

## Esperienza 10: la PCR

La tecnica della polimerizzazione a catena (in inglese polymerase chain reaction) o PCR, permette di amplificare milioni di volte un unico frammento di DNA. Questo metodo è diventato uno strumento prezioso non solo per la ricerca in biologia molecolare, ma anche per la diagnostica medica, la determinazione di microorganismi o la criminologia. L'invenzione della PCR risale agli anni 80 ed è stata ideata da Kary Mullis. Egli ottenne il premio Nobel della chimica nel 1993. La scoperta della DNA polimerasi termoresistente (la Taq polimerasi per esempio) ha facilitato l'utilizzo della PCR e ha permesso la sua automatizzazione. Questa DNA polimerasi è stata isolata dai batteri (*Thermus aquaticus*) che vivono nelle sorgenti di acqua calda.

**Soggetti:** la PCR, la struttura del genoma umano, il genotipaggio, la criminologia, il DNA, l'elettroforesi.

### La PCR

Una reazione di PCR necessita di:

- DNA da amplificare (nominato DNA modello)
- primers
- desossinucleotidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DNA polimerasi termoresistente (la Taq per esempio)
- magnesio ( $Mg^{++}$ ) indispensabile al funzionamento della DNA polimerasi

Questi 5 elementi sono mescolati in un tubo e sottoposti a diversi cicli di temperature.

un ciclo di PCR

Prima tappa: **la denaturazione** (94°C)

Il DNA modello è scaldato a 94°C. I due filamenti del DNA si separano. Si parla di denaturazione del DNA.

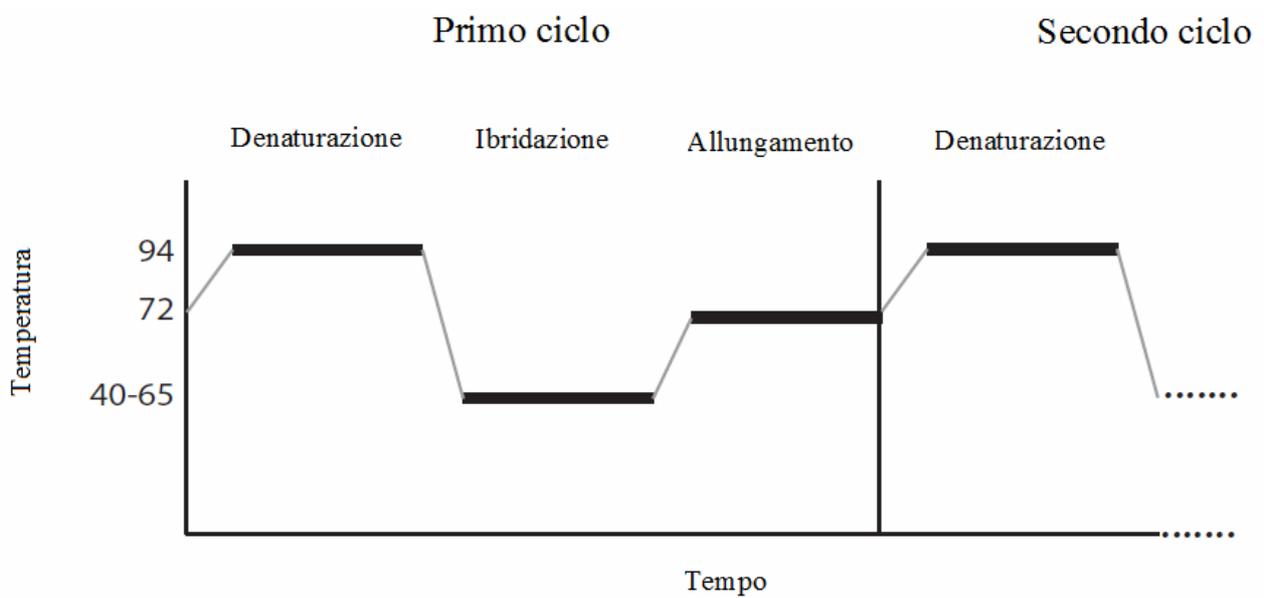
Seconda tappa: **l'ibridazione** (40-65°C).

Diminuendo la temperatura, i primers si appaiano (s'ibridano) alle sequenze bersaglio sul DNA grazie alla complementarità.

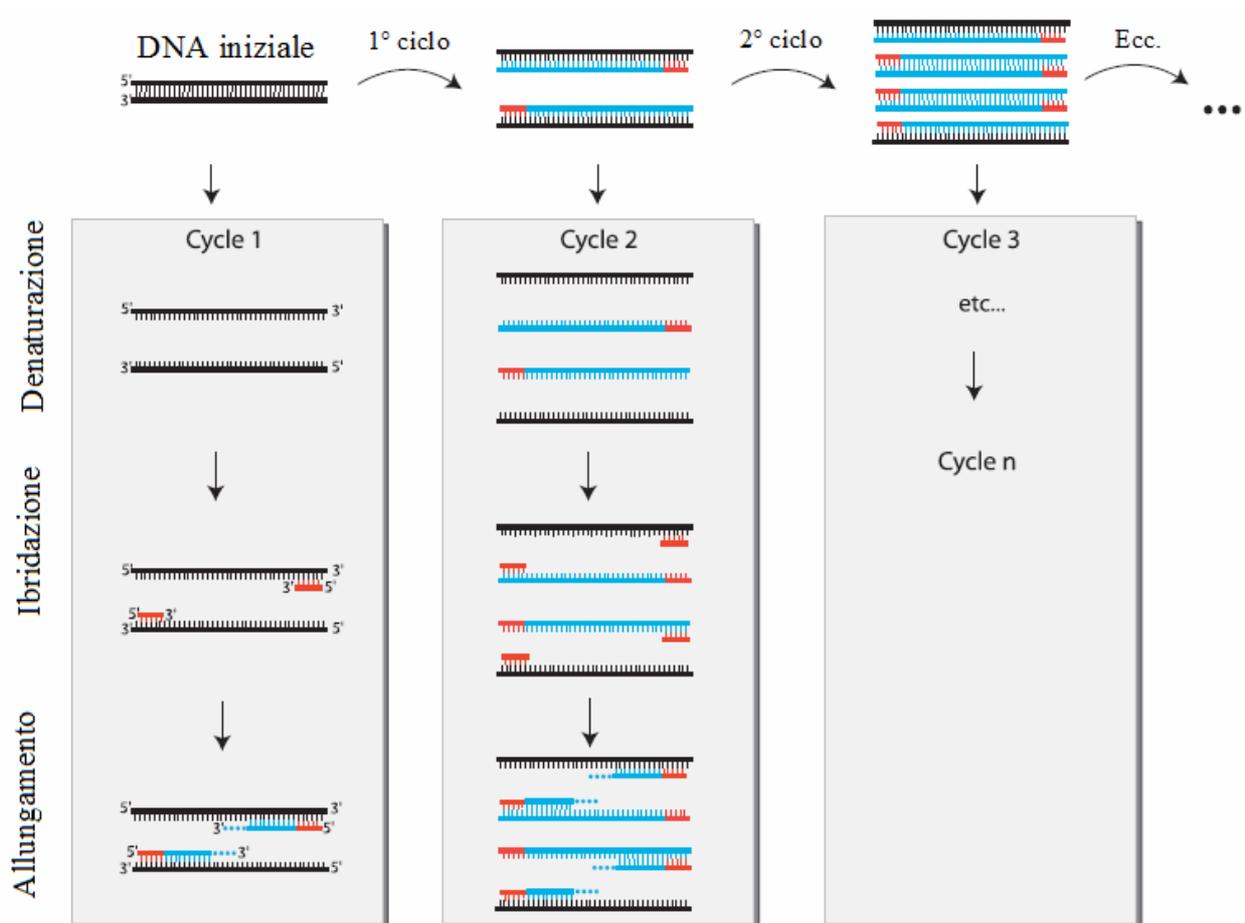
Terza tappa: **l'allungamento** (72°C).

A questa temperatura, la Taq sintetizza i filamenti di DNA complementari aggiungendo i desossinucleotidi trifosfati dopo i primers. Il tempo di allungamento dipende dalla lunghezza del frammento da amplificare e dalla velocità della polimerizzazione dell'enzima (la Taq aggiunge circa 1000 nucleotidi al minuto).

Schema dei cicli della PCR:



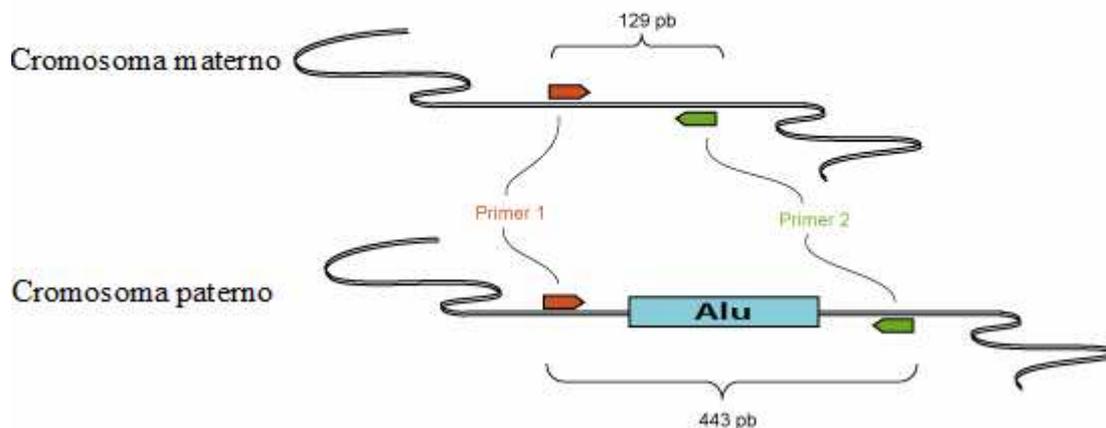
Schema di amplificazione della PCR:



**Le sequenze Alu:** il DNA umano è costituito da numerose sequenze ripetute rappresentanti più del 50% del genoma. Le sequenze Alu fanno parte degli elementi ripetuti più abbondanti. Si tratta di corte sequenze di circa 300 pb che sono state mobilizzate nei primati circa 65 milioni d'anni. Il nome di queste sequenze viene dal fatto che esse possiedono un sito di restrizione per l'enzima AluI. La dispersione delle sequenze Alu nel genoma si effettua utilizzando un intermediario RNA grazie ad un processo chiamato retrotrasposizione. Questi elementi Alu contribuiscono all'evoluzione del genoma e alla sua architettura, ma possono anche essere la causa di alcune malattie genetiche. Le sequenze Alu continuano a disperdersi a causa di un'inserzione tutte le 200 nascite.

Alcune sequenze Alu si sono inserite recentemente (circa 1 milione d'anni fa) e non si trovano in tutti gli individui. Questi polimorfismi possono essere utilizzati per lo studio delle popolazioni. Per esempio, il locus PV92 situato sul cromosoma 16 può, secondo le persone, contenere o no una sequenza Alu. Alcuni individui possiedono dunque un elemento Alu sui loro 2 cromosomi 16 (+/+), o su uno dei due (+/-) o su nessuno (-/-).

### Locus PV92 sul cromosoma 16



### Protocollo

1) Estrazione del DNA a partire dalle cellule epiteliali della bocca

- Mettere 500 µl di acqua in un tubo eppendorf.
- Strofinare abbondantemente l'interno delle guance con un tampone sterile per ottenere il massimo di cellule epiteliali.
- Immergere il tampone nel tubo contenente i 500 µl di acqua. Girare bene il tampone e strofinare contro le pareti del tubo.
- Scolare bene il tampone togliendolo dal tubo.
- Centrifugare il tubo 2 minuti ad una velocità massima per far cadere le cellule epiteliali.
- Aiutandosi con la P1000, togliere la fase superiore (surnatante) facendo attenzione a lasciare la fase inferiore (pellet di cellule) sul fondo del tubo. Attenzione a non aspirare il pellet di cellule.
- Aggiungere sul pellet 0.1 ml della soluzione di NaOH 200 mM e sospendere di nuovo vortexando o pipettando con la P1000.
- Chiudere il tubo e incubare a 95°C per 10 minuti in un blocco riscaldante.
- Vortexare brevemente.

- Aggiungere 0.1 ml di HCl 200 mM nel tubo.
- Aggiungere 0.1 ml di Tris-HCl (pH 8.5) 200 mM nel tubo.
- La preparazione di DNA è pronta e può essere stoccata in congelatore o utilizzata direttamente per il seguito dell'esperienza.

## 2) Amplificazione per PCR

- Preparare la miscela reattiva per la PCR poco prima dell'utilizzo. Questa miscela contiene le 2 x Taq mix (Taq polimerasi, tampone di polimerizzazione e tampone di caricamento rosso), i primers e l'acqua.

Per esempio per una classe di 16 allievi, si contano 16 reazioni più un controllo negativo e uno positivo, dunque 18 reazioni in totale. Per facilitare il pipettaggio e per avere abbastanza materiale in caso di errori, si prevede una miscela per 24 reazioni:

	1 reazione	24 reazioni
2 x Taq mix (rosso)	12,5 µl	300 µl
Primers mix	5 µl	120 µl
DMSO	1,25 µl	30 µl
H2O	1,25 µl	30 µl

- Questa miscela è preparata nel tubo eppendorf 1,5 ml poco prima dell'utilizzo. Mescolare pipettando su e giù delicatamente.
- Distribuire 20 µl della miscela nei piccoli tubi della PCR dopo averli marcati su un lato con le iniziali delle persone da testare.
- Aggiungere 5 µl della soluzione di DNA nel piccolo tubo. Chiudere il tubo.
- Nel piccolo tubo PCR destinato al controllo negativo, aggiungere 5 µl di acqua al posto del DNA. Chiudere il tubo.
- Nel piccolo tubo PCR destinato al controllo positivo, aggiungere 5 µl di DNA B2B. Chiudere il tubo.
- **Seguendo le istruzioni** della macchina PCR, mettere i tubi nella macchina e lanciare il programma PV92.
- Il programma dura circa 1 ora e mezza e comprende i cicli seguenti:

94°C, 5 minuti	} 40 cicli
94°C, 30 secondi	
54°C, 30 secondi	
72°C, 30 secondi	
72°C, 5 minuti	

- Alla fine dei cicli della PCR, i tubi possono essere tenuti in congelatore.
- Fermare la macchina PCR seguendo le indicazioni delle istruzioni.

## 3) Preparazione del gel d'agarosio

Il gel d'agarosio è una matrice per separare le molecole di DNA in base alla loro taglia in un campo elettrico. I frammenti piccoli migrano più velocemente di quelli grandi. La

concentrazione d'agarosio si sceglie in funzione della taglia dei frammenti da separare. Noi utilizzeremo un gel con 1,5% d'agarosio.

- Pesare 1,05 g d'agarosio e metterli in un Erlenmeyer da 250 ml.
- Aggiungere 70 ml di tampone di elettroforesi (TBE 1x).
- Far bollire nel forno a microonde, sulla placca riscaldante o sul becco bunsen. Fare attenzione a non far debordare l'agarosio quando bolle. L'agarosio fuso è completamente trasparente. Nel caso ci siano residui, rimettere la soluzione a riscaldare.
- Lasciare raffreddare il liquido a circa 60°C.
- Aggiungere 7 µl di SYBR-safe (intercalante che permetterà di visualizzare il DNA) e mescolare agitando l'Erlenmeyer.
- Versare l'agarosio nella vaschetta preparata con un pettine per formare i pozzetti (attenzione, se l'agarosio è troppo caldo, la vaschetta dell'elettroforesi si deforma!).

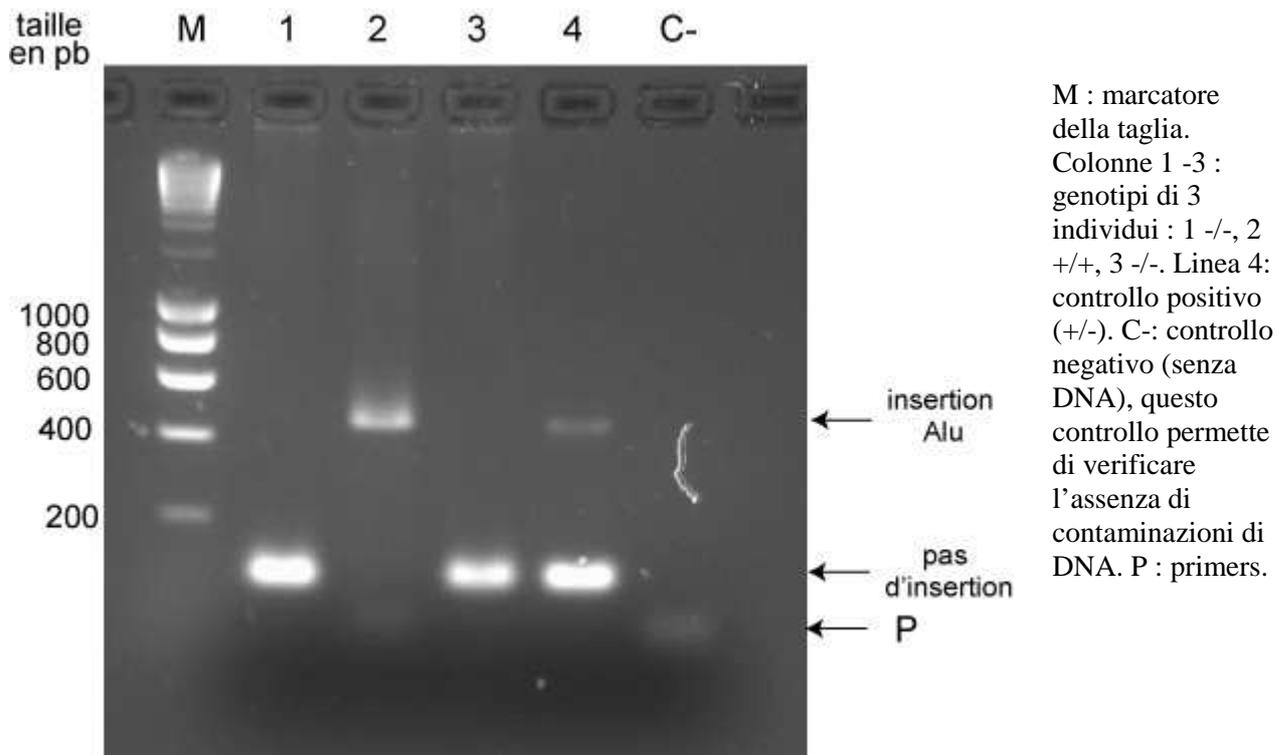
Le vaschette per l'elettroforesi possiedono dei piccoli blocchi in plexiglas per proteggere gli elettrodi. Spesso, le vaschette sono deformate e i blocchi non entrano più. Basta tagliare, dopo solidificazione del gel, una piccola lamella di agarosio in alto e in basso del gel per liberare gli elettrodi.

- Quando il gel si è raffreddato e solidificato, aggiungere il tampone dell'elettroforesi (TBE 1x) e togliere il pettine.

#### 4) Analisi dei genotipi sul gel

- Recuperare i tubi. Essi contengono già il tampone di caricamento (rosso) e sono dunque pronti per essere messi sul gel.
- Caricare il gel:
  - primo pozzetto: 5 µl di marcatore.
  - secondo pozzetto e seguenti: 20 µl del vostro campione
  - penultimo pozzetto: controllo negativo
  - ultimo pozzetto: controllo positivo
- Accendere il trasformatore e far migrare a 100V (amperaggio massimo).
- Quando il colorante rosso della migrazione arriva in fondo al gel, fermare il trasformatore.
- Lasciare raffreddare il gel un attimo, eventualmente mettendolo in frigo. L'intensità del segnale sarà così più forte.
- Prendere il gel e visualizzare le bande sotto la lampada blu.
- Fare una foto.

## 5) Risultati e discussione



- Osservare il vostro genotipo e quelli delle altre persone.
- Calcolare la frequenza di genotipi e di alleli nella classe.
- Calcolare il valore di **Hardy-Weinberg** per la classe.

### Materiale:

- Pipette P20 e punte sterili
- Pipette P200 e punte sterili
- Pipette P1000 e punte sterili
- Tamponi sterili
- Guanti
- Microcentrifuga
- Blocco riscaldante 95°C
- Tubi eppendorf da 1,5 ml
- Tubi PCR (0,2 ml)
- Macchina PCR
- Acqua sterile
- NaOH (200 mM)
- HCl (200 mM)
- Tris-HCl pH 8.5 (200 mM)
- 2 x Taq mix (comprende la Taq DNA polimerasi, i dNTPs e il tampone)
- Primers
- Agarosio
- Vaschetta per l'elettroforesi
- Tampone di migrazione TBE 1x
- SYBR-safe

- Lampada per la rilevazione del DNA (luce blu)
- Marcatore del peso molecolare
- DNA B2B (C+)

### Stoccaggio del materiale:

- Il 2 x Taq mix è stoccato in congelatore (-20°C), disgelato sul ghiaccio (o brevemente a temperatura ambiente), tenuto nella scatola refrigerante durante la manipolazione e rimesso a -20°C dopo l'utilizzo.
- Il SYBR-safe è stoccato in frigo (4°C). Bisogna toglierlo circa 30 minuti prima dell'utilizzo così la soluzione diventa ben solubile.
- Il marcatore di DNA, il DNA B2B (controllo positivo) e i primers sono stoccati in congelatore (-20°C), disgelati a temperatura ambiente e rimessi a -20°C dopo l'utilizzo.
- Il resto del materiale può essere tenuto a temperatura ambiente.

Il protocollo è ispirato alla referenza e al sito web seguenti:

- Recent Insertion of an Alu Element Within a Polymorphic Human-Specific Alu Insertion, David Comas, Stéphanie Plaza, Francesc Calafell, Antti Sajantila, and Jaume Bertranpetit. *Molecular Biology and Evolution* 18:85-88 (2001).
- <http://www.geneticorigins.org/pv92/aluframeset.htm>.