



Unione Europea

Fondo europeo agricolo
per lo sviluppo rurale:
*l'Europa investe
nelle zone rurali*



Misura 16 "Cooperazione" art. 35 del Reg. (UE) n. 1305/2013
Sottomisura 16.1 - Tipologia di Intervento 16.1.2 - "Sostegno ai GO
del PEI per l'attuazione di progetti di diffusione delle innovazioni
nell'ambito del rafforzamento dell'AKIS campano"



KASTRACK
tracking chestnut fingerprints



Amplificazione del DNA Target (PCR) e lettura

Reazione a catena della polimerasi (PCR) con sonde FRET

Passaro S., Gentile D., De Masi L., Petriccione M., Nunziata A.

Introduzione all'analisi del DNA

Il nostro sistema di riconoscimento varietale si basa sulla lettura di specifiche basi azotate (A, G, C, T) in precise posizioni prestabilite sui cromosomi del castagno. Per poter leggere una base del DNA, che è un minuscolo frammento molecolare, bisogna innanzitutto farne tante copie, cioè amplificarlo, e poi colorarle, ovvero marcarle con specifiche sonde fluorescenti che ne consentono il riconoscimento (FRET).

La tecnologia che abbiamo utilizzato finora per fare questo è brevettata e prodotta da LGC Biosearch Technologies. La ditta produce i reagenti per amplificare e marcare il DNA (in una master mix) e costruisce a richiesta le sonde, cioè gli inneschi in grado di selezionare una singola base di DNA da amplificare, completi della specifica codifica che determina la marcatura fluorescente che ci consente di leggerla. Tale tecnologia è nota come KASP[®], cioè Kompetitive Allele Specific PCR, ovvero amplificazione PCR competitiva allele-specifica.

La grande maggioranza dei punti dei cromosomi sono uguali in tutti i castagni, presentano cioè la stessa sequenza di basi azotate. Noi però abbiamo individuato e scelto 38 punti distribuiti sui 12 cromosomi del castagno in cui abbiamo trovato mutazioni naturali bi-alleliche. In questi punti il DNA presentava cioè alternativamente o contemporaneamente due delle 4 possibili basi azotate. Le basi che si possono trovare in uno specifico punto del DNA sono costanti in ciascuna cultivar e sono associate a due alleli che possono trovarsi in condizione omozigote (alleli identici) o eterozigote (alleli differenti).

Esiste anche un'altra tecnologia brevettata che, utilizzando gli inneschi selezionati per castagno (sonde KASP), si è rivelata completamente compatibile. Si tratta della tecnologia PACE[®], PCR Allelic Competitive Extension, prodotta da 3CR Bioscience, con sede nel Regno Unito. La versione 2.0 della master mix PACE[®] è compatibile con le nostre sonde anche utilizzando preparazioni di DNA di castagno ottenute per lisi alcalina.

Amplificazione e lettura

L'allestimento della reazione di amplificazione è molto semplice. Stabilito il volume di reazione da utilizzare, che è opportuno ridurre al minimo compatibilmente con la macchina e i consumabili in uso, bisogna inserire in ciascun pozzetto di una piastra metà volume di campione di DNA diluito a 1 ng/μl, metà di master mix (che contiene l'enzima DNA polimerasi, il tampone di reazione e le sonde marcate) e una piccola quantità di sonda specifica (o innesco, per la precisione se ne aggiunge l'1,4% del volume finale).

L'amplificazione viene condotta in un macchinario chiamato termociclatore, o sistema PCR, che è uno strumento in grado di far cambiare rapidamente la temperatura alla nostra mix di reazione, variandola in maniera ciclica secondo un programma pre-determinato.

Alla fine dell'amplificazione ciclica e dopo avere abbassato la temperatura a 37°C, bisogna leggere la fluorescenza in due colori, per questo bisogna utilizzare un termociclatore con gruppo di lettura, anche noto come Real-Time PCR.

Nella stessa piastra da 96 pozzetti possono essere inseriti fino a 92 campioni diversi con un solo gruppo di sonde (un saggio, in grado di amplificare e marcare una specifica base del DNA) oppure meno campioni con più saggi (fino ad un campione con 19 saggi diversi). Ulteriori ragionamenti e adattamenti sono possibili, considerando che esistono termociclatori che lavorano con altre tipologie di plastica, come ad esempio piastre da 384 pozzetti. L'importante è che per ogni saggio, indipendentemente dal numero di campioni inseriti in piastra, siano previsti 4 controlli: un negativo, un controllo omozigote per un allele, un controllo omozigote per l'altro allele, ed un controllo eterozigote. Nel controllo negativo si aggiunge acqua pura al posto del DNA, nei controlli positivi si utilizzano DNA di genotipi standard a risposta nota. Il CREA custodisce una collezione di genotipi standard per i controlli. È possibile consultare la tabella dei genotipi standard e richiedere foglie o gemme per l'estrazione di DNA di controllo.

92 campioni con un saggio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	CA1
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	CA2
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	CH
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	C-

20 campioni con 4 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	1	9	17	1	9	17	1	9	17
B	2	10	18	2	10	18	2	10	18	2	10	18
C	3	11	19	3	11	19	3	11	19	3	11	19
D	4	12	20	4	12	20	4	12	20	4	12	20
E	5	13	CA1	5	13	CA1	5	13	CA1	5	13	CA1
F	6	14	CA2	6	14	CA2	6	14	CA2	6	14	CA2
G	7	15	CH	7	15	CH	7	15	CH	7	15	CH
H	8	16	C-	8	16	C-	8	16	C-	8	16	C-

4 campioni con 12 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
E	CA1											
F	CA2											
G	CH											
H	C-											

44 campioni con 2 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	1	9	17	25	33	41
B	2	10	18	26	34	42	2	10	18	26	34	42
C	3	11	19	27	35	43	3	11	19	27	35	43
D	4	12	20	28	36	44	4	12	20	28	36	44
E	5	13	21	29	37	CA1	5	13	21	29	37	CA1
F	6	14	22	30	38	CA2	6	14	22	30	38	CA2
G	7	15	23	31	39	CH	7	15	23	31	39	CH
H	8	16	24	32	40	C-	8	16	24	32	40	C-

12 campioni con 6 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9
B	2	10	2	10	2	10	2	10	2	10	2	10
C	3	11	3	11	3	11	3	11	3	11	3	11
D	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12	4	12
E	5	CA1	5	CA1								
F	6	CA2	6	CA2								
G	7	CH	7	CH								
H	8	C-	8	C-								

2 campioni con 16 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
B	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
C	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
D	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
E	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
F	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
G	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-
H	1	2	CA1	CA2	CH	C-	1	2	CA1	CA2	CH	C-

28 campioni con 3 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	1	9	17	25	1	9	17	25
B	2	10	18	26	2	10	18	26	2	10	18	26
C	3	11	19	27	3	11	19	27	3	11	19	27
D	4	12	20	28	4	12	20	28	4	12	20	28
E	5	13	21	CA1	5	13	21	CA1	5	13	21	CA1
F	6	14	22	CA2	6	14	22	CA2	6	14	22	CA2
G	7	15	23	CH	7	15	23	CH	7	15	23	CH
H	8	16	24	C-	8	16	24	C-	8	16	24	C-

8 campioni con 8 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
B	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
C	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
D	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
E	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
F	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
G	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-
H	1	2	3	4	5	6	7	8	CA1	CA2	CH	C-

1 campione con 19 saggi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	CA1											
C	CA2											
D	CH											
E	C-											
F	1	CA1	CA2	CH	C-	1	CA1	CA2	CH	C-	1	CH
G	1	CA1	CA2	CH	C-	1	CA1	CA2	CH	C-	CA1	C-
H	1	CA1	CA2	CH	C-	1	CA1	CA2	CH	C-	CA2	C-

Il protocollo

Preparare le assay mix utilizzando comuni primer custom

Le assay mix per castagno sono state prodotte da LGC per il CREA entro il progetto di sintesi numero 3389.001. È possibile richiedere le assay mix alla ditta produttrice citando tale numero di progetto. Utilizzando i dati pubblicati, è anche possibile ottenere le assay mix ordinando separatamente i tre primer necessari a qualsiasi servizio di sintesi di oligonucleotidi

- Diluire i tre primer portandoli a 100 µM come generalmente raccomandato dalle ditte produttrici
- In un microtubo, possibilmente da 0.2, unire:
 - 46 µl di acqua,
 - 30 µl di primer reverse,
 - 12 µl di primer forward A1
 - 12 µl di primer forward A2

La assay-mix così preparata può essere utilizzata nella misura di 0.21 µl per ciascuna reazione PCR da 15 µl.

La miscela dei componenti

Il protocollo che segue si riferisce ad un volume di reazione di 15 µl, che è quello che comunemente adottiamo con la nostra macchina CFX96 di BioRad e la plastica dedicata (piastre da 96)

- Se si dispone di DNA puro, diluire il DNA portandolo ad una concentrazione di 1 ng/µl; se si ricorre a metodi di lisi alcalina diluire il preparato a base di DNA come descritto ed assicurarsi di utilizzare una master mix compatibile (PACE® 2.0 Genotyping Master Mix di 3CR bioscience)
- Stabilire lo schema di piastra che si intende adottare: quanti saggi con quanti campioni (per selezionare i saggi da fare, consultare la banca dati in base allo scopo dell'analisi)
- Preparare tante miscele di reazione quanti sono i saggi da inserire nella piastra
- Per preparare ciascuna miscela tenere conto del numero di campioni da analizzare con ciascun saggio (n) e del numero dei controlli da inserire (3 positivi +1 negativo = 4)
 - in un tubo, aggiungere $[7,5*(n+4)*1.1]$ µl di master mix KASP 2x
 - Nello stesso tubo, aggiungere $[0,21*(n+4)*1.1]$ µl di KASP assay mix
- Dispensare 7,5 µl di miscela di reazione così ottenuta in ciascuno dei rispettivi n+4 pozzetti

- Aggiungere 7,5 µl di DNA diluito (o di acqua, per il controllo negativo o per eventuali campioni fissati su dischetto di carta) in ciascun pozzetto

La miscela di reazione è di tipo Hot-start, per cui è possibile lavorare a temperatura ambiente. Tuttavia, è consigliabile evitarne il riscaldamento e l'esposizione alla luce diretta. È raccomandabile evitare nel modo più assoluto cicli ripetuti di congelamento e scongelamento della Master mix, per cui è opportuno dividerla in aliquote all'arrivo secondo i bisogni del laboratorio.

Il ciclo di reazione

Per ciclo di reazione si intende il programma di temperature a cui la miscela va sottoposta.

Con la nostra CFX96 di BioRad, noi adottiamo il seguente ciclo di reazione:

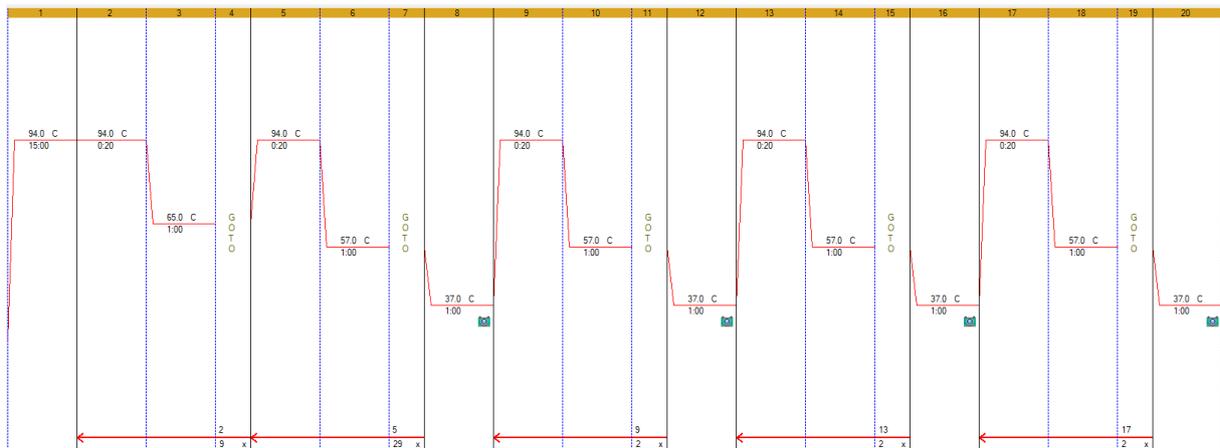
- 94°C per 15 minuti
- 10 cicli di due step ciascuno con abbassamento della temperatura di 0,8 °C del secondo step ad ogni ciclo
 1. 94 °C per 20 secondi
 2. 65 °C per 1 minuto
- 30 cicli di due step ciascuno a temperature fisse
 1. 94 °C per 20 secondi
 2. 57 °C per 1 minuto
- 1 minuto a 37 °C con lettura al termine dello step

In base alla lettura, possiamo decidere di prolungare l'amplificazione con ulteriori tre cicli a due step:

1. 94 °C per 20 secondi
2. 57 °C per 1 minuto

Ed una nuova lettura al termine di uno step di 1 minuto a 37°C

In base a questa ulteriore lettura, possiamo decidere di prolungare ancora l'amplificazione, ma raramente oltre le tre volte. È possibile impostare direttamente un programma di amplificazione che includa il ciclo base, con la prima lettura dei campioni, seguito da due o tre cicli di prolungamento con le rispettive ulteriori letture.



Letture del segnale

La lettura dei dati dovrà essere fatta seguendo le istruzioni relative allo strumento utilizzato per la lettura del segnale. In linea di massima, i software di gestione degli strumenti sono equipaggiati per fare una lettura automatica dei dati con funzioni di “Allelic discrimination” descritte nelle istruzioni del software stesso.

In via del tutto generale, i dispositivi di lettura restituiscono due valori di fluorescenza (FAM ed HEX) per ogni campione, che chiameremo F_i e H_i , e per il controllo negativo, che chiameremo F_0 e H_0 . Questi valori sono generalmente rappresentati su un piano cartesiano con i valori di fluorescenza in FAM sull’asse delle ascisse e i valori di fluorescenza in HEX sull’asse delle ordinate. Su questo piano, sarà rappresentato un punto per ogni campione inserito nell’analisi (96 per una intera piastra).

Per ogni campione, sarà possibile valutare la somma delle fluorescenze rispetto al campione negativo.

$$S = (F_i - F_0) + (H_i - H_0)$$

Una maggiore efficienza dell’amplificazione corrisponderà a un maggiore valore di S .

Per la chiamata allelica, è necessario valutare l’angolo θ formato dal segmento che congiunge ciascun campione al controllo negativo, e l’asse delle ascisse.

$$\theta = \arctan \frac{H_i - H_0}{F_i - F_0}$$

Che, in presenza di controlli omozigoti per l’allele 1 e 2 è possibile normalizzare ricavandone valori di θ_{norm} compresi tra 0 e 1:

$$\theta_{norm} = \frac{\theta - \min\theta}{\max\theta - \min\theta}$$

Ad angolo zero o prossimo a zero (θ_{norm} prossimo a 0), la chiamata sarà *allele 1*; ad angolo prossimo ai 45°, (θ_{norm} prossimo a 0,5) la chiamata sarà *eterozigote*; ad angolo prossimo ai 90°, (θ_{norm} prossimo a 1) la chiamata allelica sarà *allele 2*.

Le chiamate saranno poi trasformate nel codice a lettere riportato in banca dati in base allo SNP che si sta analizzando. Ad esempio, per lo SNP al *locus* A3079, *allele 1* corrisponde a C, *allele 2* a T e, di conseguenza, *eterozigote* a Y.