

# Polimorfismi del DNA umano



Esperienza presso il centro  
E.B.R.I.

European Brain Research Institute

*Progetto della classe II C*

# Preparazione allo svolgimento dell'esperienza

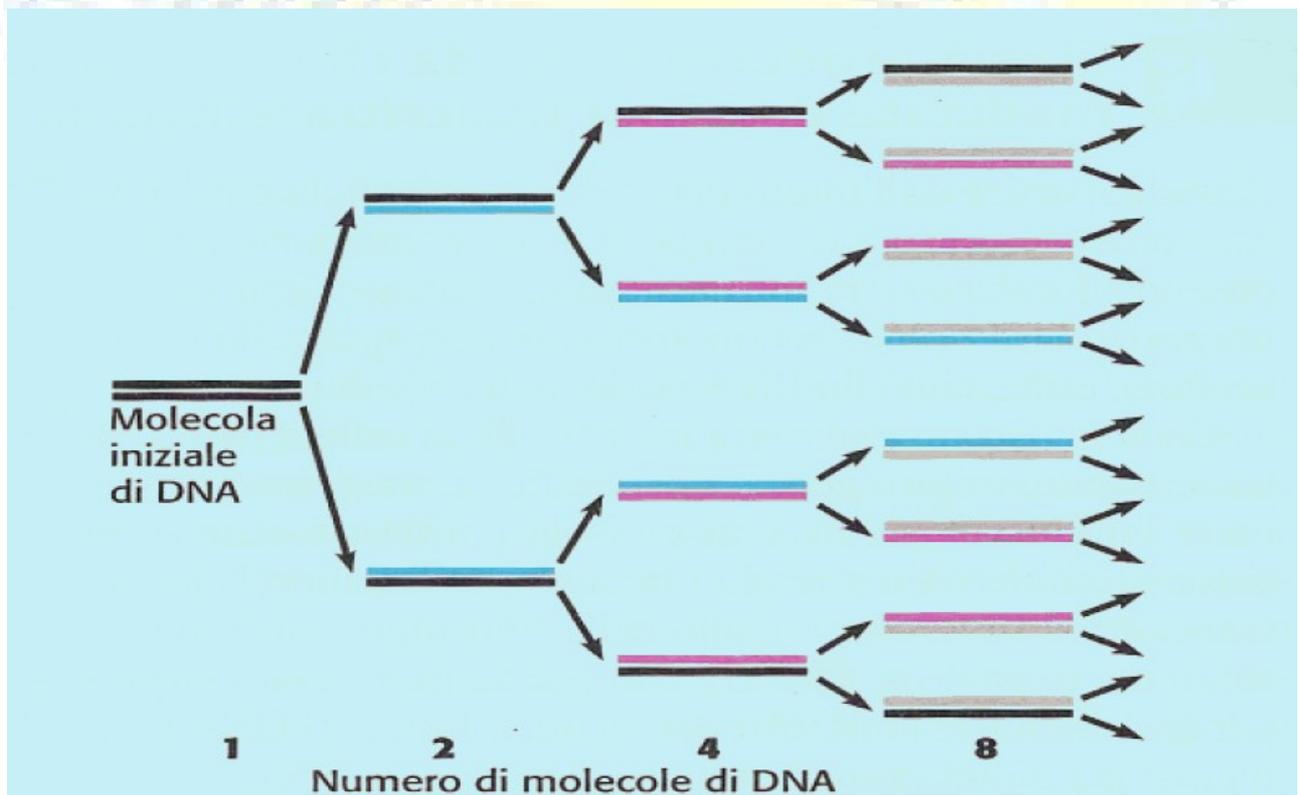
*La II C si è preparata all'esperienza presso il centro di ricerca E.B.R.I. iniziando un intenso lavoro di approfondimento sulla genetica che avrebbe fornito una preparazione adeguata alla prova "sul campo".*



# Presentazione

L'esperimento esamina l'inserzione Alu nel locus PV92, specifico per l'uomo ( in particolare, tipico di popolazioni caucasiche) e localizzato sul cromosoma 16. Vi sono due varianti con o senza Alu e quindi tre possibili genotipi nel locus PV9 : omozigoti+ + , eterozigoti+ -, omozigoti --

La determinazione del genotipo PV92 viene effettuata applicando la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction). Con questa tecnica, che amplifica milioni di volte uno specifico frammento di DNA genomico, riusciamo ad isolarlo dal suo contesto riuscendo così a distinguere gli alleli + e -, differenti per grandezza, grazie all'elettroforesi su gel di agarosio.



# Strumenti

*Micropipette diversamente*

*graduate*

*3 provette da 1,5 ml*

*Centrifuga*

*Ghiaccio*

*Elettrodi da 130 volt*





## Svolgimento...

*Versiamo 10ml di soluzione salina (0,9% NaCl) in bocca e sciacquiamo vigorosamente per 30 secondi. Espelliamo la soluzione in un bicchiere di carta. Con un movimento circolare mescoliamo le cellule e trasferiamo 1ml del liquido in una provetta da 1.5ml.*



*Inseriamo la provetta in una microcentrifuga e centrifughiamo al massimo dei giri per 1 minuto. A questo punto nella provettina troveremo un sopranatante e, sul fondo, il pellet di cellule. Dopo aver gettato il sopranatante, sospendiamo nuovamente le cellule pipettando su e giù.*



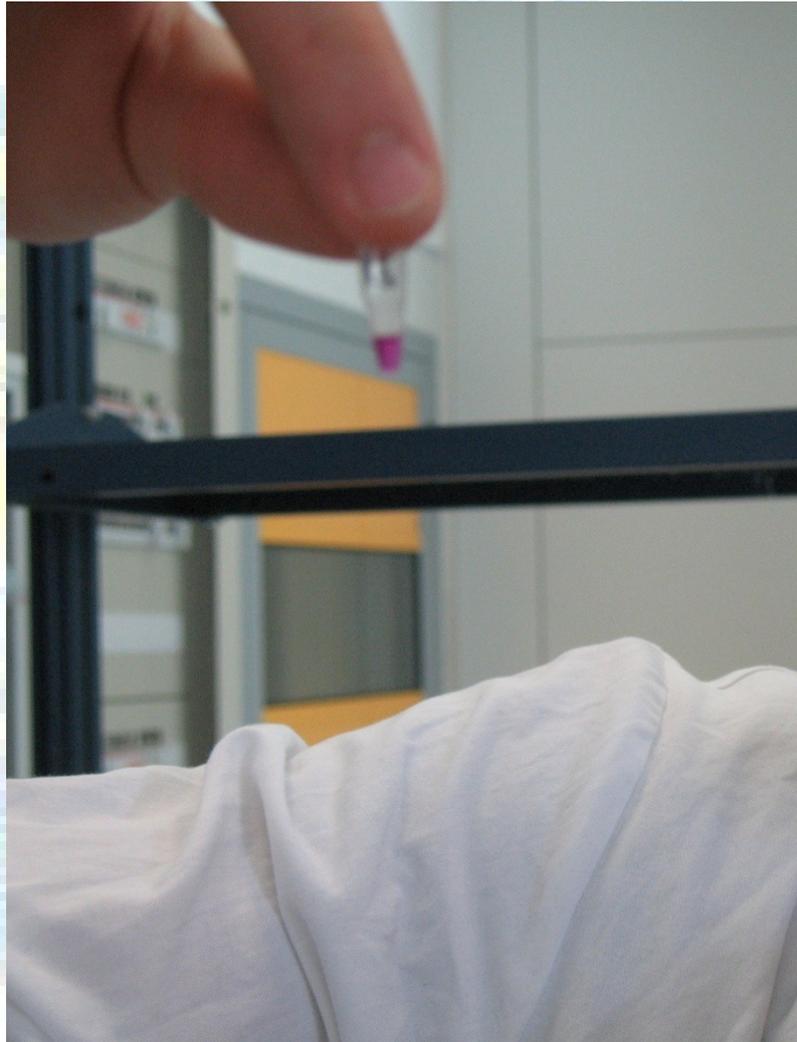
*Preleviamo 30ml di sospensione di cellule e le aggiungiamo al tubo contenente 100 $\mu$ l di Chelex(resina che viene diluita in acqua distillata al 5%). Dopo aver fatto bollire le cellule per circa 10 minuti, raffreddiamo la provetta con del ghiaccio.*



*Dopo aver centrifugato il tubo al massimo dei giri, trasferiamo 30 $\mu$ l di sopranatante (contente DNA) in una nuova provetta da 1.5ml.*

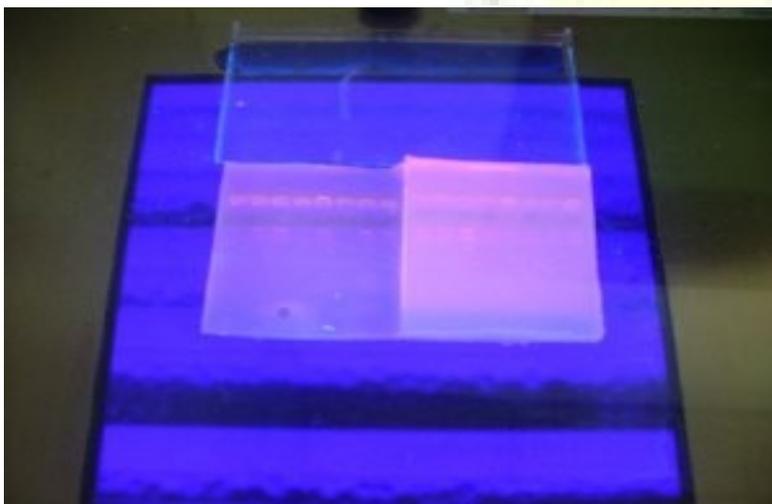
*Con una micropipetta inseriamo in una provetta una miscela colorata, di caricamento (13,9% di saccarosio e 0,0082% di rosso cresolo) e una pallina di PCR.*

*Con la massima velocità possibile, inseriamo il nostro DNA nella nuova provetta dove sta avvenendo la reazione per poi passare alla centrifugazione. Dopo la centrifugazione il rosso cresolo, il saccarosio e il DNA costituiscono una miscela colorata pronta per essere inserita nei "pozzetti" del blocco di gel di agarosio.*



*Il primo pozzetto di ogni gel è stato destinato ad un marcatore di peso molecolare noto. Preleviamo 20 $\mu$ l dal tubo contenente la reazione di PCR e lo carichiamo nel pozzetto assegnato di gel di agarosio al 2%. Eseguiamo così l'elettroforesi (tecnica analitica e separativa basata sul movimento di particelle elettricamente cariche*

*immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso) a 130 volts per 40 minuti.*



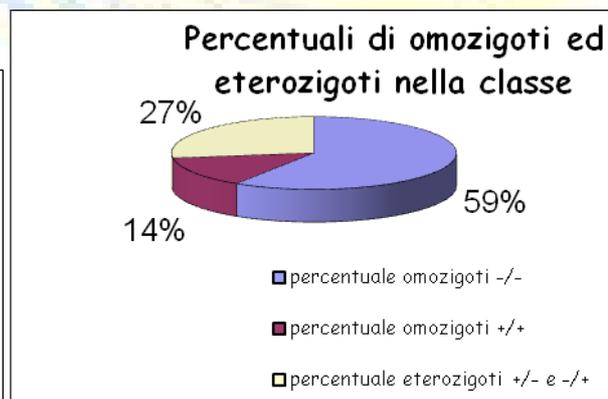
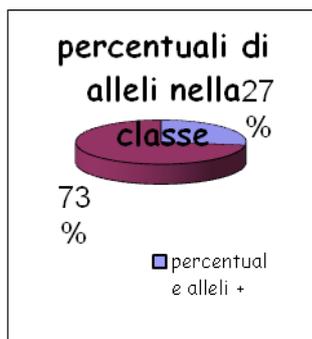
*Il gel di agarosio contiene una piccola quantità di bromuro di*

*etidio (EtBr) che, durante la corsa elettroforetica, si lega al DNA colorandolo. Infatti il bromuro di etidio quando viene colpito da luce ultravioletta emette una fluorescenza visibile. L'immagine viene poi catturata da una fotocamera digitale collegata al computer. L'individuazione del genotipo sarà possibile in base al differente peso del DNA. Infatti quello contenente Alu PV92 sarà più pesante e quindi in posizione inferiore rispetto agli altri.*

*Dalla nostra analisi abbiamo ottenuto i seguenti risultati:*



Studenti	Reazione riuscita?	Allele + (presenza di ALU nel locus PV92)	Allele - (Assenza di ALU nel locus PV92)	Omozigote -/-	Omozigote +/+	Eterozigote +/- e -/+	Note
studente 1	si	0	2	1	0	0	
studente 2	si	0	2	1	0	0	
studente 3	si	2	0	0	1	0	
studente 4	si	1	1	0	0	1	
studente 5	si	0	2	1	0	0	
studente 6	si	0	2	1	0	0	
studente 7	si	0	2	1	0	0	
studente 8	si	0	2	1	0	0	
studente 9	si	1	1	0	0	1	
studente 10	si	0	2	1	0	0	
studente 11	si	1	1	0	0	1	
studente 12	si	0	2	1	0	0	
studente 13	si	1	1	0	0	1	
studente 14	si	0	2	1	0	0	
studente 15	si	2	0	0	1	0	
studente 16	si	1	1	0	0	1	
studente 17	si	0	2	1	0	0	
studente 18	si	0	2	1	0	0	
studente 19	si	1	1	0	0	1	
studente 20	si	0	2	1	0	0	
studente 21	si	2	0	0	1	0	
studente 22	si	0	2	1	0	0	
Totale studenti	Totale Studenti con reazione riuscita	Totale alleli +	Totale alleli -	Totale omozigoti -/-	Totale omozigoti +/-	Totale eterozigoti -/+ e +/-	
		12	32	13	3	6	
22	22	percentuale alleli +	percentuale alleli -	percentuale omozigoti -/-	percentuale omozigoti +/-	percentuale eterozigoti -/+ e +/-	
		27%	73%	59%	14%	27%	



# Conclusioni

*Gli elementi Alu sono presenti solo nei primati i quali sono una derivazione del ramo evolutivo "scimmie" che include anche gli umani. Così centinaia di migliaia di copie Alu si sono accumulate nei primati quando questi si sono separati dagli altri gruppi vertebrati 65 milioni di anni fa. Una volta che un Alu si integra in un nuovo sito esso accumula nuove mutazioni con la stessa frequenza del DNA che lo circonda. Tutti i primati che presentano un inserimento Alu in un luogo particolare devono averlo ereditato da un antenato comune. Questa è chiamata identità per discendenza.*

*Alla fine dell'esperienza abbiamo avuto modo di discutere con il responsabile dell'attività dei nostri dubbi e curiosità inerenti all'esperienza svolta.*



# Riconoscimenti ottenuti



*Dopo la nostra esperienza presso l'E.B.R.I. , in occasione di un'interessantissima conferenza presieduta dal premio Nobel Rita Levi Montalcini, abbiamo ricevuto degli attestati di*

*partecipazione.*



## Progetto Bio-Form

Laboratori EBRI, Via Fosso di Fiorano, 64 Roma

Esercizi di Genotipizzazione

25 Gennaio – 17 Aprile 2008

ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

di

**PAULIS JACOPO**

Scuola Media Superiore "GIULIO CESARE"

Organizzazione Scientifica  
Ettore D'Ambrosio, Richard Butler, Giuseppe Starace.

Direzione didattica  
Ettore D'Ambrosio