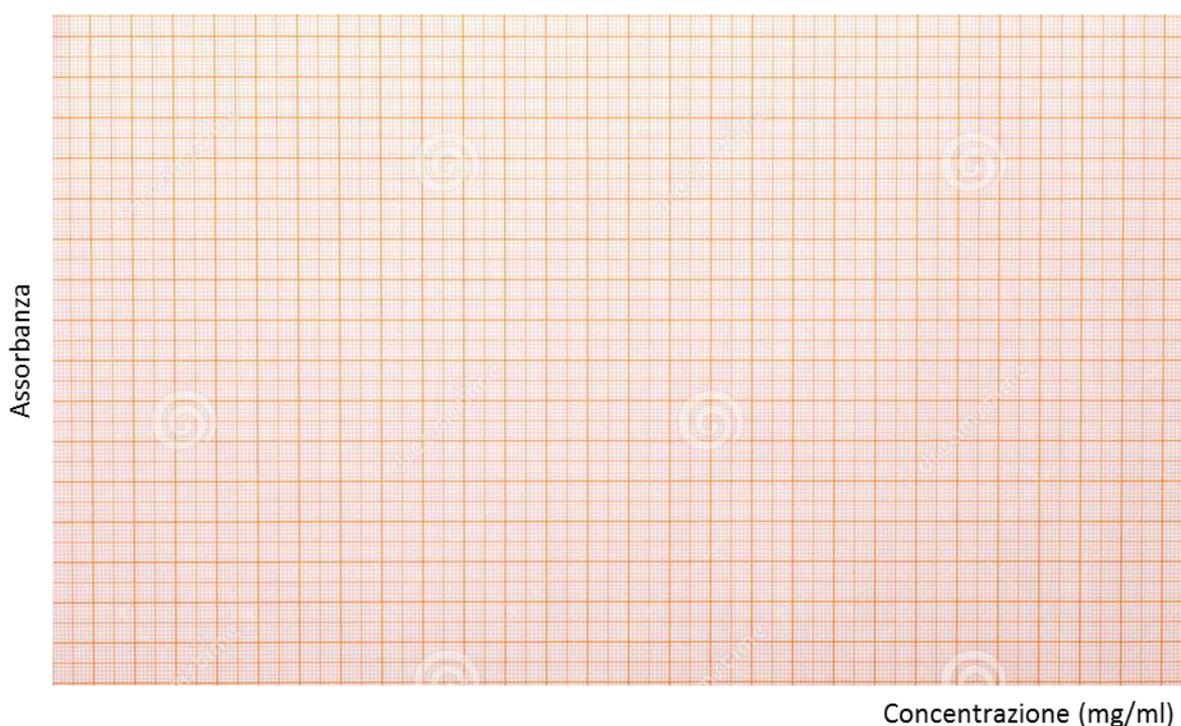
Per la costruzione della retta di taratura preparare 5 soluzioni a concentrazione nota della proteina standard diluendo opportunamente una "soluzione stock" (2 mg/ml).

STANDARD	Soluzione Stock (2 mg/ml)	H ₂ O
0.2 mg/ml	20 µL	180 µL
0.4 mg/ml	40 µL	160 µL
0.6 mg/ml	60 µL	140 µL
0.8 mg/ml	80 µL	120 µL
1 mg/ml	100 µL	100 µL

- Per l'esecuzione del dosaggio utilizzare provette da 1 ml ed aggiungere nell'ordine (in duplicato):
 - 20 µL di campione proteico o di proteina standard (utilizzare una micropipetta P20)
 - 1000 µL del reattivo Bradford (utilizzare la soluzione prediluita).
 - Per la preparazione del bianco (riferimento) aggiungere acqua al posto del campione.
- Agitare su vortex e trasferire il contenuto in cuvette di plastica.
- Effettuare le letture di assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo 5 min di incubazione con il reattivo (il colore blu è stabile per circa 45 min).
- Leggere prima l'assorbanza del bianco (riferimento), quindi azzerare lo spettrofotometro e procedere con le letture di standard e campioni.
- Per il calcolo della concentrazione proteica utilizzare la retta di taratura ottenuta mettendo in relazione le misure di assorbanza e le concentrazioni della proteina standard.

Riportare le letture di assorbanza ottenute

STANDARD	Assorbanza (595 nm)
0.2 mg/ml	
0.4 mg/ml	
0.6 mg/ml	
0.8 mg/ml	
1 mg/ml	
Campione A	
Campione B	



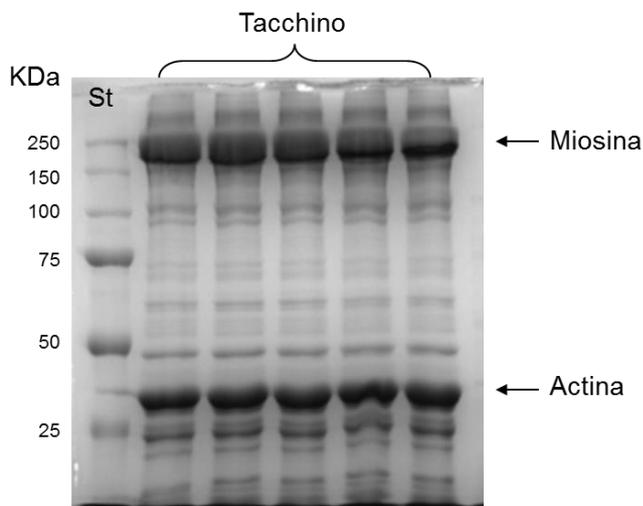
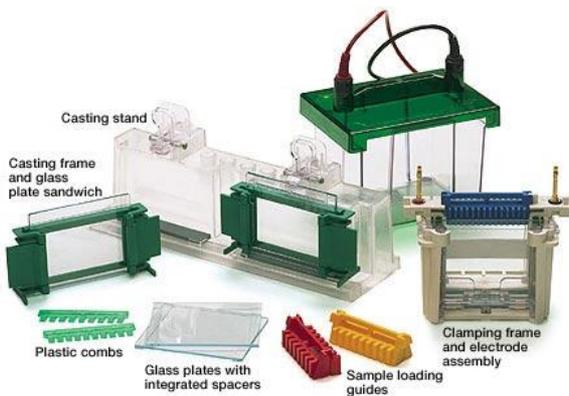
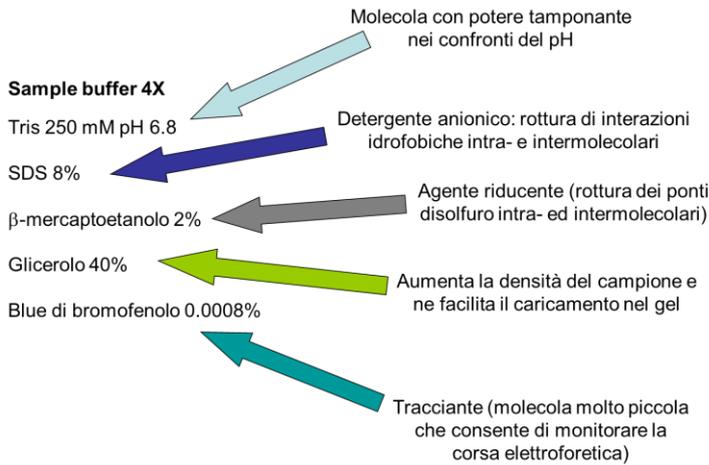
PROTOCOLLO SPERIMENTALE
SDS-PAGE

Prima dell'applicazione sul gel i campioni proteici vengono solubilizzati in un medium contenente SDS, β -mercaptoetanolo, tracciante (Blue di Bromofenolo) e tampone a pH 6.8; poi per mezzo di una micropipetta vengono caricati nei pozzetti del gel i campioni da analizzare (10 μ l). La cameretta viene chiusa con un coperchio che presenta due elettrodi i quali vengono collegati ad un generatore di corrente.

La corsa elettroforetica viene condotta a voltaggio costante:

- 50 V per i primi 15 minuti
- 150 V fino a che il tracciante (BBF) non ha raggiunto la fine del gel.

Essa viene seguita considerando la migrazione del Bromofenolo Blu presente nel medium solubilizzante. In genere la durata della corsa è di circa 60-90 minuti. Terminata l'elettroforesi, il gel viene rimosso dalle due lastre e immerso in una vaschetta contenente una soluzione colorante di Coomassie Brilliant Blue.



Il mistero del polpettone ed il riconoscimento genetico delle carni

Per identificare la specie a cui appartiene la carne che è stata tritata e amalgamata si può ricorrere al test del DNA. Con la PCR viene amplificata una parte del citocromo b, un gene mitocondriale: si utilizza un primer forward (5'---CCT CCC AGC TCC ATC AAA CAT CTC ATC TTG ATG AAA---3') comune a tutte le specie carnee mentre come reverse primer viene utilizzato un oligonucleotide specie---specifico (vedi tabella). I prodotti della PCR sono quindi di lunghezza tipica della specie a cui appartiene il campione analizzato.

Specie carnea	Primer reverse
capra	5'---CTC GAC AAA TGT GAG TTA CAG AGG GA---3'
pollo	5'---AAG AT A CAG ATG AAG AAG AAT GAG GCG---3'
bovino	5'---CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT, ATAAG---3'
maiale	5'---GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA---3'
cavallo	5'---CTC AGA TTC ACT CGA CGA GGG TAG TA---3'

I prodotti della PCR vengono poi visualizzati su gel di agarosio e si evidenziano le seguenti bande :

- 157 bp (base pairs, coppie di basi) per la carne di capra
- 227 bp per la carne di pollo
- 274 bp per la carne bovina
- 398 bp per la carne di maiale
- 439 bp per la carne di cavallo

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Amplificazione del gene del citocromo b

Agli studenti vengono fornite provette eppendorf numerate da 1 a 5 contenenti campioni di DNA provenienti da diverse specie carnee:

1 = capra

2= pollo

3= bovino

4= maiale

5 = cavallo

La provetta n° 6 contiene il DNA estratto da un composto di carne macinata di dubbia composizione

Ciascuno studente identifichi con un pennarello indelebile un tubo eppendorf da 0,2 ml in base al campione sperimentale assegnatogli.

Inserire in un tubo eppendorf da 0,2 ul le quantità indicate nell'ordine riportato in tabella

H ₂ O	8 ul
Buffer 5x	4 ul
Primer 10μM ciascuno	2 ul
dNTP 2mM	2 ul
DNA stampo (campioni da 1 a 6)	2 ul
Taq 2,5U/μl	2 ul

Condizioni PCR:

94 °C	3 min	per 20 cicli
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
4°C	end	

Preparazione del gel di agarosio

Nota di laboratorio: la concentrazione di agarosio del gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2.000 bp, si utilizza un gel di agarosio al 2%.

Preparazione del gel

- 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
- misurare 30 ml di tampone TAE 1x in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 0,6 gr di agarosio. Attenzione a non rovesciare la beuta.
- pesare la beuta contenente la soluzione di agarosio e segnare il peso sul protocollo: _____
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde o su una piastra scaldante
- aspettare 3---5 minuti, coprendo la beuta contenente la soluzione di agarosio con un pezzetto di stagnola, per evitare l'evaporazione. L'agarosio deve raggiungere una temperatura intorno ai 60°C, altrimenti rovina il supporto di plastica della vaschetta dell'elettroforesi. Quindi versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine. I pozzetti si formano quando, una volta solidificato il gel, viene tolto 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 perpendicolare rispetto al gel

Corsa elettroforetica

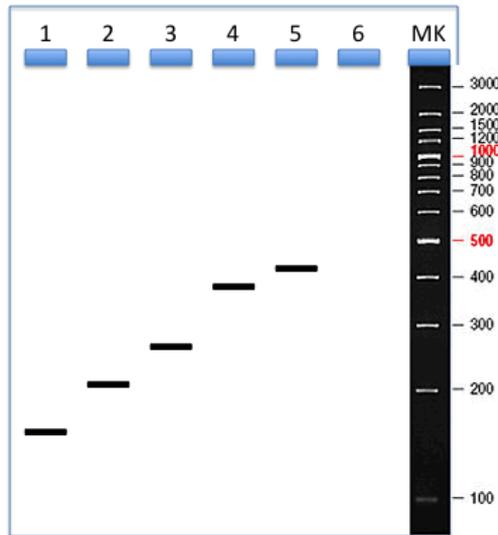
- aggiungere 2 µl di loading dye 6x ai 10 µl di ciascun campione di DNA e risospendere con la micropipetta, evitando di formare bolle. Il glicerolo presente nel loading dye serve per rendere più densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e quindi a facilitarne l'entrata nel pozzetto
- se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga eppendorf (in gergo di laboratorio, si dice "spinnare" da spin, centrifugare)
- caricare lentamente ciascun campione (12 µl) nei singoli pozzetti (ogni pozzetto ha un volume di circa 15 µl), 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
- in un pozzetto laterale, caricare il marker di DNA a peso molecolare noto
- chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del generatore di corrente, detto anche power supply; il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo
- fissare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 30 min
- fare attenzione che la banda del blu di bromofenolo non esca dal gel (altrimenti alcune bande di DNA possono uscire dal gel)
- 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 300 bp, mentre lo xilen cianolo migra alla stessa velocità di un frammento di circa 4.000 bp. Attenzione: fermare la corsa elettroforetica quando il blu di bromofenolo si trova a circa 1---2 cm dalla fine del gel, in modo da evitare che il DNA esca dal gel stesso. Se dovesse succedere, si perdono i campioni di DNA!
- Al termine della corsa elettroforetica, indossare i guanti monouso, togliere delicatamente il gel dalla cella osservare il gel al transilluminatore il gel d'agarosio viene esposto alla luce ultravioletta per visualizzare il DNA

Analisi dei risultati

Durante la corsa elettroforetica i frammenti di DNA si sono separati in base al loro peso molecolare (vedi introduzione).

L'immagine acquisita dovrebbe essere simile al diagramma di seguito riportato.

- 1**=157 bp (base pairs, coppie di basi) per la carne di pecora
- 2**= 227 bp per la carne di pollo
- 3**= 274 bp per la carne bovina
- 4**= 398 bp per la carne di maiale
- 5**= 439 bp per la carne di cavallo
- 6**= campione incognito
- MK**= marcatore di peso molecolare



In base a quanto discusso precedentemente, sai dirmi ora cosa c'è per cena?

Norme generali di sicurezza in laboratorio

- Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.
- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- Indossare guanti monouso durante la manipolazione di sangue o di materiale da esso derivato non fissato. I guanti devono essere rimossi con attenzione e sostituiti quando sono visibilmente contaminati. I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tascheria, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente, immediatamente dopo la manipolazione di materiali contaminati e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare, portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite propipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro.
- Tutto il materiale biologico d'origine umana (sangue, ecc.) deve essere considerato come potenzialmente infetto e pertanto trattato con le necessarie precauzioni.
- Segnalare immediatamente al personale docente ogni spargimento di materiale biologico (ad es. schizzi di sangue) sul piano di lavoro, affinché si provveda alla decontaminazione con un germicida chimico appropriato (candeggina, ecc.).
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Raccogliere tutti i liquidi biologici (sangue, terreni di coltura venuti a contatto con le cellule, cellule, ecc.) in speciali contenitori per rifiuti, che verranno successivamente eliminati previo trattamento con candeggina al 15%.
- Mettere il materiale monouso (pipette, fiasche ecc.) venuto a contatto con materiale biologico in un sacco apposito, che verrà smaltito mediante incenerimento.
- Stante i costi elevati dello smaltimento, ridurre il più possibile l'uso del materiale monouso.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione

Utilizzo della centrifuga

- chiudere accuratamente il tappo delle provette, per evitare la fuoriuscita di liquido e la formazione di aerosol
- assicurarsi che il rotore sia bilanciato: provette di uguale peso devono essere inserite negli alloggiamenti diametralmente opposti
- chiudere il coperchio della centrifuga prima di avviarla
- non cercare di aprire il coperchio prima del completo arresto del rotore
- in caso di fuoriuscita di liquido dalle provette, avvertire il personale docente

Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

- assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti
- assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti
- alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti