



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**PIANO NAZIONALE
LAUREE SCIENTIFICHE**



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

Docenti:

Prof. Laura Manca, manca@uniss.it;
Dr. Paolo Mereu, pmereu@uniss.it
Dr.ssa Monica Pirastru, pirastru@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

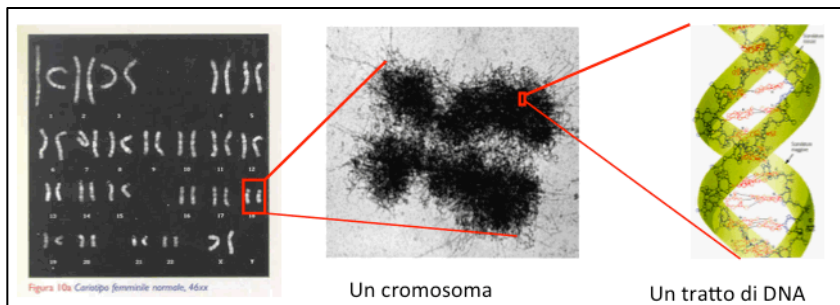
1.1 Le molecole biologiche: gli acidi nucleici

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 gli RNA.

La sigla DNA deriva da *Deoxyribo Nucleic Acid* (acido desossiribonucleico); è una complessa molecola che si trova nel nucleo di tutte le cellule e porta l'informazione per lo sviluppo degli organismi. Generalmente quando si parla di DNA si intende il DNA nucleare nonostante nelle cellule animali il DNA sia presente anche dentro i mitocondri.

La funzione del DNA è quella di contenere le informazioni necessarie alla produzione delle proteine che vengono trasmesse alle cellule figlie durante un complesso processo biochimico che prevede la trascrizione dell'informazione contenuta nel DNA in forma di triplette nucleotidiche e la traduzione di questo messaggio nella sintesi delle proteine (in forma di sequenze aminoacidiche).

- 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

Il 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)
- 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'.

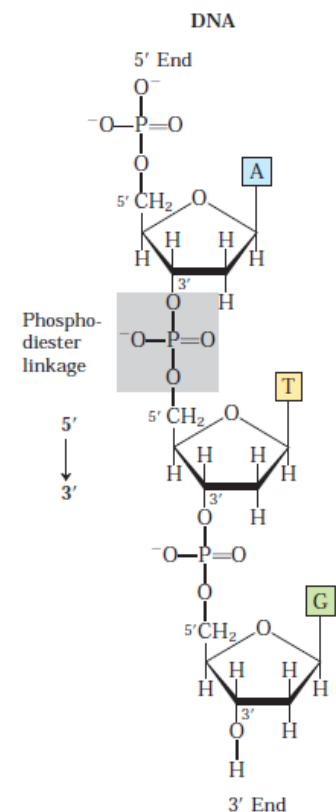
Gli scheletri zucchero fosfato si trovano all'esterno, le basi azotate all'interno. Le basi delle due catene sono unite tra loro mediante legami a idrogeno. Le **basi sono complementari** e il loro appaiamento è:

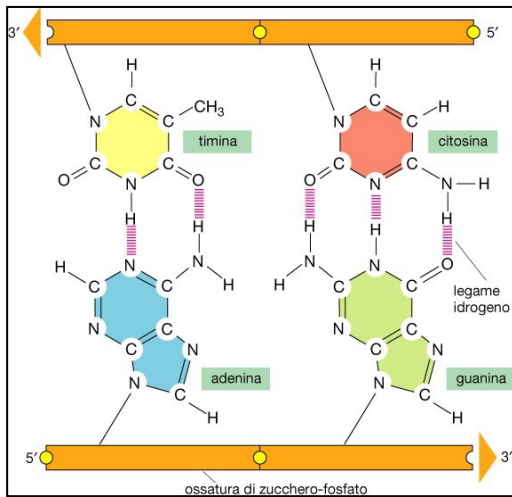
A = T Adenina - Timina

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.

E' possibile estrarre il DNA a partire da diversi tessuti: saliva, tampone buccale, sangue (sia tracce di sangue fresco che secco), capelli, urine, liquido seminale, mozziconi di sigaretta, chewing gum. Il campionamento può riguardare anche fazzoletti di carta, tazzine, sigarette ecc.





Di grande attualità è l'analisi del DNA antico (aDNA) che consiste nel recupero del materiale genetico da reperti fossili o museali. Le problematiche che comunemente si incontrano sono dovute allo stato di conservazione del DNA, talvolta danneggiato dalla esposizione prolungata ai diversi agenti atmosferici.

1.3 L'isolamento del DNA genomico

L'estrazione del DNA è un passaggio cruciale propedeutico ad analisi molecolari successive, quali l'amplificazione di un segmento genico mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), il clonaggio ed il sequenziamento nucleotidico, che consentono di caratterizzare un individuo da un punto di vista genetico, di identificare regioni genomiche (marcatori) potenzialmente correlate con l'insorgenza di patologie e rivelare rapporti di

parentela tra individui.

I sistemi di estrazione possono essere suddivisi in due categorie principali:

- metodi tradizionali, che prevedono l'utilizzo di solventi organici (Fenolo/Cloroformio) o di soluzioni saline molto concentrate (Salting-out);
- micro-metodi basati sull'impiego di kit commerciali, che permettono di isolare in modo rapido il DNA a partire da quantità molto piccole di tessuto. Il grande vantaggio che offre l'impiego di questi sistemi è la rapidità di analisi. Per contro, i metodi tradizionali garantiscono una miglior resa in termini di concentrazione del DNA e di efficienza nella rimozione dei contaminanti proteici, lipidici, glucosidici e salini presenti in soluzione.

A prescindere dal metodo che si decide di utilizzare, l'estrazione del DNA è caratterizzata da alcuni passaggi essenziali che prevedono la rottura della parete e/o membrana cellulare, la digestione enzimatica delle proteine, l'allontanamento dei contaminanti, la degradazione del RNA e la precipitazione del DNA. Dopo questi passaggi è possibile ottenere l'isolamento del DNA in tampone di eluizione. La procedura si completa con il dosaggio spettrofotometrico dell'estratto.

1.4 Estrazione di DNA genomico da sangue mediante metodo del Salting-out

La precipitazione delle proteine mediante "salting out" è uno dei metodi più utilizzati e sfrutta il principio secondo il quale la solubilità delle proteine in soluzione dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione salina o forza ionica. A basse concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine aumenta lentamente (salting in), mentre ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente (salting out) causando la precipitazione delle stesse. La solubilità delle proteine è determinata dalla formazione di uno strato di solvatazione (clatrato) costituito dalle molecole del solvente che interagiscono mediante ponti idrogeno con gli amminoacidi idrofili delle proteine. I sali competono con questi amminoacidi per il legame alle molecole del solvente, rimuovendo di fatto lo strato di solvatazione che avvolge le proteine e causandone la loro precipitazione. L'allontanamento dei contaminanti proteici dalla soluzione è fondamentale per assicurare il buon esito delle applicazioni downstream all'estrazione, come la PCR e il clonaggio genico. L'eventuale permanenza di nucleasi nella miscela contenente l'estratto potrebbe causare infatti la frammentazione della molecola di DNA e dell'informazione in essa contenuta. Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi e il trattamento con una proteasi, la Proteinasi K, allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali. Infine mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA.

1.5 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.

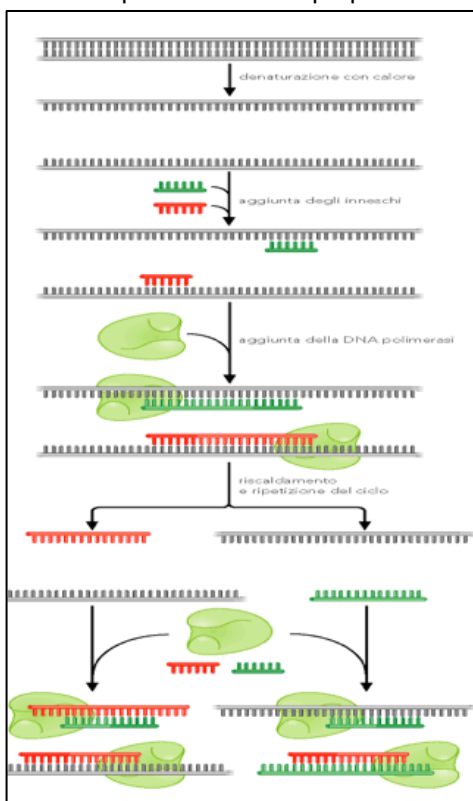
I geni "barcode" sono stati individuati e scelti in quanto la loro sequenza è molto conservata, ma significativamente diversa tra le varie specie; tali geni sono dei marcatori affidabili per identificare rapidamente le diverse specie, a partire da un campione di DNA.

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.

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

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 apparirsi al DNA solo nella zona di interesse e non in altre zone.

1.7 Il DNA mitocondriale ed il gene citocromo b

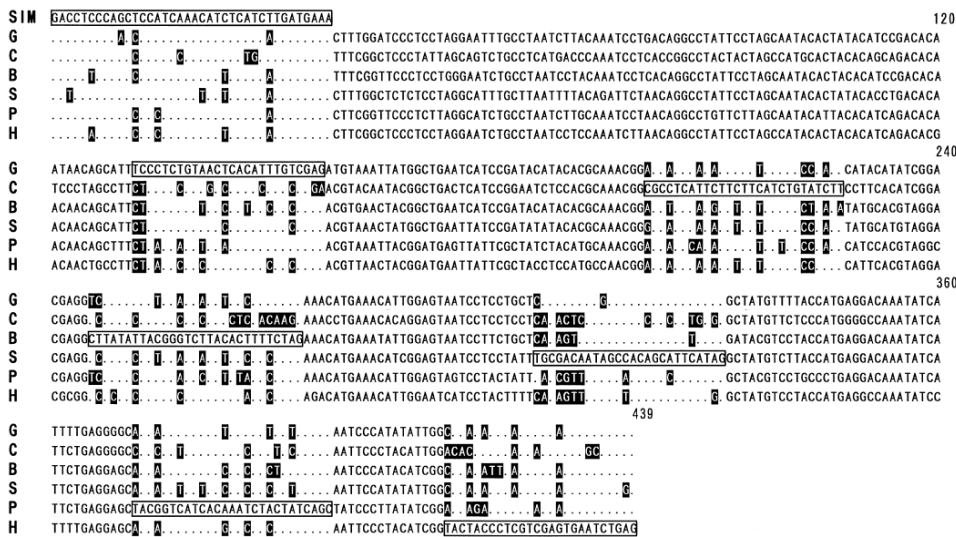
I mitocondri sono organuli fondamentali per la sopravvivenza: senza di essi le cellule eucariotiche non potrebbero produrre l’energia necessaria allo svolgimento delle funzioni vitali. I mitocondri delle cellule eucariotiche derivano dalla simbiosi tra due organismi unicellulari: per sopperire alle proprie 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. Matuszewska et al./Mol. Sci. 10 (2019) 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.

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. I principali metodi di identificazione di specie si basano 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...).

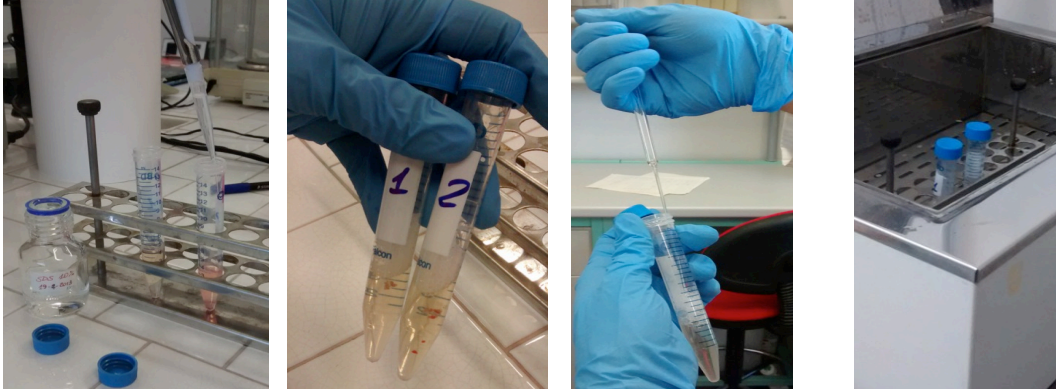
PROTOCOLLO SPERIMENTALE

ESTRAZIONE DNA GENOMICO

1. Separazione della componente cellulare dal plasma mediante centrifugazione.

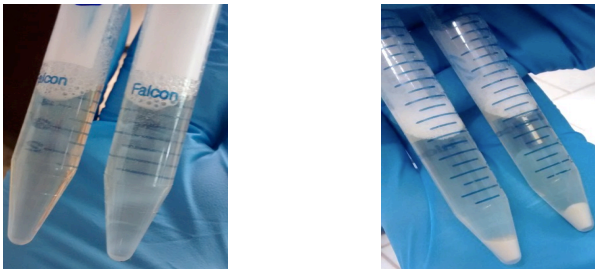
Nel sedimento (pellet) che si ottiene, i globuli bianchi (nucleati) stratificano nella parte superiore mentre i rossi (privi di nucleo) sul fondo della provetta. Essendo il DNA contenuto nel nucleo, si preleva e si trasferisce solo lo strato superiore in un'altra provetta sterile.

2. Lisi dei globuli bianchi per aggiunta di soluzione ipotonica e incubazione a circa 60 ° in bagnetto termostato in presenza di proteinasi K.



3. Aggiunta di NaCl 6M, soluzione ad elevata concentrazione salina per determinare la precipitazione delle proteine.

4. Centrifugazione e recupero del surnatante (fase acquosa) contenente il DNA.



5. Precipitazione del DNA

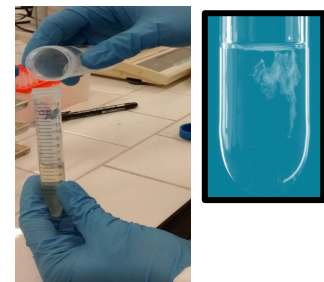
a) Aggiungere 800 µL di etanolo puro

b) Agitare delicatamente per inversione fino alla comparsa del flocculo di DNA

c) Trasferire il flocculo con un puntale in una provetta contenente 600 µL di etanolo 80%

d) Centrifugare per 10 min. a 13000 rpm ed eliminare il surnatante

e) Risospendere il DNA in 1 mL di tampone TE.



1.6 Elettroforesi del DNA in gel d'agarosio

Dopo l'estrazione l'integrità del DNA viene valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio in TAE (un tampone a pH 8,0). L'**elettroforesi** è un metodo standard utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA (per esempio per separare i frammenti di DNA dopo PCR o dopo taglio con gli enzimi di restrizione).

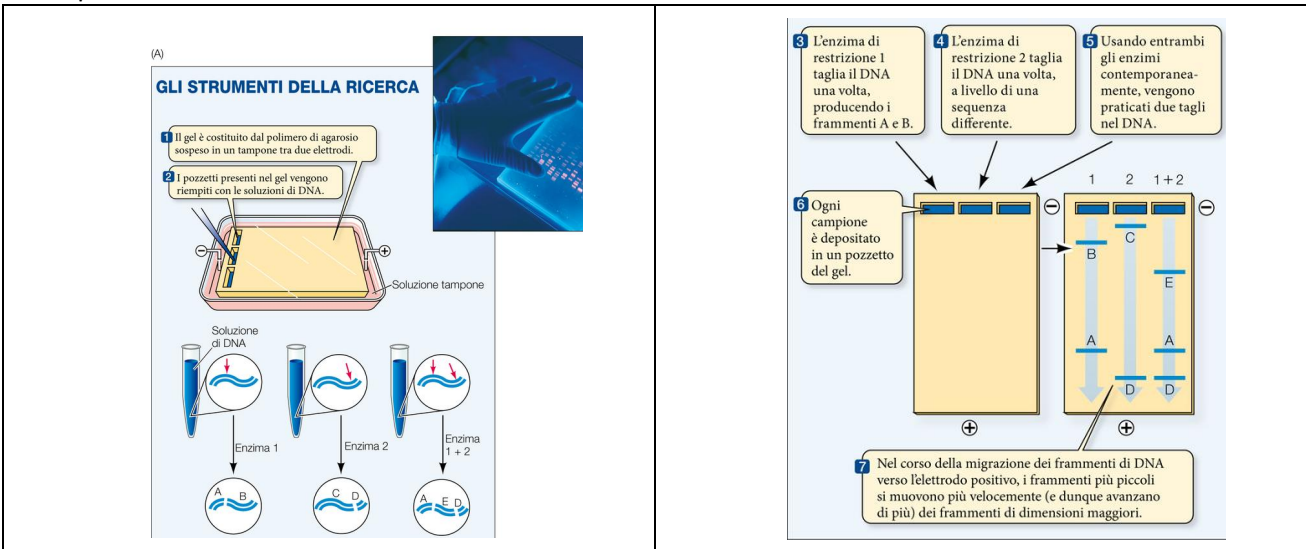
- L'**agarosio** è un polisaccaride che si ricava dalle alghe.

- Il gel viene formato sciogliendo a caldo l'agarosio allo 0,8% (peso/volume) in TAE. Una volta che l'agarosio è perfettamente solubilizzato, la soluzione viene posta in uno stampo di forma rettangolare e lasciato raffreddare.

- Ad una delle estremità del gel si trovano delle piccole cavità verticali chiamate pozzetti, allineate a formare una fila. Un determinato volume di ciascun campione di DNA è miscelato con una soluzione acquosa, denominata "loading buffer", costituita dal colorante Blu di Bromofenolo e da saccarosio. Il "loading buffer" serve per "appesantire" il campione, facendolo andare sul fondo del pozzetto e colorando il campione in blu consente al contempo di seguire la corsa elettroforetica.
- Ogni campione viene deposto (o «caricato») in un pozzetto, quindi si applica al gel un campo elettrico (voltaggio costante di (75 V) per 40'), con il polo negativo posizionato vicino ai pozzetti e il polo positivo all'estremità opposta. La corsa elettroforetica viene condotta a voltaggio costante.

| | |
|---|--|
| <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> |
|---|--|

A pH basico, il DNA è carico negativamente per la presenza dei gruppi fosfato. Poiché le cariche opposte si attraggono, i frammenti di DNA sottoposti ad un campo elettrico migrano verso il polo positivo. 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 l'erogazione di 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.



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.

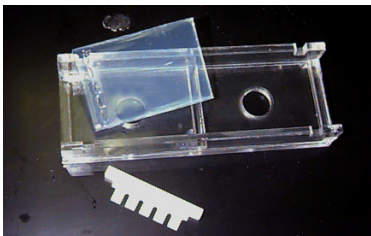
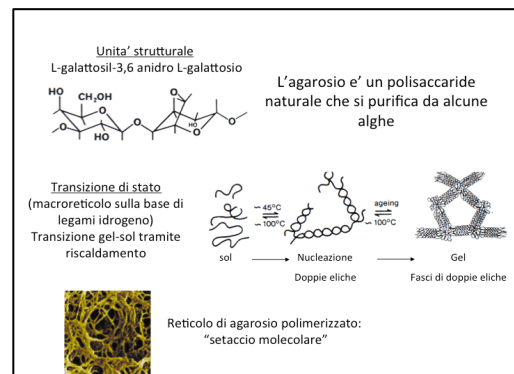
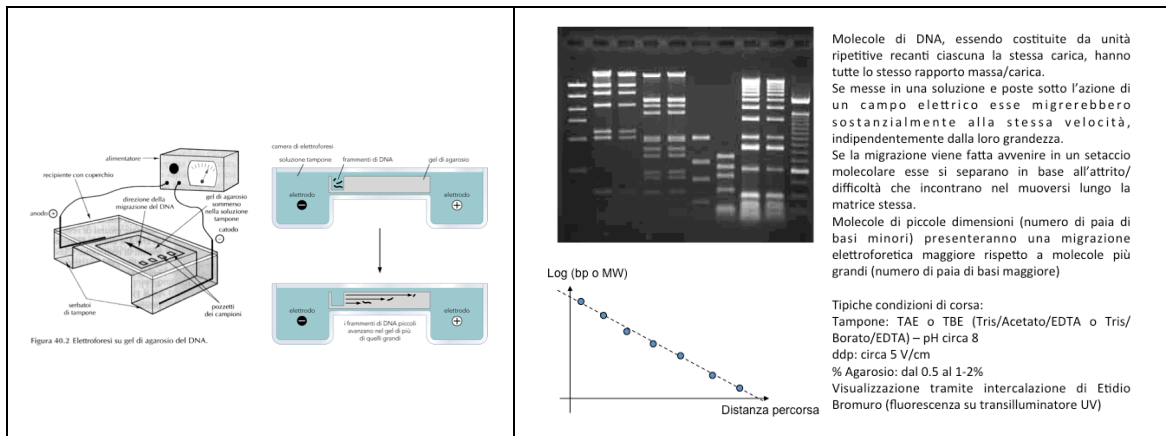


Diagramma semilogaritmico: dimensioni del DNA (kb oppure bp) sull'asse Y logaritmico; cm oppure mm percorsi a parità di tempo sull'asse X lineare.





- **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.

Preparazione del gel d'agarosio

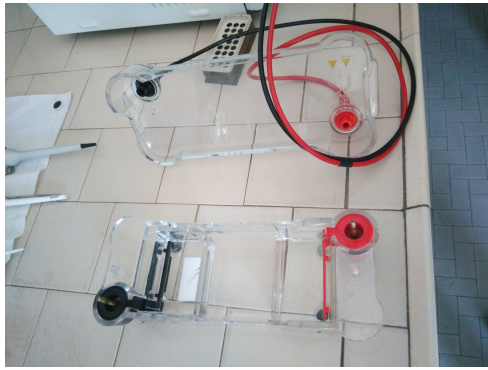
- preparare la camera di polimerizzazione e posizionarla su piano orizzontale



- versare 40 ml di tampone TAE 1x in una beuta di vetro pirex contenente 0,32 g di agarosio.
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde o su una piastra riscaldante
- aspettare alcuni 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 prima di essere "colato" nella camera di polimerizzazione per evitare che rovini il supporto di plastica
- versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine. I pozzetti si formano per rimozione del pettine una volta terminata la polimerizzazione
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- rimuovere la vaschetta dal supporto per la polimerizzazione e trasferirla nella cella elettroforetica

Corsa elettroforetica

- miscelare 20 µl di ciascun campione con 5 µl di loading buffer utilizzando una micropipetta
- se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga da banco
- caricare lentamente ciascun campione (25 µl) nei singoli pozzetti facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
- chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del generatore di corrente



- impostare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 30 min
- fare attenzione che la banda del tracciante, il blu di bromofenolo, non esca dal gel (altrimenti alcune bande di DNA possono uscire dal gel). Il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 bp.
- Al termine della corsa elettroforetica, interrompere l'erogazione di corrente, spegnere l'alimentatore, aprire la cella elettroforetica e trasferire il gel nel transilluminatore. L'esposizione del gel alla luce ultravioletta permette di visualizzare il DNA.

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

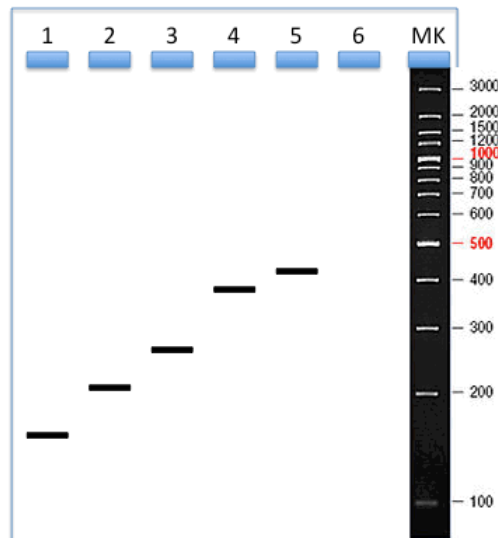
Nota di laboratorio: la concentrazione di agarosio del gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2.000 bp, si utilizza un gel di agarosio al 2% (vedi preparazione gel pag. 9).

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