

Metodologie di microbiologia e genetica

Modulo Metodologie di Genetica

Prof.ssa Antonella Furini

ESERCITAZIONE N° B 1

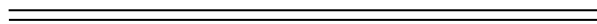
TRASFORMAZIONE GENETICA DI TABACCO

- L'*Agrobacterium tumefaciens* (ceppo EHA105) è stato trasformato con il plasmide pBI121 (p35S::GUS, vedi schema sotto). Una colonia di Agrobatterio trasformato è stata inoculata in 50 mL di YEB, il mezzo di coltura. Il plasmide pBI121 conferisce, in batterio, resistenza alla Kanamicina. Si aggiungono quindi i seguenti antibiotici:

- *Kanamicina* (50 mg/L): permette la selezione delle cellule di agrobatterio trasformate con il plasmide;
- *Rifampicina* (100 mg/L): permette la selezione delle cellule di Agrobatterio EHA105 da contaminazioni esterne.

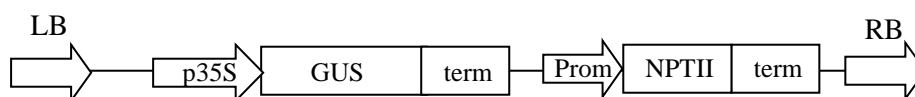
YEB:
5.0 g/L beef extract;
1.0 g/L yeast extract;
5.0 g/L tryptone;
5 mM MgSO₄;
5.0 g/L saccarosio;

- La coltura viene lasciata crescere a 28 °C per 36 ore in agitazione. Sarà pronta quando la sospensione avrà un OD_{600nm} = 0.5-1.0.
- La sospensione di agrobatterio viene centrifugata in tubi da 50 mL sterili. Il *pellet* viene prima lavato e poi risospeso in MS liquido + 30 g/L saccarosio.



- Il plasmide pBI121 (p35S::GUS): **nel T-DNA** di questo plasmide ci sono le cassette geniche per l'espressione:

- del gene GUS (gene *reporter*), sotto il controllo del promotore 35S (p35S);
- del gene *Neomycin phosphotransferase* (NPT-II) che conferisce resistenza alla Kanamicina (gene *marker*); questo gene si esprime in pianta (non in batterio!), quindi le piante trasformate saranno resistenti alla Kanamicina.



- Le piante di tabacco sono mantenute *in vitro* in MS (= terreno di coltura per le piante, Murashige and Skoog, 1962) senza ormoni. Le foglie saranno utilizzate come espunti e trasformate.

Preparazione dell'espianto

Le piante di tabacco vengono tolte dai vasi (*sotto cappa*) e le foglie vengono tagliate in piccoli quadrati (circa 1 cm²) e poste in piastre Petri.

- *Mantenere la sterilità* -

Infezione

La sospensione di agrobatterio viene versata sugli espianti e lasciata *per 20 minuti (a ridotta intensità luminosa)*. Successivamente gli espianti vengono tolti dalla sospensione, asciugati brevemente su carta assorbente e trasferiti su piastre con mezzo per la co-coltura.

Co-coltura

Gli espianti vengono mantenuti a 25 °C per *due giorni* in un mezzo di coltura solido (senza selezione) contenente:

- MS + 30 g/L saccarosio
- 1.0 mg/L di BAP (ormone: stimola lo sviluppo del germoglio)
- 0.1 mg/L di NAA (ormone: stimola lo sviluppo delle radici)
- 0.7% plant-agar

Induzione di rigenerazione

Dopo *due giorni di co-coltura*, gli espianti vengono trasferiti in un nuovo terreno di coltura:

- MS + 30 g/L saccarosio
- 1.0 mg/L di BAP
- 0.1 mg/L di NAA
- 100 mg/L di kanamicina (*per selezionare le cellule trasformate*)
- 500 mg/L di cefotaxime (*per eliminare l'agrobatterio*)
- 0.7% agar

Sui germogli rigenerati si effettuerà il *saggio istochimico* dell'attività del gene GUS (vedi *Esercitazione A2*).

Composizione MS:

MICRO ELEMENTS

	mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60

MACRO ELEMENTS

	mg/l
CaCl ₂	332.02
KH ₂ PO ₄	170.00
KNO ₃	1900.00
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650.00

VITAMINS

	mg/l
Glycine	2.00
myo-Inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10

Metodologie di microbiologia e genetica

Modulo Metodologie di Genetica

Prof.ssa Antonella Furini

ESERCITAZIONE N° B 2

SAGGIO ISTOCHIMICO DELL'ATTIVITÀ DEL GENE GUS

Il saggio istochimico GUS viene effettuato sui germogli rigenerati dagli espianti di tabacco trasformati durante l'esercitazione B 1. Se si osserva colorazione blu, il germoglio è trasformato.

Soluzione substrato:

Componente	Concentrazione
EDTA pH 8.0	1 mM
Na fosfato pH 7.0	100 mM
Triton X-100	1% v/v
K-ferrocianide	2 mM
K-ferricianide	2 mM
X-Gluc	500 µg/mL

Procedura:

- 1- togliere le foglie o i piccoli germogli dalle piastre Petri, staccandoli delicatamente dagli espianti, e porli in tubi Eppendorf (non necessariamente sterili);
- 2- aggiungere qualche mL di soluzione substrato;
- 3- trasferire a 37 °C ed incubare *overnight*;
- 4- osservare la comparsa delle aree colorate;
- 5- (per aumentare il contrasto di colorazione, trasferire le foglioline in una soluzione acquosa di etanolo al 70%).

Metodologie di microbiologia e genetica

Modulo Metodologie di Genetica

Prof.ssa Antonella Furini

ESERCITAZIONE N° B 3

ESTRAZIONE DNA GENOMICO da TABACCO

- macinare il tessuto in 100 μ L di DNA Extraction Buffer utilizzando il pestello, in un tubo tipo Eppendorf da 1.5 mL;
- incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
- centrifugare a 13'000g per 6 minuti a temperatura ambiente;
- trasferire il surnatante in una eppendorf da 1.5 mL pulita (non toccare il pellet!!);
- aggiungere 0.8 volumi di isopropanolo e mescolare il tubo più volte;
- incubare 10 minuti in ghiaccio;
- centrifugare a 13'000g per 10 minuti a temperatura ambiente;
- eliminare il surnatante;
- lavare il *pellet* aggiungendo 1 mL di etanolo 70%;
- centrifugare a 13'000g per 5 minuti a temperatura ambiente;
- eliminare il surnatante facendo attenzione a non perdere il pellet (=DNA!);
- lasciare asciugare per 5-10 minuti;
- risospendere il pellet in 50 μ L di acqua con RNAsi (se il pellet è molto consistente, risospendere in 100 μ L di acqua);
- mantenere in ghiaccio.
- caricare 5 μ L di DNA genomico su gel di agarosio (si caricherà anche un'aliquota del marcatore di quantità, 50 ng (λ DNA)).

Preparazione del campione (12 μ L finali)

5 μ L di DNA genomico;
? μ L di *Loading Buffer* 6X (blu);
? μ L di H₂O.

Far correre a 90 V fino a quando il fronte colorato supera i 4 cm dal margine superiore del gel (\pm 15 minuti).

DNA Extraction Solution 200 mM Tris pH 7.5
 250 mM NaCl
 25 mM EDTA pH 8.0
 1% SDS

Metodologie di microbiologia e genetica

Modulo Metodologie di Genetica

Prof.ssa Antonella Furini

ESERCITAZIONE N° B 4

Polymerase Chain Reaction (PCR) PER ANALISI DI PIANTE TRANSGENICHE

- UN GRUPPO PROCESSA ANCHE IL CAMPIONE *WILD TYPE* (= non trasformato)
- Se la concentrazione di DNA genomico (purificato da piante di tabacco trasformate e selezionate su terreno contenente Kanamicina) è **uguale o superiore** a 200 ng/μL, prelevare 2 μL di DNA, aggiungere 18 μL di acqua sterile e mescolare (= DNA templatato diluito); se la concentrazione di DNA genomico è tra 50 ng/μL e 100 ng/μL, prelevare 2 μL di DNA e aggiungere 8 μL di acqua sterile (= DNA templatato diluito);
- Allestire la reazione di PCR

DNA <i>templatato diluito</i>	1 μL
Buffer PCR [10X]	? μL
dNTPs [2 mM]	1 μL
primer Forward [5 μM]	2 μL
primer Reverse [5 μM]	2 μL
Taq DNA Pol. [2U/μL]	? μL (= 1U)
H ₂ O	a volume
<hr/>	
Tot 30 μL	

- Il buffer che utilizziamo è verde perché contiene già il *loading buffer* nella concentrazione adeguata, non è quindi necessario aggiungerne per caricare su gel.
- Impostare il termociclatore secondo il programma:

- <i>denaturazione iniziale</i>	10 min, 95° C
- PCR	$\left\{ \begin{array}{l} \textit{denaturazione} \\ \textit{annealing} \\ \textit{estensione} \end{array} \right. \begin{array}{l} 30 \text{ sec, } 95^\circ \text{ C} \\ 30 \text{ sec, } 55^\circ \text{ C} \\ 1 \text{ min, } 72^\circ \text{ C} \end{array} \right\} \times 30$
- <i>estensione finale</i>	3 min, 72° C

- Verificare il successo della reazione di PCR su gel di agarosio all'1% caricando:
 - a. 5 μL di marcatore di peso molecolare **1Kb**;
 - b. 10 μL del prodotto di PCR;