



Un assaggio di genetica  
MiniLab  
Guida Studente

**Cat# M6010/M6012/M6013**

Versione 080221-IT



## Tabella dei contenuti

Sicurezza del laboratorio	2
Introduzione	3
Giorno 1: test del gusto PTC ed estrazione del DNA	8
Giorno 2: impostare ed eseguire l'amplificazione PCR	13
Giorno 3: Digestione di restrizione ed elettroforesi su gel	19
Analisi del gel	25
Appendice A – Glossario	28
Appendice B – Reazione a catena della polimerasi	30
Appendice C – Elettroforesi su gel	32
Appendice D – Letture consigliate	33

## SICUREZZA IN LABORATORIO

1. Indossare camice da laboratorio, guanti e protezione per gli occhi quando possibile.
2. Usare con cautela tutte le apparecchiature elettriche come la macchina per PCR e l'elettroforesi.
3. La macchina PCR ha superfici che possono essere estremamente calde. Prestare attenzione quando si apre e chiude il coperchio e quando si mettono e si tolgono le provette.
4. Riscaldare e versare l'Agarosio fuso può essere causa di schizzi. Maneggiare con attenzione liquidi caldi. Indossare protezioni per gli occhi e guanti per evitare ustioni.
5. Lavare accuratamente le mani dopo aver maneggiato materiali biologici e prodotti chimici.
6. Smaltire tutti i materiali in un sacchetto per il rischio biologico o in una vasca di lavaggio contenente una soluzione di candeggina al 10%.

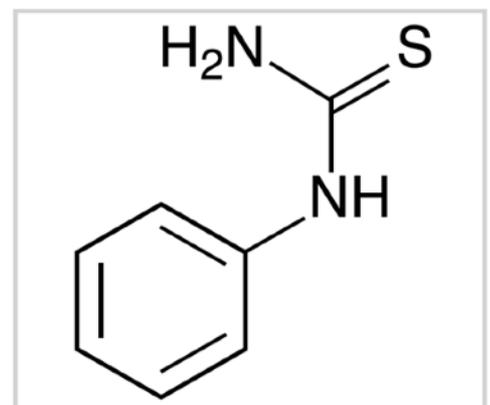
## Introduzione

Ogni individuo umano percepisce il mondo in modo leggermente diverso. Alcune differenze derivano dalle nostre esperienze passate e altre sono legate al nostro patrimonio genetico. Il 99,9% del genoma umano è identico tra gli individui, mentre il restante 0,1% ci rende biologicamente unici. Le differenze genetiche si estendono ai nostri sistemi sensoriali che influenzano il nostro modo di vedere, sentire e gustare il mondo. In alcuni casi, conosciamo i geni e le proteine specifiche che sono alla base delle differenze di percezione. In questo laboratorio esploreremo la genetica molecolare del gusto. Determinerete il vostro genotipo per un recettore chimico coinvolto nella percezione dei composti amari.

### Storia della ricerca sulla degustazione di PTC

La degustazione di Feniltiocarbammide (PTC; Figura 1) è uno degli esempi più studiati di variazione ereditaria nella capacità di degustazione. Alla fine degli anni '20, Arthur L. Fox lavorava come chimico alla DuPont. Mentre stava versando la polvere PTC in una bottiglia, il suo collega, C.R. Noller, si lamentò che la polvere aveva un sapore estremamente amaro. Tuttavia, Fox non riusciva a sentire alcun sapore. Entrambi assaggiarono a turno la polvere con gli stessi risultati: Fox non sentiva nulla, mentre Noller provava un sapore amaro. Curioso, Fox iniziò a testare altre persone e scoprì che la maggior parte delle persone o aveva forti reazioni al gusto amaro, anche a basse concentrazioni, o non sentiva nulla.

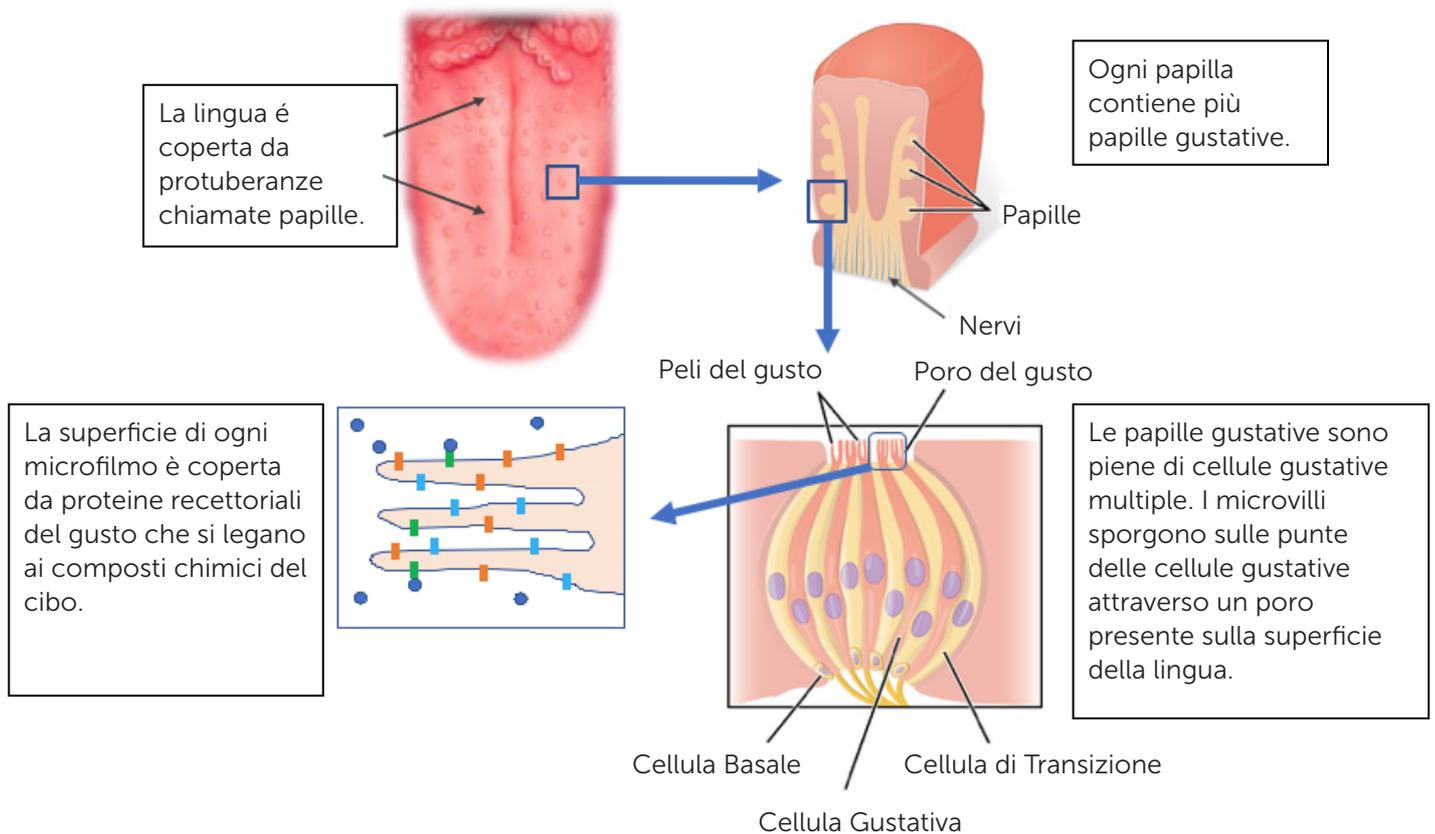
Queste scoperte trovarono immediato interesse tra gli scienziati che studiavano l'eredità mendeliana e la variazione sensoriale umana. Laurence H. Snyder confermò i risultati di Fox e studiò il tratto in diverse famiglie. Ha concluso che la capacità di degustazione del PTC era ereditaria. Albert Blakeslee, famoso per il suo lavoro nella genetica delle piante, condusse la prima indagine su larga scala coinvolgendo le famiglie e trovò che la degustazione del PTC segue un modello di eredità mendeliana, ma la sensibilità può variare in ampiezza. Sulla base di questi risultati, Blakeslee ha suggerito che altri geni possono essere coinvolti rendendo la base genetica per la degustazione PTC più complicata di quanto si pensasse inizialmente. Per questa lezione tratteremo la degustazione PTC come un semplice tratto mendeliano che mostra una dominanza semplice, o completa



**Figura 1.** La struttura chimica della Feniltiocarbammide (PTC).

### Fisiologia del gusto umano

Il gusto umano è un fenomeno complesso che nasce dalle interazioni tra le sostanze presenti nel cibo e i recettori chimici della nostra bocca e naso, ed elaborazione dei segnali nel cervello. La lingua è coperta da protuberanze chiamate papille (Figura 2). Ogni papilla contiene più papille gustative piene di cellule gustative. Ogni cellula gustativa ha delle proteine sulla superficie con forme specializzate in grado di legarsi a sostanze chimiche associate a diversi sapori (dolce, salato, aspro, amaro e umami). Quando una sostanza chimica si lega al suo recettore sulla superficie di una cellula gustativa, viene innescata una risposta all'interno della cellula. Se la risposta è abbastanza forte, la cellula gustativa rilascia neurotrasmettitori sui dendriti dei neuroni sensoriali. I neuroni sensoriali inviano un segnale al cervello che viene elaborato come percezione del sapore.



**Figura 2. Fisiologia del gusto umano. Le papille sulla lingua contengono le papille gustative, che sono piene di cellule gustative. Ogni cellula gustativa ha proteine recettrici del gusto sulla sua superficie, che possono legarsi a molecole associate a diversi sapori.**

Crediti d'immagine: Immagine della lingua: By gabymichel [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], da Wikimedia Commons, Immagini di papille e papille gustative: By OpenStax [CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)], da Wikimedia Commons.

## Genetica molecolare della degustazione PTC

Negli studi genetici, un tratto osservabile, come la capacità di gustare il PTC, è chiamato fenotipo. Un genotipo è la base genetica di un tratto, l'informazione genetica che codifica per il fenotipo. Un allele è una delle due o più forme distinte di un gene situato in una posizione specifica su un cromosoma. Poiché avete due set di cromosomi omologhi, uno ereditato da vostra madre e uno da vostro padre, avete due copie di ogni gene. Le due copie possono essere lo stesso allele o alleli diversi. Negli studi di base, la capacità di gustare il PTC è ereditata come un tratto mendeliano semplice. Come per altri tratti mendeliani semplici, come il mento spaccato o il picco della vedova, il gene associato alla capacità di gustare il PTC esiste in due forme alleliche, dominante (T) e recessiva (t). Le indagini sul fenotipo PTC nelle famiglie hanno concluso che la capacità di gustare il PTC è un tratto dominante. Poiché un allele dominante maschera la presenza dell'allele recessivo, il genotipo di un assaggiatore può essere omozigote dominante (TT) o eterozigote (Tt). Se una persona non è un assaggiatore, allora il suo genotipo è omozigote recessivo (tt).

Il gene TAS2R38 è stato identificato e sequenziato nel 2003 da Un-kyung Kim e colleghi. Questo gene codifica per una proteina di superficie cellulare che si lega al PTC e avvia una cascata di segnalazione intracellulare. Il gene è lungo 1143 paia di basi nucleotidiche (bp) e si

trova sul braccio lungo del cromosoma 7 insieme ad altri nove geni per i recettori del gusto amaro. Confrontando le sequenze di DNA tra assaggiatori e non assaggiatori, gli scienziati hanno determinato che ci sono tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) che differenziano l'allele dell'assaggiatore (T) da quello del non assaggiatore (t). Un SNP è un tipo di variazione genetica in cui un nucleotide in una singola posizione differisce tra gli individui. Per essere considerato un SNP piuttosto che una mutazione, la variante deve esistere in almeno l'1% della popolazione generale. Il genoma umano contiene circa 10 milioni di SNP e il genoma di ogni individuo ha un modello unico di SNP. Poiché si verificano in posizioni note nel genoma, gli SNP sono utili come marcatori molecolari per le malattie la cui precisa causa genetica è sconosciuta.

La tabella 1 elenca i tre SNPs associati agli alleli taster e non-taster del gene TAS2R38 e la posizione nucleotidica nel gene in cui appare lo SNP. Si noti che questi SNP sono associati a cambiamenti di codone che alterano la sequenza di aminoacidi della proteina, alterandone la funzione. Ci sono otto possibili combinazioni di questi tre SNP. Tuttavia, gli SNP sono geneticamente legati, cioè vengono ereditati insieme, e quindi non tutte le combinazioni sono ugualmente probabili. Un recente studio su 1156 americani ha scoperto che il 53,1% dei partecipanti allo studio aveva l'AVI (non-taster) e il 42,3% dei partecipanti aveva la combinazione PAV (taster). Altre combinazioni erano meno comuni: il 2,5% aveva AAV e l'1,2% aveva AAI, per esempio.

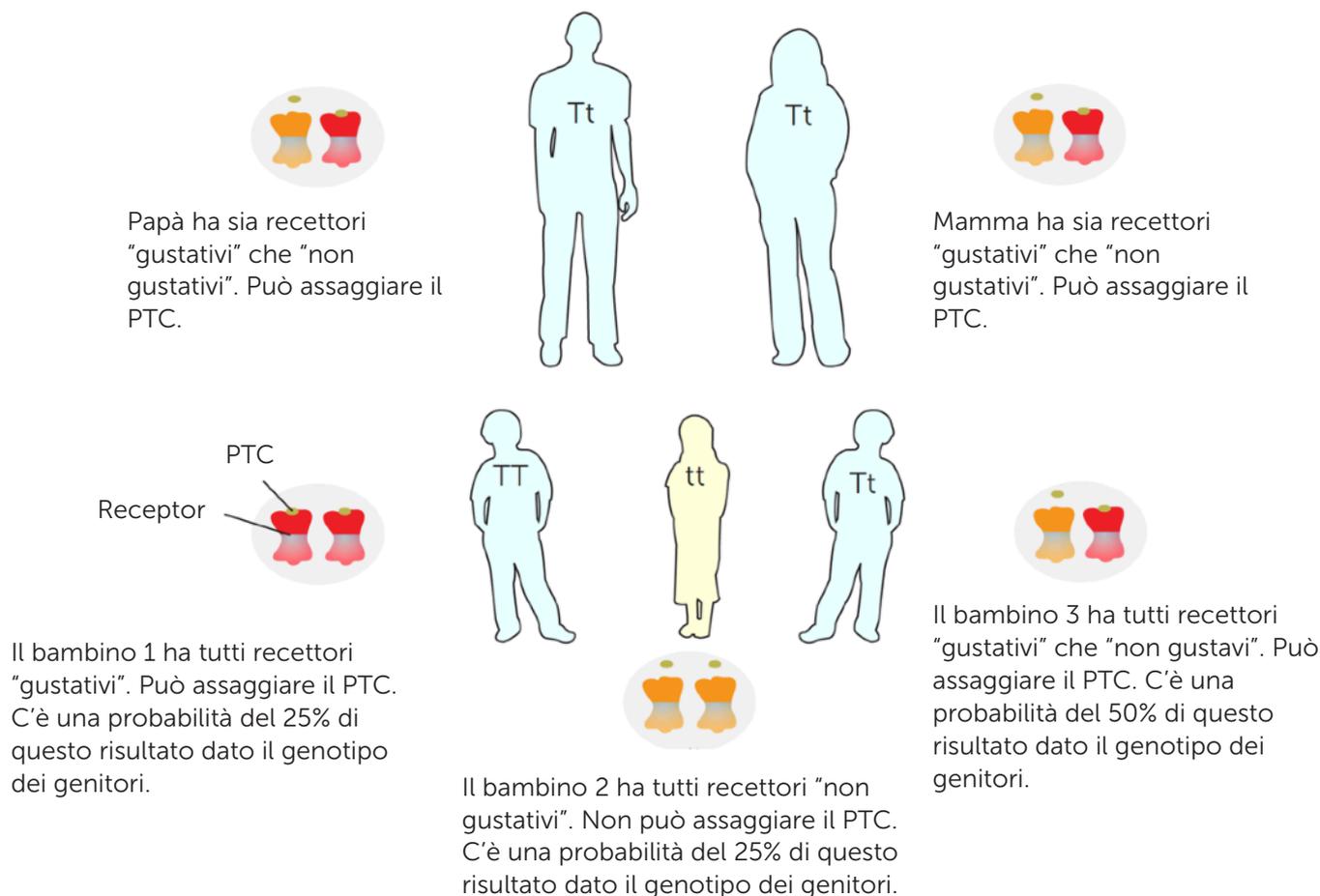
### Il tuo genoma personale

Analizzare le variazioni genetiche tra gli individui fornisce indizi sulle cause di malattie complesse come il diabete, il cancro e le malattie cardiache, e può rivelare la storia familiare e il patrimonio di un individuo. Con il rapido accumulo di dati genetici, la medicina personalizzata, la personalizzazione dei trattamenti medici per il background genetico unico di un individuo, potrebbe presto diventare una parte standard dell'assistenza sanitaria.

**Tabella 1: Tre SNPs nel gene TAS2R38 controllano la capacità di gustare il PTC. AVI è la variante non-taster (recessiva) e PAV è la variante taster (dominante).**

Posizione del nucleotide	Cambio di nucleotide		Cambio di codone		Cambio di aminoacidi	
	Non-taster	Assaggiatore	Non-taster	Assaggiatore	Non-taster	Assaggiatore
145	G	C	GCA	CCA	Alanina (A)	Prolina (P)
785	T	C	GTT	GCT	Valina (V)	Alanina (A)
886	A	G	ATC	GTC	Isoleucina (I)	Valina (V)

L'obiettivo della genetica molecolare è quello di collegare un fenotipo osservabile, come una malattia o una caratteristica fisica, con la sequenza genetica che determina quel fenotipo. In questo laboratorio avrai l'opportunità di osservare se puoi assaggiare il composto PTC. Poi analizzerai il tuo DNA per determinare se sei un omozigote non degustatore (tt: AVI/AVI), omozigote degustatore (TT: PAV/PAV), o eterozigote degustatore (Tt: PAV/AVI). Prima che il gene TAS2R38 fosse identificato, era impossibile conoscere il genotipo di un assaggiatore senza analizzare i fenotipi dei parenti stretti. Ora che conosciamo la sequenza genetica possiamo scoprire il tuo genotipo con pochi semplici strumenti. La figura 3 illustra l'eredità mendeliana del tratto di degustazione PTC.



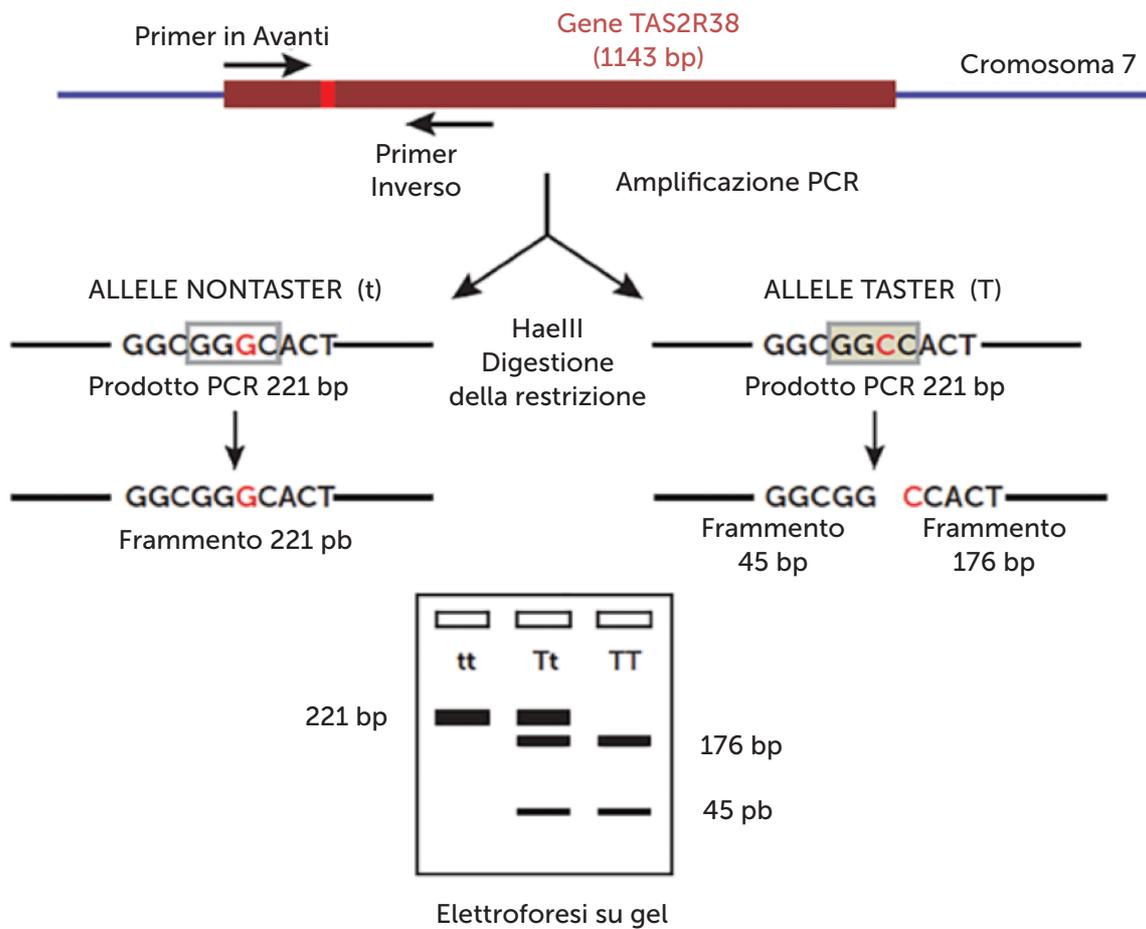
**Figura 3. Eredità Mendeliana del tratto di degustazione PTC in una famiglia.**

### Genotipizzazione con un digest di restrizione

La Figura 4 è una panoramica dei metodi che userai per determinare il tuo genotipo. Il primo passo è quello di estrarre il DNA genomico dalle tue cellule delle guance. Poiché questo estratto contiene cromosomi completi e troppe poche copie del gene da analizzare, userai la reazione a catena della polimerasi (PCR) per fare miliardi di copie di una regione di 221 bp del gene TAS2R38 che contiene lo SNP alla posizione nucleotidica 145. Per i dettagli su come funziona la PCR, vedi l'Appendice B.

Gli alleli T e t possono essere distinti con un test di digestione della restrizione. Gli enzimi di restrizione sono conosciuti come "forbici molecolari" perché tagliano il DNA in una specifica sequenza nucleotidica, chiamata sito di restrizione. Il taglio del DNA con un enzima di restrizione è chiamato digestione di restrizione. Questi enzimi sono prodotti naturalmente dai batteri come difesa contro i virus invasori.

**Figura 4. Panoramica della Genotipizzazione degli assaggiatori di PTC mediante PCR, analisi di restrizione HaeIII ed elettroforesi su gel.**



In questo laboratorio useremo un enzima di restrizione chiamato HaeIII, che riconosce la sequenza GGCC. Quando l'enzima HaeIII incontra questa sequenza di riconoscimento, taglia entrambi i filamenti di DNA tra i nucleotidi G e C, ottenendo due frammenti di DNA. I frammenti che vengono tagliati danno due bande su un gel di Agarosio e i frammenti che non vengono tagliati danno una banda. Questo porta a un modello unico di bande per ogni genotipo. Il prodotto PCR dei non assaggiatori avrà una singola banda. Il prodotto PCR degli assaggiatori che sono omozigoti dominanti avrà due bande e gli assaggiatori che sono eterozigoti avranno tre bande (Figura 4). Per i dettagli su come l'elettroforesi del gel viene utilizzata per separare frammenti di DNA di dimensioni diverse, vedere l'appendice C.

## Giorno 1: Test del gusto PTC ed estrazione del DNA

Un'estrazione che produca DNA di alta qualità è il primo passo essenziale per analizzare una sequenza di DNA. Oggi raccoglierai le tue cellule e poi userai il calore e una soluzione a pH elevato per rompere le cellule e rilasciare il DNA genomico in soluzione. Successivamente amplificherai un segmento di questo DNA per determinare il tuo genotipo TAS2R38

### Postazioni di lavoro in comune



Microcentrifuga da banco



Sistema MiniOne® PCR



Dispositivo mobile con MiniOne® PCR App



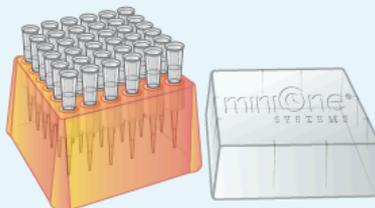
Guanti, occhiali, camice da Laboratorio

Giorno 1

### Ciascun gruppo di studenti e postazioni di lavoro



Micropipetta MiniOne 2-20 µL



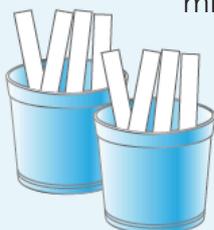
2-200 µL Puntali universali per micropipette



3 mL di soluzione salina (1 tazza per studente)



Soluzione di estrazione (250 µL)



Controllo del gusto e carte del gusto PTC



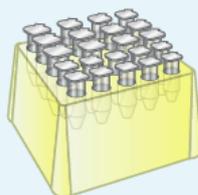
Provette PCR da 0,2 mL (2 per studente)



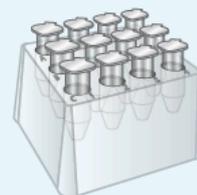
Marcatore permanente a punta fine



Contenitore per rifiuti per puntali di pipette e provette



Portaprovette PCR



Portaprovette per microcentrifuga

## Giorno 1 Procedura

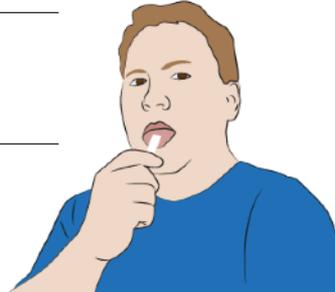
**1** Metti la carta del test di controllo del gusto sulla lingua.

Che cosa è successo? \_\_\_\_\_  
(Osservazione)

Metti la carta per il test PTC sulla lingua.

Che cosa è successo? \_\_\_\_\_  
(Osservazione)

Perché alcuni dei tuoi compagni di classe sentono un sapore amaro e altri no?



**Lavorare in gruppi di 4:** Controlla la tua postazione per assicurarti di avere tutti i materiali.

**2**

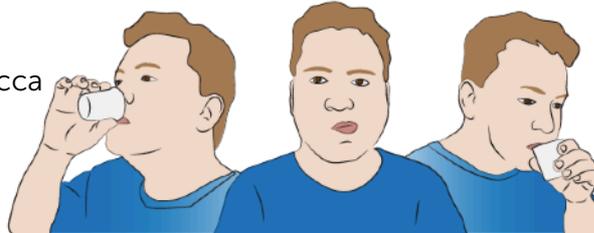


Etichetta due provette PCR e una tazza di soluzione salina con il numero del tuo gruppo e le tue iniziali.

**3**

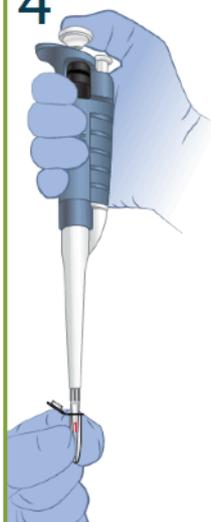
Sciacquare vigorosamente per 2 minuti

Versare la soluzione salina in bocca



Espellere con cura la soluzione salina nella tazza

**4**



Pipettare 200  $\mu\text{L}$  del tuo sputo in una delle provette PCR etichettate.

Se non hai una micropipetta da 20-200  $\mu\text{L}$ , una pipetta da 2-20  $\mu\text{L}$  può essere usata per pipettare 10 x 20  $\mu\text{L}$  di sputo nella provetta PCR.

Potresti voler suonare la canzone del DNA elencata nella Lettura consigliata (Appendice D). Dite agli studenti di continuare a scuotere finché non sentono la frase "scala a spirale" (circa 2 minuti).

Usa il tempo extra in classe per discutere il background della PCR e della genetica PTC con gli studenti.

**Scartare le strisce PTC come rifiuto biologico.**

## Giorno 1 Procedura (continua)

**5** Chiudere bene il tubo PCR, ma non schiacciare la parete sottile, altrimenti si possono verificare delle crepe capillari.

3 min.  
8000 RPM

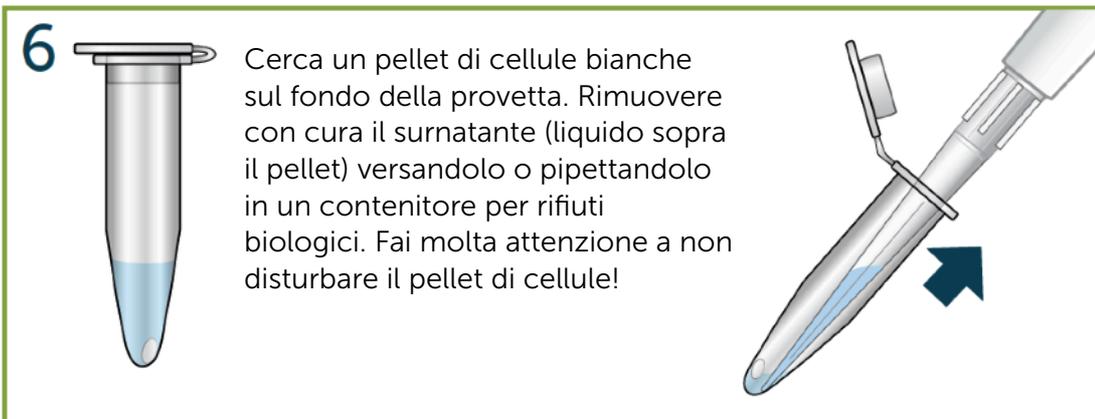
Assicurarsi che la centrifuga sia bilanciata e che le provette PCR siano posizionate nei fori più piccoli. Usa un adattatore se necessario.

*\*Suggerimento: ricorda quale lato della provetta è rivolto verso l'esterno della centrifuga per rendere più facile trovare il pellet.*



The illustration shows a hand in a blue glove holding a PCR tube. To the right is a white and blue centrifuge with its lid open. Below the centrifuge is a circular rotor with several PCR tubes inserted into its holes. A blue arrow points from the hand to the centrifuge, and another blue arrow points from the centrifuge to the rotor.

**6** Cerca un pellet di cellule bianche sul fondo della provetta. Rimuovere con cura il surnatante (liquido sopra il pellet) versandolo o pipettandolo in un contenitore per rifiuti biologici. Fai molta attenzione a non disturbare il pellet di cellule!

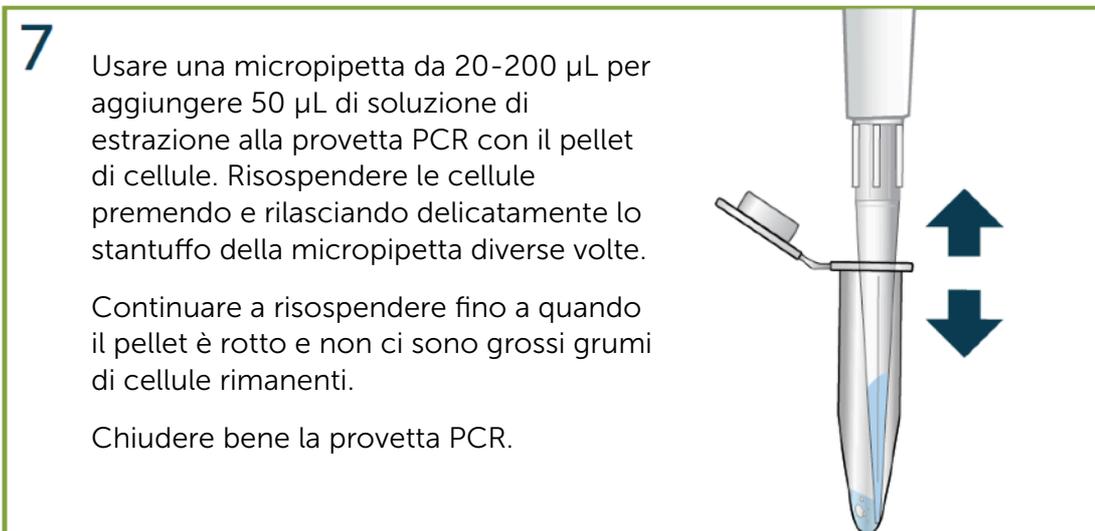


The illustration shows a PCR tube on the left with a small white pellet at the bottom. On the right, a pipette is shown with its tip inside the tube, and a blue arrow points to the tip, indicating the removal of the supernatant.

**7** Usare una micropipetta da 20-200  $\mu\text{L}$  per aggiungere 50  $\mu\text{L}$  di soluzione di estrazione alla provetta PCR con il pellet di cellule. Risospendere le cellule premendo e rilasciando delicatamente lo stantuffo della micropipetta diverse volte.

Continuare a risospendere fino a quando il pellet è rotto e non ci sono grossi grumi di cellule rimanenti.

Chiudere bene la provetta PCR.



The illustration shows a micropipette with its tip inside a PCR tube. Two blue arrows, one pointing up and one pointing down, indicate the resuspension of the pellet.

## Giorno 1 Procedura (continua)

**8** Mettere la provetta nella macchina PCR



**9** Usa il tuo dispositivo mobile con l'App PCR mobile, programma la macchina PCR usando la modalità di temperatura costante per incubare i campioni a 95°C per 300 secondi (5 minuti) per rompere le cellule e rilasciare il DNA in soluzione. Inserire 4°C per la temperatura di incubazione finale. Ciò manterrà i campioni freddi fino a quando non sarete in grado di prelevarli.

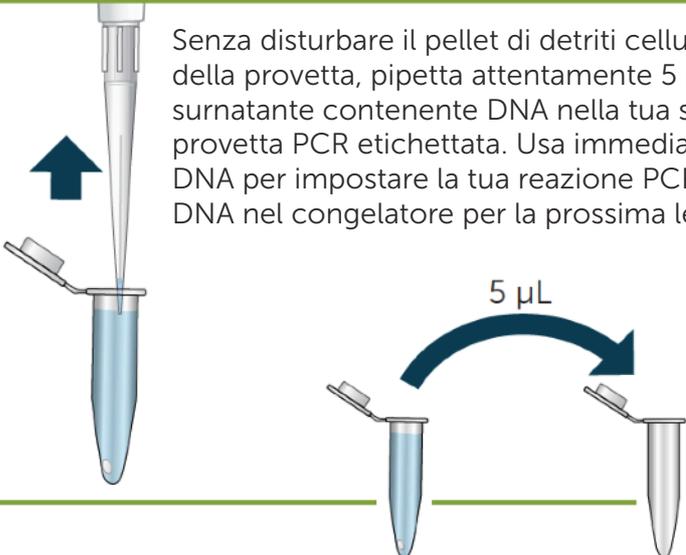


**10**



Recupera la tua provetta dalla macchina PCR e falla girare per 1 minuto ad almeno 8.000 RPM in una centrifuga da banco per raccogliere i detriti cellulari sul fondo della provetta.

**11**



Senza disturbare il pellet di detriti cellulari sul fondo della provetta, pipetta attentamente 5 µL del surnatante contenente DNA nella tua seconda provetta PCR etichettata. Usa immediatamente il DNA per impostare la tua reazione PCR o conserva il DNA nel congelatore per la prossima lezione.

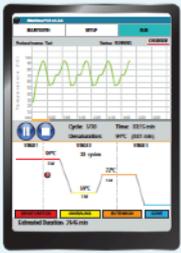
## Domande di analisi

1. La carta PTC aveva un sapore amaro? In base alla tua capacità di assaggiare il PTC quali possibili genotipi potresti avere?
2. Se una persona può gustare la PTC, quali sono i suoi possibili genotipi?
3. Disegna ed etichetta un diagramma di flusso o un diagramma di ciò che accade al tuo campione di DNA come risultato delle seguenti fasi del protocollo di estrazione. Per ogni passo, spiega cosa succede a livello cellulare/molecolare.  
  
    Scuotere la soluzione salina in bocca. Cosa fa il processo di scuotimento? Cosa fa il sale?  
  
    Riscaldare il campione  
  
    Centrifugare il campione dopo il riscaldamento
4. Quando estrai il DNA con il protocollo di cui sopra, cos'altro viene estratto dalle cellule oltre al DNA?
5. Oltre a studiare il gene TAS2R38, descrivi due domande scientifiche che potrebbero essere esplorate studiando il tuo campione di DNA.

## Giorno 2: impostare ed eseguire l'amplificazione PCR

Il giorno 1, abbiamo estratto il DNA genomico totale dalle tue cellule delle guance. Oggi useremo la PCR per fare miliardi di copie di una piccola regione del gene TAS2R38 con un SNP che ci permetterà di distinguere le varianti assaggiatrici da quelle non assaggiatrici con un digest di restrizione.

**Postazioni di lavoro in comune**



Microcentrifuga da banco      Sistema MiniOne® PCR      Dispositivo mobile con MiniOne® PCR App      Guanti, occhiali, camice da Laboratorio

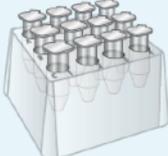
**Ciascun gruppo di studenti e postazioni di lavoro**



Micropipetta MiniOne 2-20 µL      2-200 µL Puntali universali per micropipette      1 provetta PCR per studente



45 µL Taq PCR Mastermix (2X)      25 µL di miscela di primer PCR      Campione di DNA estratto dal giorno 1 (per ogni studente)      Marcatore permanente a punta fine

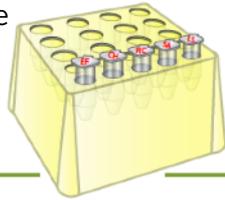


Contenitore per rifiuti per puntali di pipette e provette      Portaprovette PCR      Portaprovette per microcentrifuga

Giorno 2

## Giorno 2 Procedura Sperimentale

- 1** Recupera il tuo campione di DNA estratto



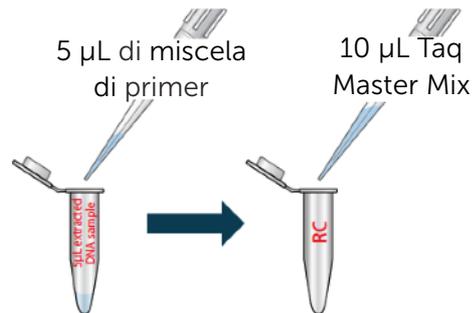
**2**

Setup PCR (uno per ogni studente)

Reagente	Volume
Campione di DNA estratto	5 $\mu$ L
Miscela di primer	5 $\mu$ L
Taq PCR Mastermix (2X)	10 $\mu$ L
<b>Totale</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

Aggiungere i seguenti 2 componenti in una nuova provetta PCR:

*\*Suggerimento: aggiungere piccoli volumi direttamente sul fondo della provetta PCR per evitare di avere bolle intrappolate sul fondo della provetta.*



- 3** Tappare bene la provetta e scuoterla delicatamente per mescolare i reagenti



15 sec.  
8000 RPM



Assicurarsi che la centrifuga sia bilanciata

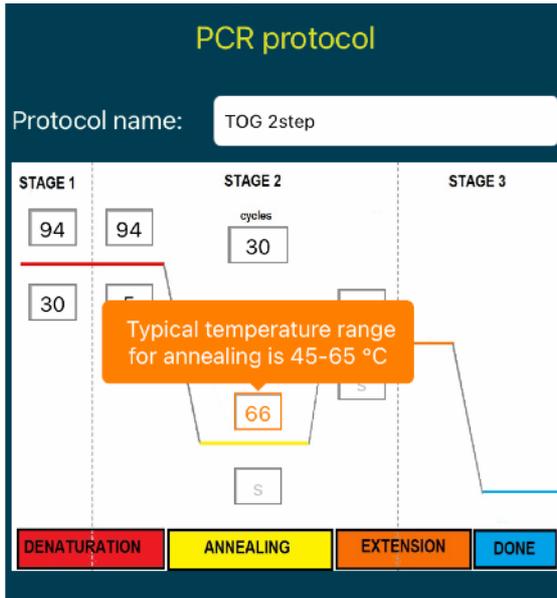
## Day 2 - Giorno 2 Procedura Sperimentale (continua)



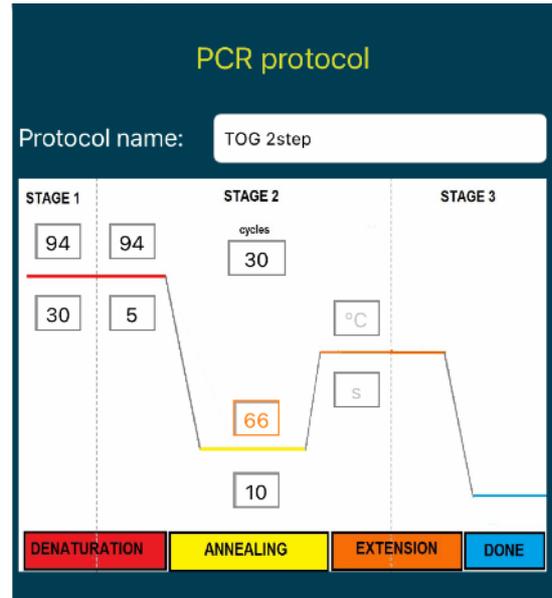
Protocollo di ciclaggio per l'amplificazione dei frammenti::

Passo	Durata	Temp	Cicli
Dénaturation initiale	30 sec	94°C	
Denaturazione	5 sec	94°C	30 cicli
Ricottura	10 sec	66°C	
Estensione	15 sec	66°C	
Incubazione finale	∞	4°C	

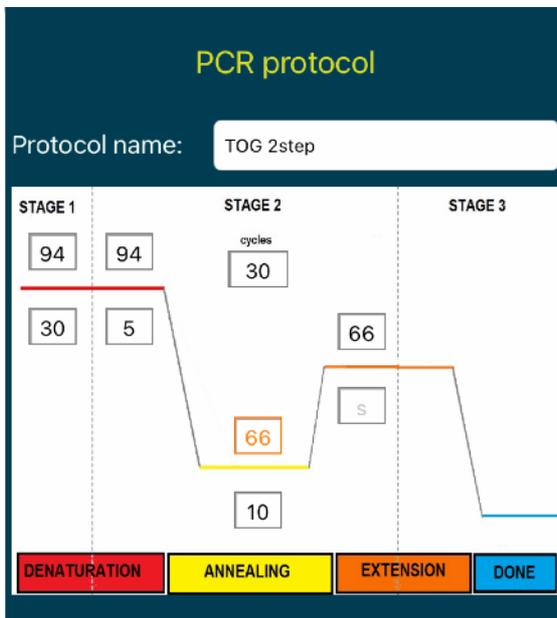
## Programmare le Fasi di Annealing e Estensione



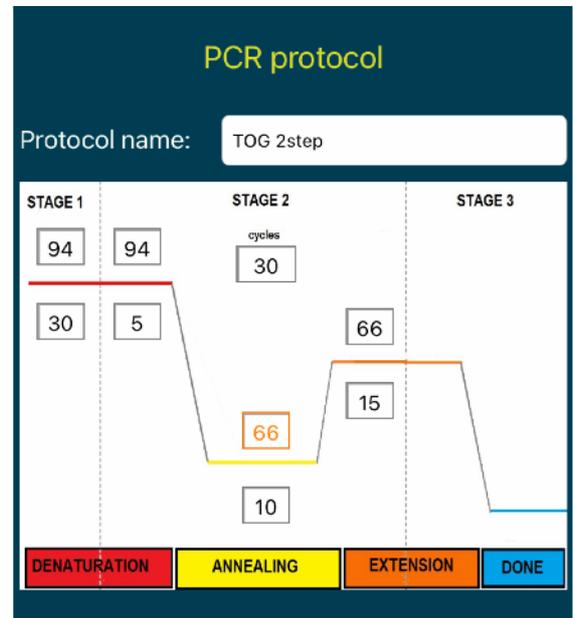
**Fase 1:** Impostare la Temperatura di Annealing a 66°C. Ignora il messaggio che suggerisce come intervallo di Temperatura tipico dell'Annealing tra i 45-65°C e passa alla fase successiva



**Fase 2:** Inserire "10" per la durata della Temperatura di Annealing

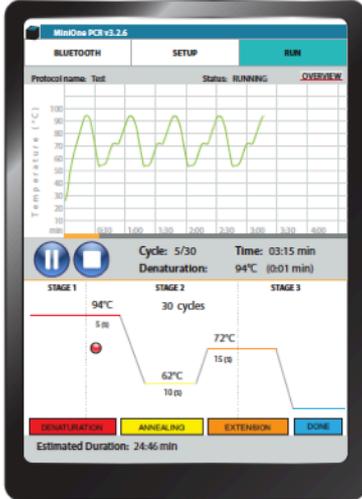


**Fase 3:** Impostare la Temperatura di Estensione a 66°C. Se compare un messaggio sull'intervallo di temperatura ideale, ignora il messaggio e passa alla fase successiva



**Fase 4:** Inserire "15" per la durata della Temperatura di Estensione

- 5** Usa l'applicazione mobile MiniOne® PCR per monitorare il progresso della reazione.

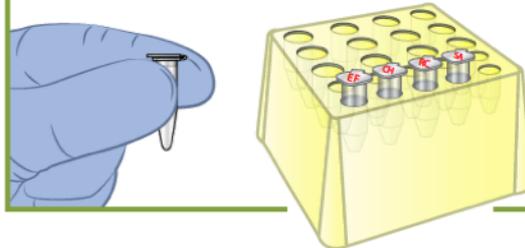


**6**



Quando il protocollo è completo, rimuovere il campione dal sistema MiniOne® PCR. Se necessario, rietichettare la provetta.

- 7** Dai il tuo campione di DNA amplificato al tuo insegnante per conservarlo fino alla prossima lezione.



## Domande di analisi

1. Qual è lo scopo della PCR? Descrivi tre situazioni in cui gli scienziati potrebbero usare la PCR.
2. Qual è il reagente che rende la reazione PCR specifica per il gene TAS2R38? Descrivi la funzione di questo reagente PCR.
3. Perché è necessaria la fase di PCR? Perché non possiamo passare direttamente dall'estrazione del DNA all'analisi?
4. A volte durante la PCR, i primer forward e reverse si attaccano l'un l'altro formando un "primer-dimero" che viene poi copiato nei cicli successivi e può apparire come una banda extra sul tuo gel. È più o meno probabile che il primer-dimero si verifichi in una reazione PCR che usa primer lunghi? Perché?

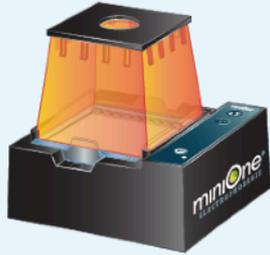
## Giorno 3: Digestione della restrizione ed elettroforesi su gel

Oggi farai una digestione di restrizione del tuo DNA amplificato e analizzerai i prodotti con l'elettroforesi su un gel di Agarosio. Eseguirai i prodotti PCR digeriti e non digeriti uno accanto all'altro sul gel. Lo schema delle bande nel campione digerito indicherà il tuo genotipo per il gene PTC taster. Pensa attentamente a quale schema di bande ti aspetteresti di vedere per ogni genotipo. Eseguire il prodotto PCR non digerito confermerà il successo della tua reazione PCR, mostrerà quali bande sono artefatti PCR, e fornirà un punto di riferimento visivo per la dimensione del prodotto PCR 221 bp.

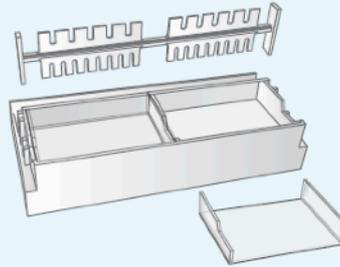


## Giorno 3: Digestione della restrizione ed elettroforesi su gel

Ciascun gruppo di studenti e postazioni di lavoro



Sistema di Elettroforesi  
MiniOne



Sistema di colata  
MiniOne



Tampone 1X TBE  
(135 mL)



Coppa GreenGel™ al  
2% di Agarosio, TBE



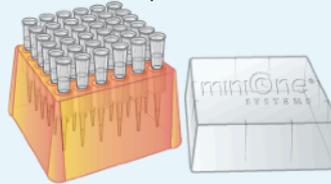
Contenitore per rifiuti  
per puntali di pipette e  
provette



12 µL MiniOne® DNA  
Marker



Micropipetta  
MiniOne 2-20 µL



2-200 µL Puntali  
universali per  
micropipette



1 provetta PCR per  
studente



25 µL di tampone  
di diluizione  
enzimato



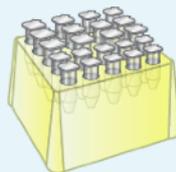
25 µL di enzima  
di restrizione  
HaeIII Diluito



30 µL Colorante di  
caricamento del  
campione (5X)



Marcatore  
permanente a punta  
fine



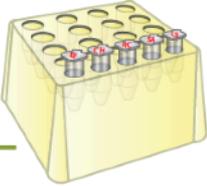
Portaprovette PCR



Portaprovette per  
microcentrifuga

## Giorno 3 Procedura sperimentale

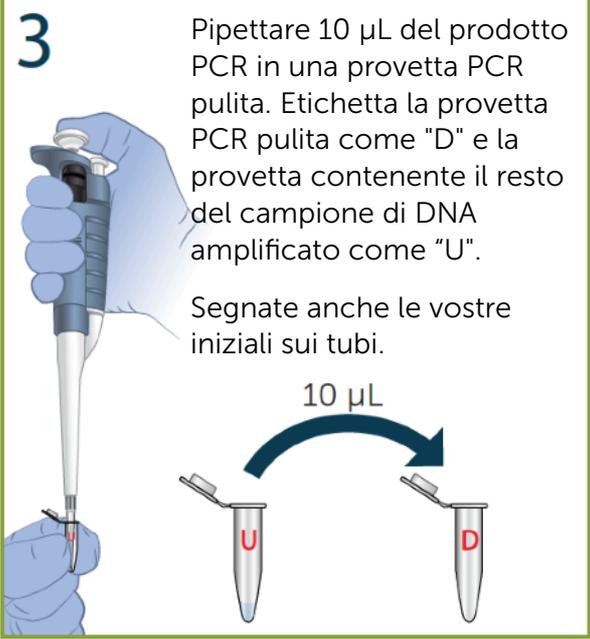
**1** Recupera il tuo campione di DNA amplificato.



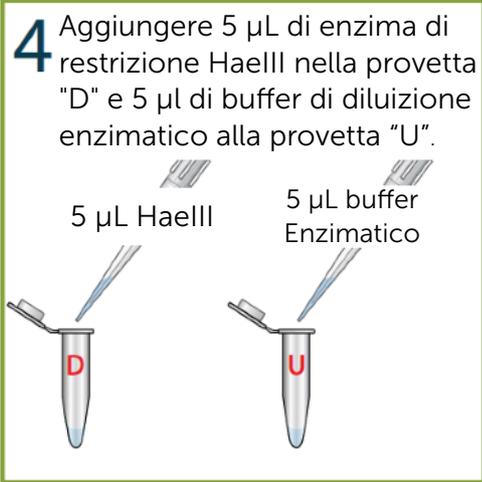
**2** Girare giù brevemente



**3** Pipettare 10  $\mu$ L del prodotto PCR in una provetta PCR pulita. Etichetta la provetta PCR pulita come "D" e la provetta contenente il resto del campione di DNA amplificato come "U".  
Segnate anche le vostre iniziali sui tubi.



**4** Aggiungere 5  $\mu$ L di enzima di restrizione HaeIII nella provetta "D" e 5  $\mu$ L di buffer di diluizione enzimatico alla provetta "U".



**5** Tappare bene le provette e scuoterle per mescolare i reagenti  
Non schiacciare le pareti sottili.  
15 sec.  
8000 RPM



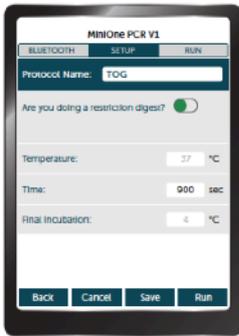
Assicurarsi che la centrifuga sia bilanciata

## Giorno 3 Procedura sperimentale (continua)

**6** Mettere le provette PCR nel Sistema MiniOne® PCR



Incubare il digest di restrizione a 37°C per 900 secondi (15 minuti) usando la modalità a temperatura costante. Inserire 4°C per la temperatura finale di incubazione.



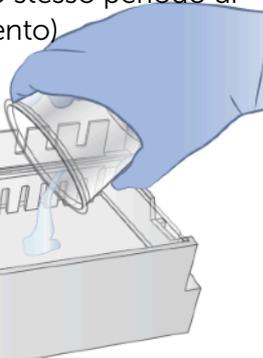
**Mentre aspetti il tuo digest, prepara il gel di Agarosio MiniOne**

**7** Sfiatare la tazza di gel staccandola leggermente prima del microonde



Preparare il gel di Agarosio al 2% usando il MiniOne® Casting System (microonde per 20 secondi, non più di 5 tazze nello stesso periodo di riscaldamento)

Usa il lato a 9 pozzetti del pettine



Lasciar solidificare il gel per 10-15 minuti.

**8** Quando è completa l'incubazione, rimuovere il campione



Se stai facendo l'elettroforesi in una sessione di laboratorio separata, dai i tuoi digest al tuo insegnante per conservarli.

## Giorno 3 Procedura sperimentale (continua)

**9** Aggiungere 3  $\mu$ L di LD ad ogni provetta contenente il tuo "D" o "U"

3  $\mu$ L di colorante di Caricamento



**10** Tappare bene le provette e scuoterle per mescolare i reagenti

15 sec.  
8000 RPM

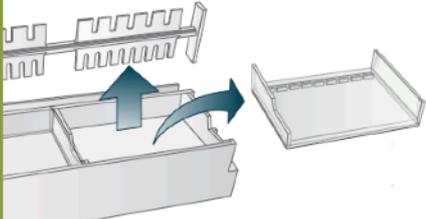
Assicurarsi che la centrifuga sia bilanciata



**11** Rimuovere con cura il pettine dal gel.

Rimuovere il vassoio del gel con il gel solidificato.

Pulire l'Agarosio in eccesso dal fondo del vassoio



**12** Collegare l'alimentatore al retro del carrello per elettroforesi MiniOne. Collegare l'alimentatore alla parete.

Mettere il gel e il vassoio del gel nella vasca.

Assicurarsi che i pozzetti siano allineati con i segni sulla piattaforma di visualizzazione nera sul lato negativo.



**13** Versare 135 mL di buffer di corsa TBE in un lato del serbatoio, permettendo al liquido di spingere fuori l'aria presente sotto al vassoio del gel, creando un fondo uniforme senza bolle d'aria intrappolate per l'imaging chiaro dei risultati.

Versare il tampone rimanente nell'altro lato del serbatoio.



## Giorno 3 Procedura sperimentale (continua)

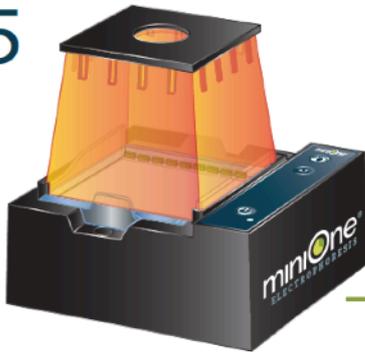
- 14** Accendere la luce blu a bassa intensità
- Caricare 10  $\mu$ L del marcatore di DNA MiniOne® in un pozzetto per gel
- Caricare 10  $\mu$ L del vostro campione non digerito "U" e 10  $\mu$ L del vostro campione digerito "D" in due pozzetti adiacenti
- Usa la tabella 5 per tenere traccia di quale membro del gruppo carica il suo campione



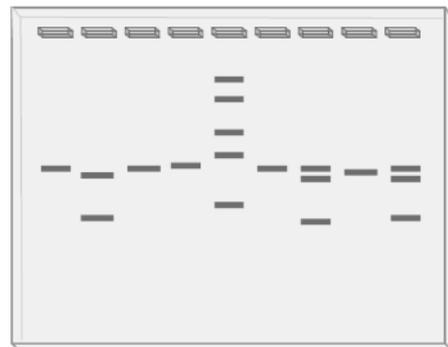
Tabella 5. Registrare il campione caricato in ogni corsia

Pozzetto	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Campioni									

- 15** Accendere la luce blu, posizionare il cappuccio della foto sull'unità di trasporto e premere il pulsante di accensione.
- Eseguire la corsa elettroforetica per 25 minuti o fino a quando le bande si sono separate chiaramente.



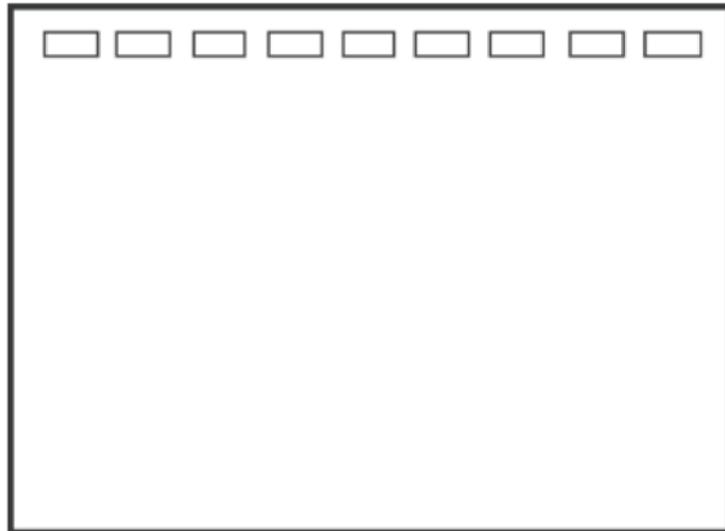
- 16** Alla fine della corsa, accendere la luce blu ad alta intensità
- Usa il telefono o la macchina fotografica per scattare una foto del gel
- Fai uno schizzo o incolla un'immagine del tuo gel sul foglio di lavoro dell'analisi del gel o sul quaderno di laboratorio



## Foglio di lavoro dell'analisi del gel

Indicazioni: Dopo aver completato la parte di elettroforesi su gel di A Taste of Genetics, registra un'immagine del tuo gel e disegna i risultati sul modello qui sotto.

Posto	Campione
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



## Domande sull'analisi post-laboratorio

1. Spiega come l'elettroforesi del gel viene utilizzata per separare i frammenti di DNA e creare un modello distinto di bande per ogni genotipo PTC.
2. Le dimensioni delle bande nel marcatore di peso molecolare MiniOne® sono 100, 300, 500, 1000 e 2000 bp. Stimare le dimensioni delle bande nelle corsie della PCR confrontando la corsia del marcatore di peso molecolare. Le tue stime sono coerenti con le dimensioni previste dal digest? Se no, cosa pensi che spieghi la differenza?
3. Tutti i campioni della tua squadra hanno prodotto un prodotto PCR? Se no, spiega cosa potrebbe essere andato storto.
4. Hai osservato altre bande sul gel oltre ai prodotti PCR attesi? Se sì, spiega cosa potrebbe aver causato le bande inaspettate?
5. Qual è il tuo genotipo TAS2R38 in base ai risultati della tua elettroforesi su gel? Corrisponde a quello che hai previsto in base alla tua capacità di assaggiare la carta PTC?

6. In base alla tua comprensione della genetica mendeliana, è possibile che due genitori che non possono entrambi assaggiare il PTC abbiano un figlio che può assaggiare il PTC?
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
7. Se un genitore è omozigote per la variante non-taster di TAS2R38 e l'altro genitore è eterozigote, qual è la probabilità che il loro prossimo figlio sia un taster?
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
8. Il PTC è un composto che non esiste in natura. Pensi che ci sia qualche vantaggio evolutivo associato all'avere l'allele taster? Potrebbe esserci un vantaggio nel non avere l'allele taster?
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
9. A parte la genetica, quali altre ragioni potrebbero spiegare perché una persona è in grado di gustare il PTC mentre un'altra no?
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
10. La maggior parte delle volte, i tre SNPs sul gene TAS2R38 sono ereditati insieme. Descrivi una situazione in cui un bambino potrebbe ereditare un insieme di SNPs dalla madre che è diverso dall'insieme di SNPs su uno dei cromosomi della madre.

## Appendice A - Glossario

Termine	Definizione
Allele	Una delle due o più forme distinte di un gene situato nella stessa posizione su cromosomi omologhi.
Buffer	Un sale aggiunto a una soluzione acquosa che aiuta a mantenere un pH costante. I tamponi sono essenziali nella PCR perché la funzione della DNA polimerasi è sensibile ai cambiamenti di pH.
Ciclo	Un ciclo si riferisce a un giro di denaturazione, ricottura e fasi di estensione della reazione PCR. Il numero di cicli necessari per una particolare reazione dipende dalla quantità di DNA con cui si inizia e dalla quantità di DNA che si sta cercando di produrre. Con un'alta concentrazione di partenza, 20-25 cicli sono sufficienti per produrre abbastanza DNA da visualizzare su un gel. Quando la concentrazione di partenza è bassa o sono necessarie grandi quantità di prodotto, possono essere utilizzati 35-40 cicli.
Ciclatore termico	Chiamato anche macchina PCR, un termociclatore è uno strumento che cambia automaticamente la temperatura della reazione PCR secondo un programma impostato dall'utente. Riscalda e raffredda la reazione tra le temperature di denaturazione, ricottura ed estensione per un numero specifico di cicli.
Denaturazione	La denaturazione utilizza l'alta temperatura per rompere i legami tra le basi su filamenti opposti. Il DNA a doppio filamento si divide in DNA a filamento singolo esponendo le basi in modo che possano essere copiate. Le impostazioni tipiche sono 90-98°C per 5-30 secondi per ciclo.
Denaturazione iniziale	Quando si copia un pezzo di DNA genomico, si usa spesso una fase iniziale di denaturazione per assicurarsi che i lunghi filamenti di DNA siano completamente separati e liberati dalle proteine legate prima che inizi il ciclo termico. Le impostazioni tipiche sono 90-96°C per 30 secondi-10 minuti.
dNTPs	Nucleotidi, i mattoni molecolari del DNA.
Enzima	Un enzima è un catalizzatore biologico che accelera una reazione chimica senza cambiare i prodotti o essere consumato dalla reazione. La maggior parte degli enzimi sono proteine e controllano una vasta gamma di reazioni nelle cellule, dalla copia del DNA all'estrazione di energia dal cibo.
Estensione	A circa 70°C la polimerasi si mette al lavoro e inizia ad aggiungere nucleotidi (dNTP) all'estremità 3' dei primer ricotti, copiando il filamento complementare. Le impostazioni tipiche sono 72°C per 5 secondi - 5 minuti per ciclo.
Estensione finale	In alcuni protocolli viene utilizzato un ulteriore passaggio di estensione. Questo assicura che la polimerasi possa aggiungere le coppie di basi finali alla fine dei filamenti, il che è necessario in alcune applicazioni. La durata tipica è di 2-10 minuti.
Enzima di restrizione	Un enzima prodotto dai batteri che può tagliare un filamento di DNA in una sequenza specifica.
Fenotipo	L'insieme delle caratteristiche osservabili di un organismo individuale derivanti dal genotipo e dall'ambiente.
Genotipo	La composizione genetica di un organismo individuale.
Monomero	Una molecola che può essere legata con altre molecole simili per formare un polimero.

## Appendice A - Glossario (continua)

<b>Termine</b>	<b>Definizione</b>
Polimero	Una molecola che consiste di molte unità simili legate insieme.
Primers	Brevi pezzi di DNA con sequenze complementari alle sequenze che fiancheggiano la regione da copiare. I primer sono progettati specificamente per ogni reazione PCR tenendo conto di molte variabili, tra cui la lunghezza, il contenuto nucleotidico e le caratteristiche strutturali. Molti strumenti informatici sono disponibili per assistere nella progettazione dei primer.
Sito di riconoscimento	La specifica sequenza di DNA che un enzima di restrizione riconosce e a cui si lega.
Polimorfismo a singolo nucleotide (SNP)	Un tipo di variazione genetica in cui la sequenza del genoma di due individui differisce in una singola posizione nucleotidica. Gli SNP sono la forma più comune di variazione genetica negli esseri umani, e si verificano in media una volta ogni 300 coppie di basi.
Ricottura	Quando la temperatura di una reazione PCR viene abbassata, brevi pezzi di DNA, chiamati primer, si legano a specifiche sequenze all'interno del genoma mirando a questa regione da copiare. La temperatura di ricottura è specifica per i primer usati nella reazione - le impostazioni tipiche sono 45-65°C per 5-30 secondi per ciclo.
Template	DNA contenente la sequenza che sarà copiata in una reazione PCR. Può essere un breve frammento o un intero genoma.

## Appendice B - Reazione a catena della polimerasi

La reazione a catena della polimerasi (PCR) affronta due grandi sfide in biologia molecolare: produrre quantità utilizzabili di DNA per l'analisi e isolare una regione specifica del genoma. In primo luogo, il DNA che gli scienziati vogliono analizzare è spesso raccolto in quantità estremamente piccole (per esempio, una singola goccia di sangue da una scena del crimine). Per avere quantità utilizzabili di DNA dobbiamo fare molte copie usando il DNA originale come modello. In secondo luogo, tra tutto il genoma dobbiamo trovare solo la parte che vogliamo analizzare, che sia un gene che causa una malattia o una sequenza che può aiutare a identificare una specie. Questo non è un problema da poco, dato che il genoma umano è lungo più di 3 miliardi di paia di basi (bp) e spesso siamo interessati a regioni lunghe meno di 300 bp.

### La storia della PCR

Come per molte idee nella biotecnologia, la natura ci fornisce la maggior parte degli strumenti di cui abbiamo bisogno. Ogni volta che una cellula si divide fa due repliche del suo intero genoma con l'aiuto di enzimi specializzati. Il fenomeno dell'accoppiamento complementare delle basi dovrebbe darvi un'idea di come una regione specifica possa essere presa di mira. Alla fine degli anni '70 Frederick Sanger sviluppò un metodo per copiare il DNA in vitro che utilizzava brevi pezzi di DNA, chiamati primer, per avviare la replicazione da parte di una DNA polimerasi, simile ai primer dell'RNA nel tuo modello di replicazione del DNA cellulare. Un primer artificiale usato nel metodo Sanger ha una sequenza che gli permette di legarsi ad una sola posizione nella sequenza del DNA bersaglio.

Usando solo un primer del DNA, il metodo Sanger può produrre solo una copia del bersaglio alla volta. Nel 1983 Kary Mullis propose una modifica a questo metodo in cui un secondo primer viene usato per iniziare la replicazione usando la prima copia come modello. Ricordiamo che il DNA ha una struttura antiparallela dove un filamento corre in direzione opposta rispetto al secondo filamento. Per utilizzare la prima copia come bersaglio per la replicazione, il secondo primer aggiunto da Mullis doveva avviare la replicazione nella direzione opposta, quindi un primer è chiamato forward primer e l'altro è chiamato reverse. Con la sequenza originale e la sua copia che servono come modelli, vengono prodotte due copie invece di una. Inoltre, queste due copie possono essere usate ciascuna come template in un secondo ciclo di copiatura, che produce quattro copie. Dopo ogni giro, o ciclo, il numero di copie è raddoppiato. Nel corso di più cicli, si generano miliardi di copie della sequenza di DNA tra i due primer. Questo metodo è chiamato reazione a catena della polimerasi (PCR) - polimerasi per via dell'enzima che viene usato per copiare il DNA e reazione a catena perché i prodotti di un ciclo servono come modelli per il prossimo ciclo di copiatura. Questa tecnologia rapida ed efficiente per generare quantità utilizzabili di DNA ha fatto vincere a Mullis il premio Nobel per la chimica. La prima applicazione della PCR fu un test per l'anemia falciforme.

### Come funziona la PCR

Invece di cercare di ricreare l'intricato macchinario biochimico della cellula in una provetta, gli scienziati si affidano al calore per controllare le varie fasi della reazione PCR. Affinché il DNA venga copiato, le basi nucleotidiche devono essere esposte, il che significa che il DNA a doppio filamento deve essere separato in filamenti singoli. Proprio come il calore applicato a un cubetto di ghiaccio indebolisce i legami idrogeno tra le molecole d'acqua e causa una transizione di fase verso l'acqua liquida, il calore applicato al DNA a doppio filamento indebolisce i legami idrogeno tra le basi causando la separazione dei filamenti in DNA a filamento singolo. Come per il ghiaccio, questo processo è talvolta chiamato fusione, ma è

comunemente indicato come denaturazione. In un ciclo PCR, la denaturazione viene eseguita a 90-98°C per 5-30 secondi. Questa temperatura è appena sotto il punto di ebollizione dell'acqua.

Una volta che il DNA modello è stato separato in filamenti singoli, la temperatura viene abbassata per incoraggiare i primer a legarsi alle loro sequenze bersaglio. Proprio come nell'analogia con l'acqua, la temperatura più bassa favorisce la formazione di legami idrogeno tra le molecole, in questo caso il primer e il DNA modello. Questo passaggio, chiamato annealing, è tipicamente tra 45 e 65°C per 5-30 secondi. La temperatura ideale e la durata della fase di annealing dipendono dalle sequenze dei primer utilizzati. Deve essere abbastanza bassa da permettere la formazione di legami idrogeno tra il primer e la sequenza complementare specifica, ma non così bassa da provocare un legame aspecifico o casuale tra il primer e il modello.

La DNA polimerasi si lega al complesso primer-templato e comincia ad aggiungere nucleotidi (dNTP) all'estremità 3' del primer. Questo passo, chiamato estensione, si traduce in una nuova copia attaccata al templato come DNA a doppio filamento. La durata della fase di estensione dipende dalla lunghezza del segmento di DNA da copiare e può essere ovunque da 5 secondi a 5 minuti.

A questo punto potresti aver notato un problema - la DNA polimerasi, su cui si basa l'intero processo PCR, è un enzima proteico che ha bisogno di una struttura tridimensionale molto specifica per copiare il DNA. Prima di arrivare alla fase di estensione, l'intera miscela PCR, compresa la polimerasi, è già passata attraverso la fase di denaturazione in cui la reazione è stata riscaldata quasi fino all'ebollizione. Chiunque abbia rotto un uovo in una padella saprà cosa fa il calore elevato alle proteine!

Nei primi giorni della PCR, la polimerasi fresca veniva aggiunta alla provetta di reazione ad ogni ciclo per sostituire la polimerasi che era stata distrutta dalla fase di denaturazione. Dover aprire la provetta e aggiungere nuovo enzima fino a 30 cicli era costoso, inefficiente e aumentava le possibilità di contaminare la reazione. L'innovazione che avrebbe rimosso questi ostacoli venne da una fonte insolita: il Parco Nazionale di Yellowstone.

Negli anni '70, gli scienziati avevano isolato una specie di batterio chiamato *Thermus aquaticus* da una sorgente calda a Yellowstone. *T. aquaticus* prospera a 75-80°C e può sopravvivere a temperature molto più alte. I suoi enzimi sono similmente tolleranti al calore. L'*E. coli*, la fonte originale della polimerasi usata nella PCR, prospera a 37,5°C, la stessa temperatura dell'intestino dei mammiferi.

Poiché la biochimica del DNA è simile in tutto l'albero della vita, la polimerasi di *T. aquaticus* (chiamata Taq Polymerase) può sostituire la polimerasi di *E. coli* nella PCR, con la modifica che la fase di estensione viene eseguita a 70-75°C.

Questa innovazione ha portato la PCR a diventare lo strumento onnipresente, economico ed efficiente che è oggi. Le reazioni possono essere impostate una volta, sigillate all'interno di una provetta e messe in un termociclatore automatico. Il termociclatore (o macchina PCR) è uno strumento specializzato che cambia accuratamente e rapidamente la temperatura della provetta tra denaturazione, ricottura ed estensione. Dopo 20-40 cicli di queste tre temperature, si possono produrre miliardi di copie del prodotto DNA desiderato. Il DNA amplificato può essere analizzato con l'elettroforesi su gel alla fine dell'esperimento o rilevato mentre si sta formando usando attrezzature più avanzate.

## Appendice C: Elettroforesi su gel

L'elettroforesi su gel è una tecnica usata in molte aree della scienza per analizzare i componenti di miscele chimiche complesse. Miscele di DNA, RNA, proteine o coloranti possono essere separate nei loro singoli componenti in base alla dimensione molecolare e alla carica elettrica usando una matrice di separazione in un campo elettrico.

Il gel usato nell'elettroforesi è un groviglio di polimeri che forma una matrice tridimensionale con pori pieni d'acqua attraverso i quali le molecole migrano. Una maggiore densità di polimeri crea pori più piccoli. Come i fori di un setaccio o di un colino, la dimensione dei pori deve essere adeguata alle molecole da separare. I gel possono essere fatti con diverse sostanze a seconda dell'applicazione. Uno dei materiali più comunemente usati ed efficaci è l'Agarosio, un polimero estratto dalle alghe. I gel di Agarosio sono formati (o colati) versando l'Agarosio fuso (sciolto) in un vassoio dove si solidifica nella forma desiderata mentre si raffredda. Un pettine viene posizionato mentre l'Agarosio è fuso e poi rimosso dopo che si è solidificato per creare dei pozzetti dove vengono caricati i campioni.

Dopo che il gel si solidifica, viene posto in un buffer elettricamente conduttivo tra elettrodi paralleli positivi ((+) anodo) e negativi ((-) catodo)

Una tensione viene applicata tra gli elettrodi, creando un campo elettrico uniforme all'interno del gel. Le molecole nei pozzetti iniziano a muoversi sotto l'influenza del campo elettrico: le molecole caricate positivamente migrano verso il (-) catodo e le molecole caricate negativamente migrano verso l'anodo (+).

La velocità del movimento di una molecola in un campo elettrico è determinata dalla forza della sua carica elettrica rispetto al suo peso molecolare. Questo è quantificato come il rapporto carica/massa. La velocità di movimento all'interno di un gel è anche influenzata dalla dimensione della molecola rispetto ai pori del gel. I polimeri nel gel sono come una corsa a ostacoli: le molecole più piccole si muovono facilmente attraverso i pori, viaggiando più velocemente e più lontano delle molecole grandi e ingombranti. Tuttavia, una grande molecola può muoversi più velocemente attraverso un gel rispetto a una molecola più piccola quando la forza della sua carica rispetto alla sua massa è significativamente più alta. Anche la forma può influenzare il modo in cui una molecola si muove attraverso il gel. Le molecole lunghe come spaghetti si muoveranno più lentamente delle molecole compatte, che scivolano facilmente attraverso i pori. Le molecole della stessa dimensione, forma e carica si muoveranno insieme e formeranno una banda distinta. Se nel campione sono presenti più tipi o dimensioni di molecole, queste si separeranno l'una dall'altra e ciascuna formerà una banda distinta.

## Appendice D - Letture consigliate

**Biologia di Bozeman:** Video in cui Paul Anderson spiega il digest di restrizione, l'elettroforesi su gel e la PCR.

<http://www.bozemanscience.com/molecule-biology/>

**Caricamento del campione per elettroforesi del DNA:** Video veloce per mostrare come caricare un gel per elettroforesi orizzontale di DNA. Mostra la tecnica corretta e alcuni errori comuni.

<https://www.youtube.com/watch?v=tTj8p05jAFM>

**PBS Learning Media :** Questo sito supporta diversi video che dettagliano le tecniche e l'importanza della biotecnologia.

[https://kcts9.pbslearningmedia.org/collection/biot/?topic\\_id=354](https://kcts9.pbslearningmedia.org/collection/biot/?topic_id=354)

**Imparare Genetica:** Simulazione virtuale del laboratorio di estrazione del DNA

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>

**Imparare Genetica:** Molteplici attività interattive per imparare di più sull'ereditarietà e la genetica molecolare

<http://learn.genetics.utah.edu/content/basics/>

**Gioca a DNA -** Timeline di eventi importanti nella storia del DNA

[http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna\\_double\\_helix/index.html](http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna_double_helix/index.html)

**DNAi :** Cronologia degli eventi più importanti nella storia del DNA

<http://www.dnai.org/timeline/index.html>

**Canzone del DNA:** *They Might Be Giants*. Canta la canzone del DNA; circa la lunghezza giusta per suonare mentre gli studenti stanno agitando la soluzione salina per il protocollo di estrazione del DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=ZK6YP1Smbxk>



Designed for Embi Tec by Science Lab Studios, Inc.



 [theminione.eu](http://theminione.eu)

 +39 02 359 80841  [info@theminione.eu](mailto:info@theminione.eu)

FastTag, GreenGel e PrepOne sono marchi di Embi Tec. GelGreen è un marchio di Biotium.  
MiniOne è un marchio registrato di C.C. IMEX. Brevetti in corso.