

# Fasi della PCR

- ✓ **DENATURAZIONE del DNA stampo**

Apertura della struttura a doppia elica del DNA mediante riscaldamento (94 - 95°C)

- ✓ **ANNEALING**

Appaiamento (ibridazione) dei primers alle rispettive sequenze complementari sul filamento di DNA stampo (50 - 65°C)

- ✓ **ESTENSIONE**

Polimerizzazione del nuovo filamento di DNA complementare allo stampo, ad opera dell'attività dell'enzima DNA polimerasi (72°C)

## REAGENTI DELLA PCR

- **Acido nucleico target:** sequenza da amplificare (DNA stampo)
- **Primers:** sequenze oligonucleotidiche complementari alle estremità dello stampo (lunghezza 16-25 nucleotidi)
- **Taq polimerasi:** enzima DNApolimerasi termostabile, isolato dal batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*, che catalizza la reazione di polimerizzazione del filamento di DNA complementare allo stampo, utilizzando come innesco l'estremità 3' del primer ibridato
- **Deossinucleotidi trifosfati (dNTP)**
- **Tampone di reazione:** ambiente in cui si svolge la reazione contenente diversi sali (KCl, tris-cloruro e MgCl<sub>2</sub>)



ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC  
TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

DNA stampo

ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC

TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

Denaturazione  
T=95°C

ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC  
GGCCTTAA

Primers

ACGGAACA

TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

Appaiamento  
T=50/65°C

**Estensione  
T=72°C**

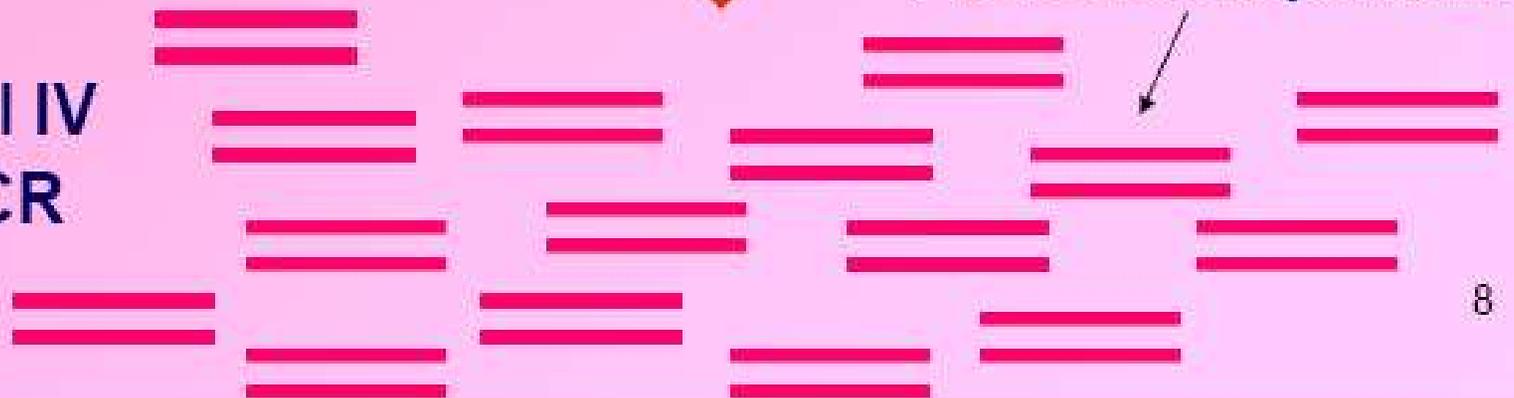


**Prodotto del I  
ciclo di PCR**

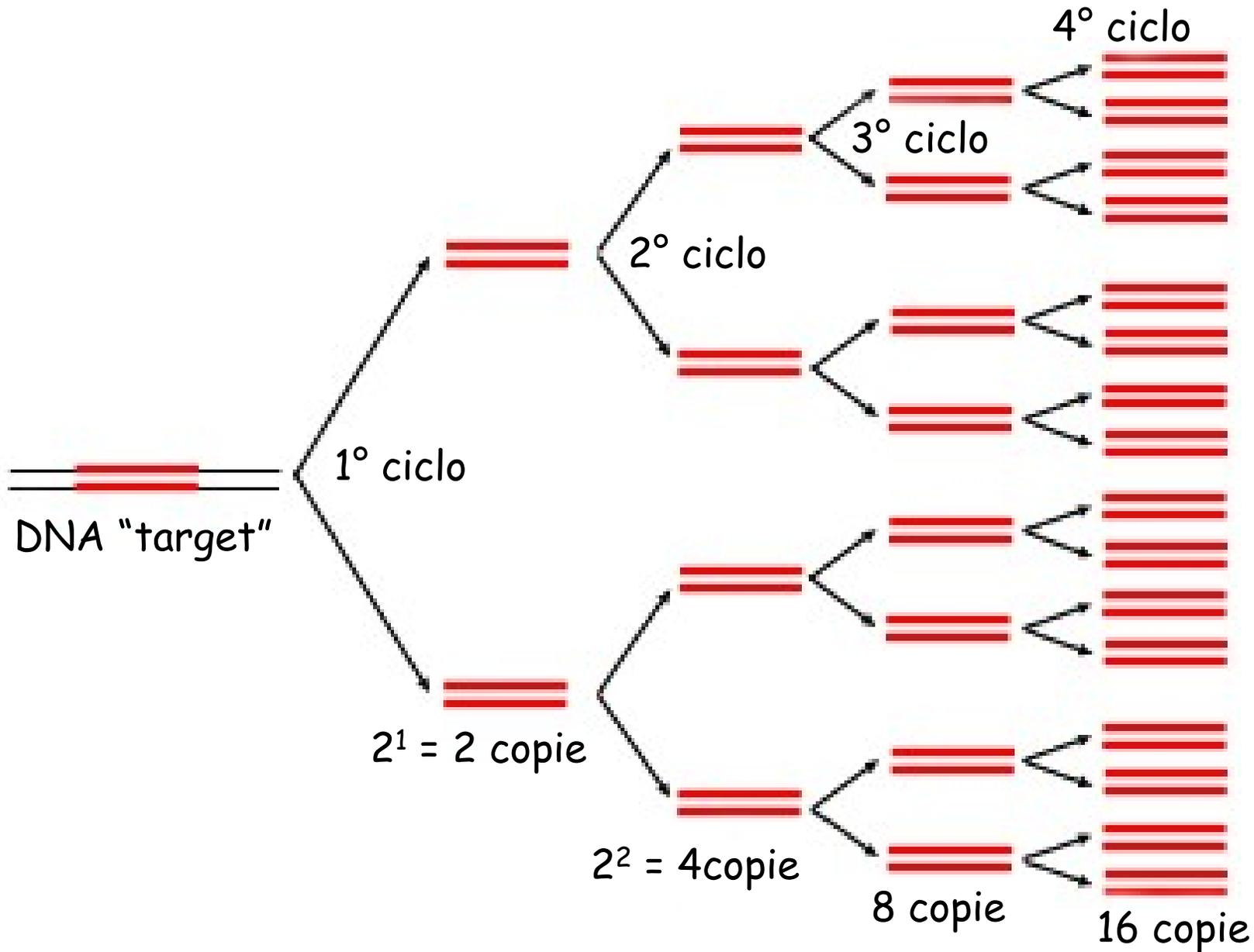


**Prodotti del IV  
ciclo di PCR**

**Prodotti di amplificazione**

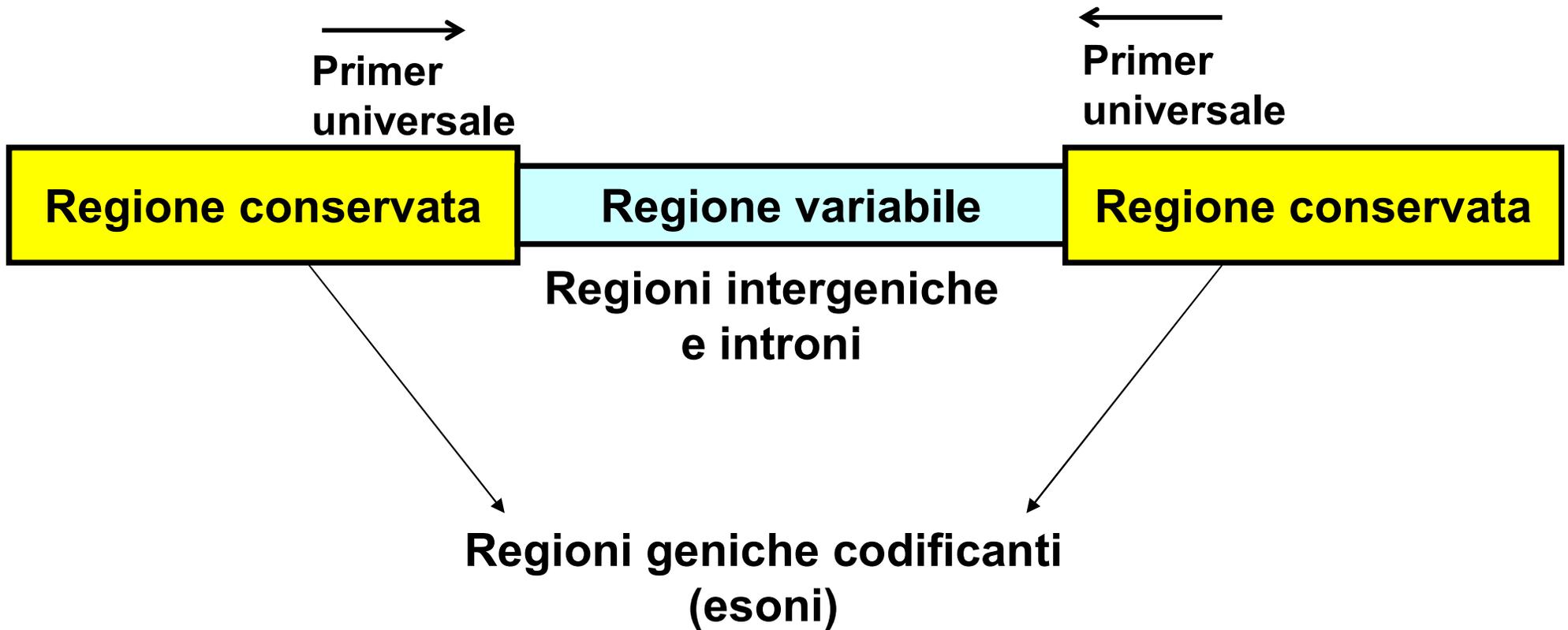


# Amplificazione esponenziale



.....➔ 35 cicli  
 $2^{35} = 34$  miliardi

# Identificazione di patogeni mediante primer specifici



Strategia più utilizzata per lo sviluppo di primer specifici:  
uso di primers universali in geni «barcode»

## Possibile primer universale

**GTTTCGARTCCCTTTTTTTGCT**

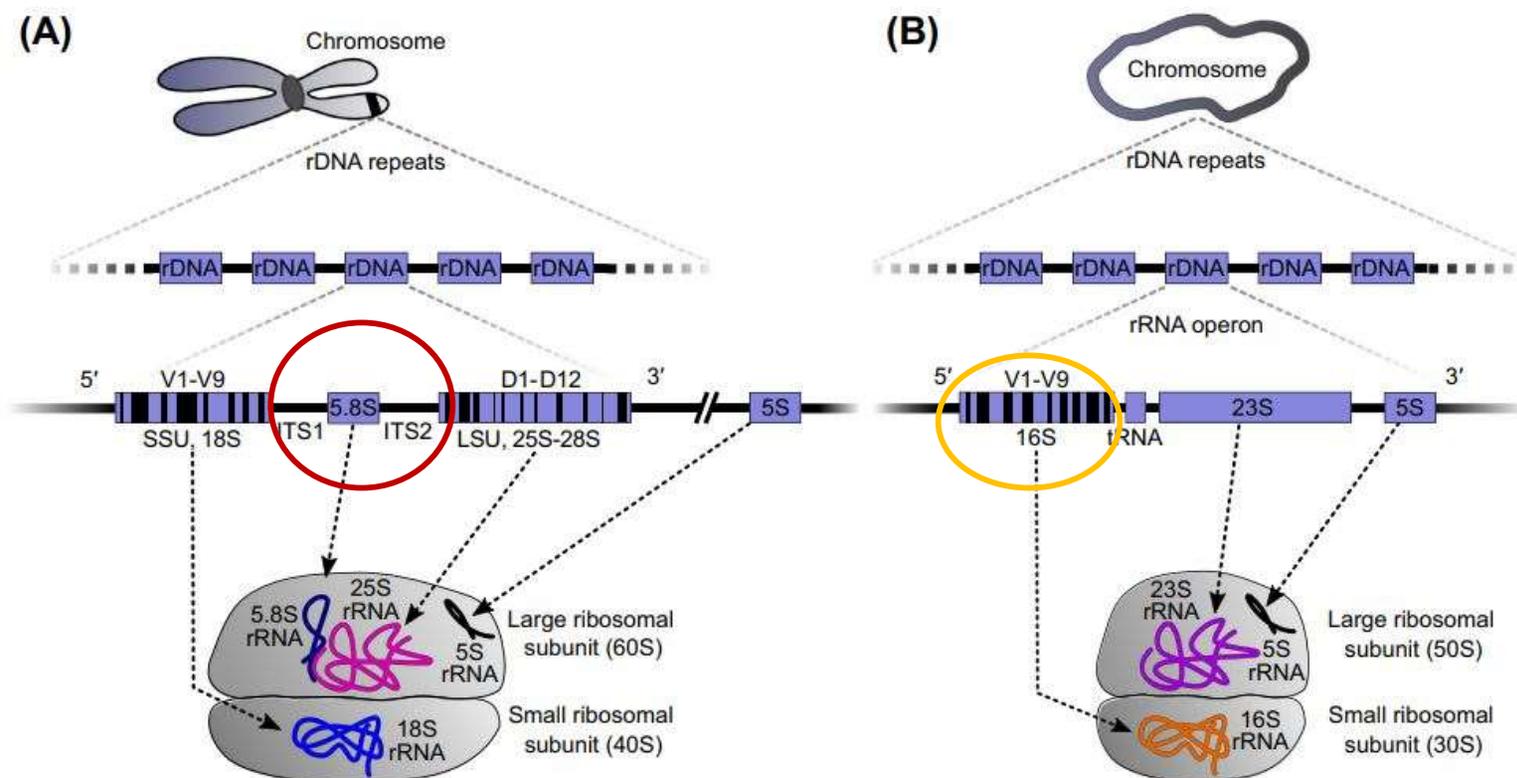
Palni	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTATATTTTATTATTAGATAA-----ATGGACCCAAA
Pfragariae	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTATATTTTATTATTAAATAA-----ATGGACCCAAA
Psojae	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTATATTTT---TATTAGATAA-----ATGGACCCAAA
Pcinnamomi	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTATATGTATATATTAATAATAATAATAAATGGACCCAAA
Pkatsurae	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTATATTATATT-----A-----AATGGACCCAAA
Ppalmivora	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTATTTTATTATTAAATTTTACA-----AATGTACCCAAA
Pcapsici	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTAAAATATTAA-----ATTTAA-----AAATGGACCCAAA
Pcitricola	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTATAATATTAA-----ATTA-A-----AAATGGACCCAAA
Pcitrophthora	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTTAAATATTAA-----AATATA-----AAATGGACCCAAA
Pquercina	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTTATATAAAA-----T-----AAATGGACCCAAA
Ppseudosyringae	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTATTATTAAA-----TCTAAT-----AAATGTACCCAAA
Pinundata	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTGAACT-----ATTTT-----AAATGGACCCAAA
Pmegasperma	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTAATTAAAGGAATCAATAT----AAATGGACCCAAA
Pkernoviae	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTTAAATATTTTAAATAA-----AATGGACCCAAA
Pnicotianae	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTAAT-ATTTATAT-TAT-----AAATGGACCCAAA
Pinfestans	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTAT--ATATTTTA-AAT-----AAATGGACCCAAA
Plateralis	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTTATATATTTATTA-GAT-----AAATGGACCCAAA
Pramorum	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTTAAATATTTATTA-GAT-----AAATGAACCCAAA
Perythroseptica	GTTTCGAATCCCTTTTTTTGCTTT-TTTATACAATAAAT-----AAATGAACCCAAA
Pmedicaginis	GTTTCGAGTCCCTTTTTTTGCTTTATTTATACAATA-----AATGGACCCAAA



R = A o G (primer degenerati)

# I geni del DNA ribosomiale (rDNA) : sequenze ripetute per l'identificazione di specie per funghi e batteri

## Geni «barcode»



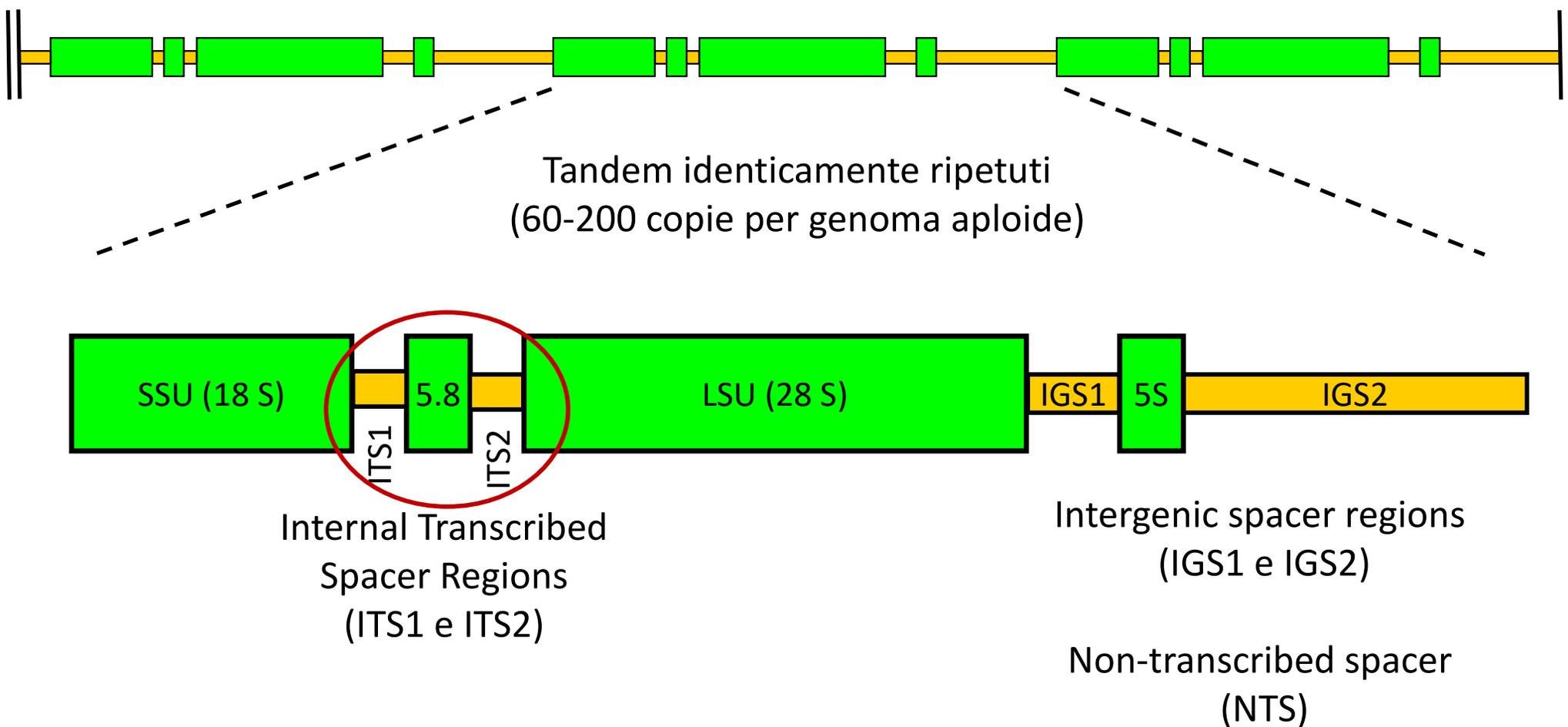
**Trends in Microbiology**

Figure 1. Schematic Representation of the Ribosomal RNA (rRNA) Gene Cluster (or rDNA). The variable regions of (A) eukaryotic and (B) prokaryotic rRNA loci are commonly used to characterize microbial taxa and resolve their phylogenetic relationships. In most fungi, the rRNA gene cluster includes the small ribosomal subunit (SSU, 18S), with internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) flanking the 5.8S, and large ribosomal subunit (LSU, 25–28S) regions. In bacteria, the rRNA operon comprises the SSU (16S), LSU (23S), and 5S loci. Black vertical lines in serial order illustrate the variable regions in SSU (V1–V9) and LSU (D1–D12), best suited for biodiversity assessments through microbial communities profiling.

Regioni ITS : barcode fungini

Regione 16 S : barcode batterici

# Geni codificanti per l'RNA ribosomiale (rRNA)



# Confronto delle ITS con sequenze di banche dati genetiche

 **National Library of Medicine**  
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite Home

Standard Nucleotide BLAST

**blastn** | blastp | blastx | tblastn | tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...

### Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

```
>679LTL_its
GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTT
GCGGGCTTTGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTT
CCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTAAACCCTTTGTAATT
```

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file  Nessun file scelto [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

# Confronto con sequenze di banche dati genetiche

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments | Download | Select columns | Show 100

select all 100 sequences selected | GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis rhizophila strain XDPOP-RS-16W chromosome 6</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	977	3911	100%	0.0	99.26%	1931557	<a href="#">CP068501.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis sp. isolate BFGIB155_2018 small subunit ribosomal RNA gene, partial seque...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	972	972	100%	0.0	99.08%	584	<a href="#">ON599026.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis loticola culture CBS:563.81 strain CBS 563.81 small subunit ribosomal RNA ...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	970	970	99%	0.0	99.08%	542	<a href="#">MH861380.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Phoma adonidicola strain LY55 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...</a>	<a href="#">Phoma adonid...</a>	970	970	98%	0.0	99.44%	663	<a href="#">JQ934830.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis sp. strain GBC-Fungus58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	968	968	99%	0.0	99.07%	555	<a href="#">MN077454.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured Didymella clone 191_K9ov small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; int...</a>	<a href="#">uncultured Did...</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	582	<a href="#">KY430454.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis cucurbitacearum isolate IksanC14 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	560	<a href="#">KM489071.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis ligulicola strain SWJ-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	559	<a href="#">KJ868167.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis ligulicola strain NB-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	562	<a href="#">KJ868166.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta sp. isolate X43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...</a>	<a href="#">Phyllosticta sp.</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	585	<a href="#">MZ380116.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Stagonosporopsis sp. YH-2018c isolate E92 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...</a>	<a href="#">Stagonosporo...</a>	968	968	100%	0.0	98.90%	563	<a href="#">MH257421.1</a>

# Confronto con sequenze di banche dati genetiche

[Download](#) [GenBank Graphics](#) Sort by:

**Stagonosporopsis rhizophila strain XDPOP-RS-16W chromosome 6**  
 Sequence ID: [CP068501.1](#) Length: 1931557 Number of Matches: 4

Range 1: 14046 to 14587 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
977 bits(529)	0.0	538/542(99%)	1/542(0%)	Plus/Minus
Query 1	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGCGGGCTTTG	60		
Sbjct 14587	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGCGGGCTTTG	14528		
Query 61	CCTGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCCGCC	120		
Sbjct 14527	CCTGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCCGCC	14468		
Query 121	GATTGGACAAAACCTTAAACCCTTTGTAATTGAAATCAGCGTCTGAAAAAAGCTTAATAGTT	180		
Sbjct 14467	GATTGGACAACACTTAAACCCTTTGTAATTGAAATCAGCGTCTGAAAAAAGCTTAATAGTT	14408		
Query 181	ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA	240		
Sbjct 14407	ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA	14348		
Query 241	TAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC	300		
Sbjct 14347	TAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC	14288		
Query 301	CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGG	360		
Sbjct 14287	CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGG	14228		

# Progettazione dei Primers

ZONA A

ZONA B

5' ---CAATGCAAGTTAGATGGTTACCATTTCGGAATCCATCGATTGCATTTAAGCCATGCA---3'  
|||||  
3' ---GTTACGTTCAATCTACGAATGGTAAGCCTTAGGTAGCTAACGTAAATTCGGTACGT---5'

OLIGO A: 5'-AATGCAAGTTAGATG-3'

E' UN OLIGO FORWARD (SI DISEGNA  
COME IL FILAMENTO SENSO 5'-3')

OLIGO B: 5'-GCATGGCTTAAATGC-3'

E' UN OLIGO REVERSE (SI DISEGNA  
REVERSE COMPLEMENT RISPETTO  
AL FILAMENTO SENSO 5'-3')



5'-AATGCAAGTTAGATG-3'  
|||||  
3' ---GTTACGTTCAATCTACGAATGGTAAGCCTTAGGTAGCTAACGTAAATTCGGTACGT---5'

Primer Forward (A)

5' ---CAATGCAAGTTAGATGGTTACCATTTCGGAATCCATCGATTGCATTTAAGCCATGCA---3'  
|||||  
3'-CGTAAATTCGGTACG-5'

Primer Reverse (B)

# Primer (determinano la specificità)

- ✓ Lunghezza 20- 25 bp
- ✓  $T_M$  50-60°C (temperatura di melting)
- ✓ Rapporto AT/CG 40-60%
- ✓ Disegno dei primer (software anche in rete)
- ✓ Evitare dimeri



“Target” specifico

Dimeri

# Preparazione di una reazione di PCR

- 1) PIANIFICARE L'ESPERIMENTO : calcolo quantità di tutti i componenti
- 2) PREPARARE LA REAZIONE IN LABORATORIO :  
preparare una miscela di reazione di tutti i componenti

Quale è l'enzima che catalizza la polimerizzazione del nuovo filamento?



Quale reagente individua la regione di DNA da amplificare, legandosi ad essa specificamente ?

Quali sono i monomeri costituenti del nuovo filamento di DNA?



# Preparazione di una reazione di PCR

1) PIANIFICARE L'ESPERIMENTO : calcolo quantità di tutti i componenti

2) PREPARARE LA REAZIONE IN LABORATORIO :

preparare una miscela di reazione di tutti i componenti

- scongelare i reagenti (tranne la Taq polimerasi) ed i campioni di DNA
- preparare la MIX di reazione

Primers : forward (FW) e reverse (REV)

MIX DI REAZIONE : Taq polimerasi

Tampone per Taq

Nucleotidi fosforilati dNTPs (A/G/C/T)



Aliquotare la mix nelle singole provette contenenti il DNA da amplificare

Trasferire i campioni contenenti DNA+ MIX con i reagenti di PCR nel TERMOCICLATORE ed avviare la reazione

## Pianificare l'esperimento

	Conc. madre iniziale	Conc. finale	μl s. madre /1 provetta (Volume iniziale incognito)	n° campioni	μl s. madre / x n campioni
Acqua NFW		q.b. a 23 μl (vol finale -vol DNA)		10	
Buffer per Taq*	5X	1X		10	
dNTPs	10mM	0.6mM		10	
fw primer	10μM	0.4μM	1	10	10
rev primer	10μM	0.4μM	1	10	10
Taq DNA Polym	5 U/μl	0.03 u/μl		10	
DNA			2		
Volume finale di reazione :			25μl		

Calcolo per conoscere il volume di soluzione da metter nella mix se conosco le **concentrazioni INIZIALE e FINALE**

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

Es. : Calcolo del volume di primer fw

$$C_f = 0.4\mu\text{M}$$

$$V_f = 25\mu\text{l}$$

$$C_i = 10\mu\text{M}$$

$$V_i = (0.4 \times 25) / 10 = 1 \text{ microlitro}$$

$C_i$  = Concentrazione iniziale

$C_f$  = Concentrazione finale

$V_f$  = Volume finale (di reazione)

$V_i$  = Volume iniziale (incognita)

## ESERCITAZIONE :

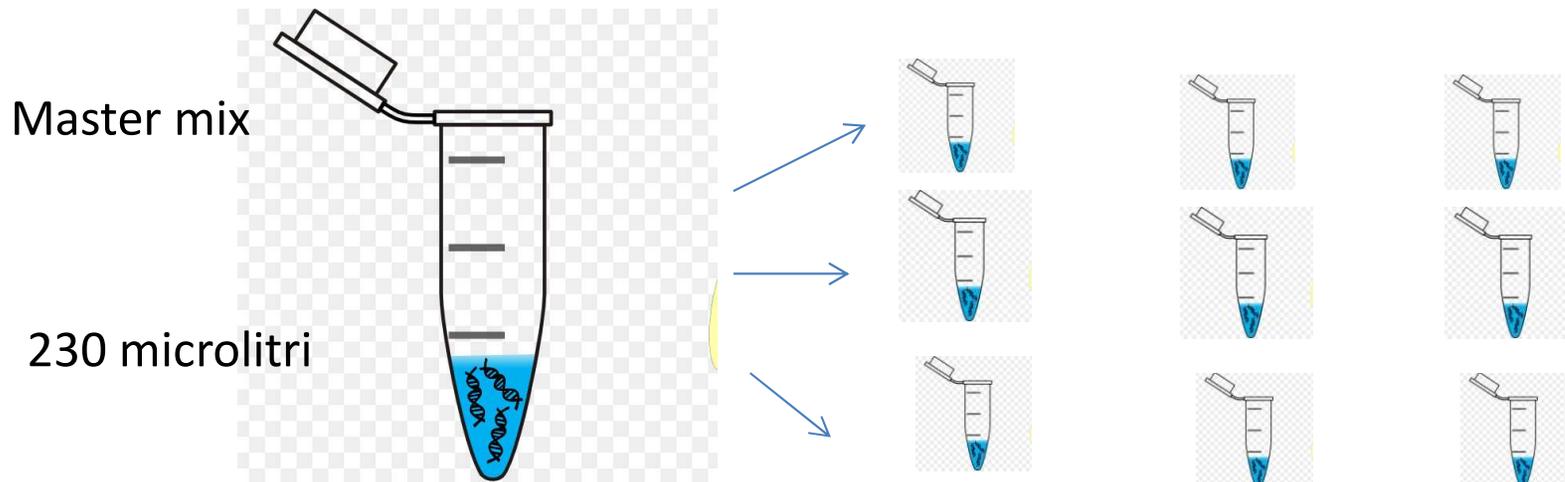
- 1) calcolare i volumi di Buffer, dNTPs , Taq
- 2) Calcolare il volume di acqua necessario in ogni provetta per raggiungere il volume finale (25  $\mu$ l)
- 3) calcolare i volumi necessari per preparare la mix per amplificare 9 campioni.  
Il calcolo si fa considerando sempre 1 campione aggiuntivo : 9+1

	Conc.madre iniziale	Conc. finale	$\mu$ l s. madre /1 provetta (Volume iniziale incognito)	n° campioni	$\mu$ l s. madre / x n campioni
Acqua NFW		q.b. a 23 $\mu$ l (vol finale -vol DNA)		10	
Buffer per Taq*	5X	1X		10	
dNTPs	10mM Mix	0.6mM		10	
fw primer	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1	10	10
rev primer	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1	10	10
Taq DNA Polym	5 U/ $\mu$ l	0.03 u/ $\mu$ l		10	
DNA			2		
Volume finale di reazione :			25 $\mu$ l		

## Reazione di PCR risultato

	Conc.madre iniziale	Conc. finale	$\mu\text{l}$ s. madre /1 provetta (Volume iniziale incognito)	n° campioni	$\mu\text{l}$ s. madre / x n campioni <b>MASTER MIX</b>
NFW		q.b. a 23 $\mu\text{l}$ (vol finale –vol DNA)	14,35	10	143,5
Buffer*	5X	1X	5	10	50
dNTPs	10mM Mix	0.6mM	1,5	10	15
fw primer	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$	1	10	10
rev primer	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$	1	10	10
Taq DNA Polym	5 U/ $\mu\text{l}$	0.75u	0,15	10	1,5
DNA			2		
Volume finale di reazione :			25 $\mu\text{l}$		230

Campioni da amplificare:  
23  $\mu\text{l}$  reagenti + 2  $\mu\text{l}$  DNA





## ESEMPIO DI CICLO DI AMPLIFICAZIONE (IN TERMOCICLATORE)

Ciclo	OYDV	
Denaturazione iniziale	95°C-5'	
<b>Denaturazione *</b>	<b>94°C-1'</b>	} 35 cicli
<b>Innesco *</b>	<b>57°C-1'</b>	
<b>Estensione *</b>	<b>72°C-1'</b>	
Estensione finale	72°C-10'	

## Fasi della diagnosi molecolare mediante PCR

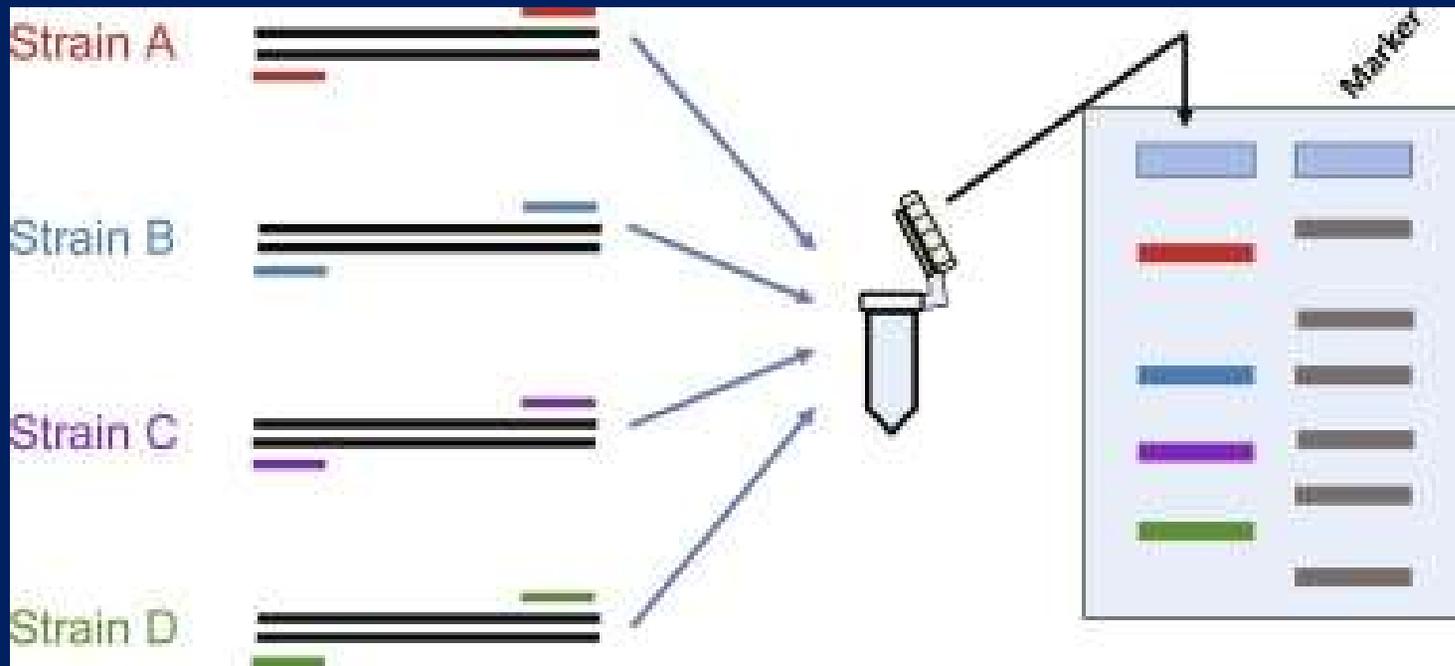
Si distinguono tre fasi:

- 1 Estrazione e purificazione del DNA l'RNA per rimuovere gli inibenti
- 2 Amplificazione in termociclatore (PCR)
- 3 Visualizzazione del prodotto di sintesi su gel di agarosio (elettroforesi)

(Se il peso molecolare del target amplificato non ha valore diagnostico, il prodotto di PCR deve essere sequenziato per fornire le informazioni necessarie alla identificazione del patogeno)

## Diagnosi di *Pseudomonas syringae* actinidia Mediante MULTIPLEX PCR

LA MULTIPLEX PCR amplifica contemporaneamente, nella stessa mix di reazione, mediante svariate coppie di primers



## Diagnosi di *Pseudomonas syringae actinidiae* Mediante MULTIPLEX PCR

MULTIPLEX PCR :

DUPLEX PCR : Gallelli A, L'Aurora A & Loreti S 2011. Journal of Plant Pathology 93 (2), 425-435.

PCR CON DUE COPPIE DI PRIMERS:

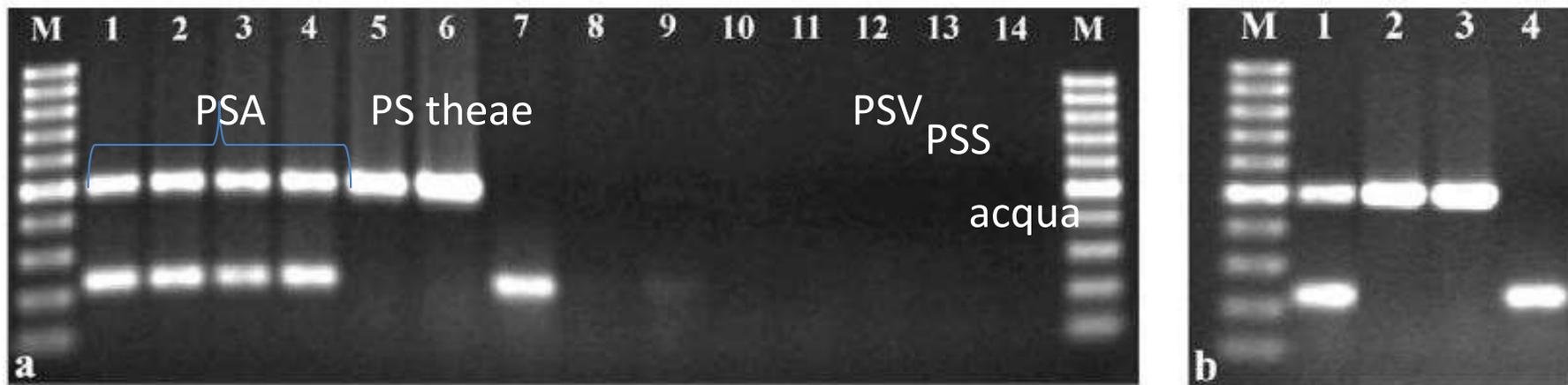
KN-F (5' – CACGATACATGGGCTTATGC – 3')

KN-R (5' – CTTTTTCATCCACACACTCCG – 3')

AvrDdpx-F (5' – TTTCGGTGGTAACGTTGGCA – 3')

AvrDdpx-R (5' – TTCCGCTAGGTGAAAAATGGG – 3')

## Diagnosi di *Pseudomonas syringae actinidiae* Mediante MULTIPLEX PCR



**Fig. 2.** Duplex-PCR from bacterial suspension ( $10^8$  CFU/ml). a. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* ISF Act.1, ISPaVe 019, ISPaVe 020, NCPPB 3740 (lanes 1-4), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 and *P. syringae* pv. *theae* CFBP 4097 (lanes 5-6), *Pseudomonas avellanae* NCPPB 3872 (lane 7), *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (lane 8), *P. syringae* pv. *glycinea* ISPaVe 1155 (lane 9), *P. syringae* pv. *syringae* OMP-BO 4250,1 (lane 10), *P. syringae* pv. *papulans* NCPPB 2848 (lane 11), *P. viridiflava* OMP-BO 4254A,1 (lane 12), *P. syringae* pv. *syringae* OMP-BO3909B,1 (lane 13), water control (lane 14). b. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* ISF 8.57 (lane 1), *P. syringae* pv. *tomato* NCPPB 2563 and *P. syringae* pv. *theae* NCPPB 2598 (laned 2-3), *P. avellanae* ISPaVe 1267 (lane 4). M: molecular markers (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas, Lithuania).

PSA : *Pseudomonas syringae actinidiae*

PSV : *Pseudomonas syringae viridiflava*

PSS : *Pseudomonas syringae syringae*

## Diagnosi di *Pseudomonas syringae actinidiae* Mediante MULTIPLEX PCR

La reazione di PCR può essere eseguita con il kit Qiagen Multiplex PCR, come segue:

Master MIX : 25 ml

Primers 10mM : 1  $\mu$ l di ognuno (concentrazione finale: 0.2 mM)

DNA : 4  $\mu$ l (in caso di estratto da pianta)

5  $\mu$ l (in caso di DNA da sospensione batterica)

Acqua: q.b. a 50 microlitri di volume finale

CICLO (modificato rispetto a quello del protocollo EPPO secondo indicazioni del kit Qiagen :

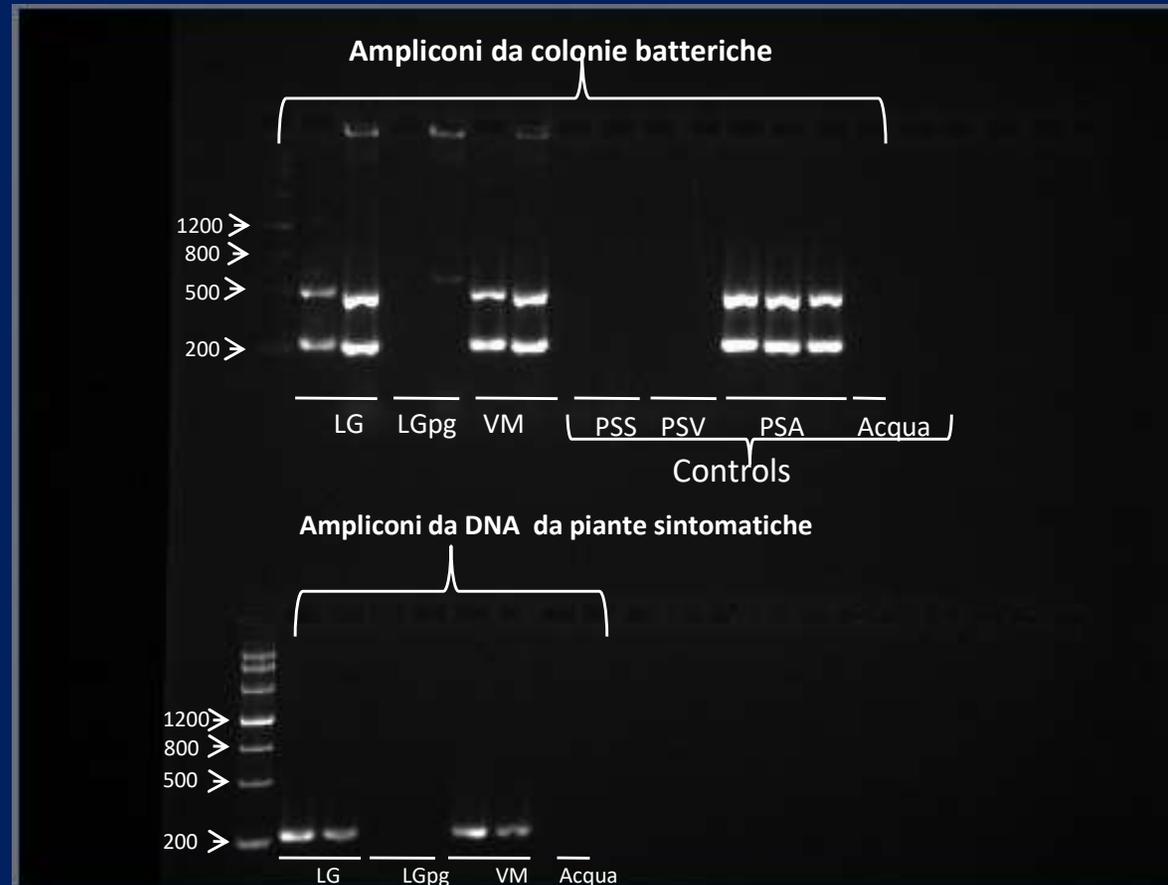
**15'** a 95 °C (per attivazione della Taq Hot Start del kit M PCR Qiagen)

30'' a 94 °C

**90''** a 63°C (durata imposta da protocollo kit M PCR Qiagen)

50'' a 72 °C

LG: PIANTE VAR. HAYWARD, di 6 e 12 anni  
 LGpg : piante var. Bo.Erica (in vaso, di 1 anno)  
 VM: piante var. Bo.Erica di 2 anni



Pettine superiore, pozzetti:

- 1 LG colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 2 LG colt. Batterica tal quale
- 3 LGpg colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 4 LGpg colt. Batterica tal quale
- 5 VM colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 6 VM colt. Batterica tal quale
- 7 PSS colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 8 PSS colt. Batterica tal quale
- 9 PSV colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 10 PSV colt. Batterica tal quale
- 11 PSA DNA
- 12 PSA colt. Batterica bollita diluita in 1 ml
- 13 PSA diluiz. 1:10 di 12
- 14 acqua

Pettine inferiore, pozzetti:

- 1 LG DNA da pianta sintomatica
- 2 LG diluiz 1:10 di 1
- 3 LGpg DNA da pianta sintomatica
- 4 LGpg diluiz 1:10 di 3
- 5 VM DNA da pianta sintomatica
- 6 VM diluiz 1:10 di 5
- 7 acqua

**Sono stati caricati 3 microlitri di Prodotto di pcr/pozzetto**

Gel 2 , 1% agarosio, **1,30 min migrazione a 70 volt**

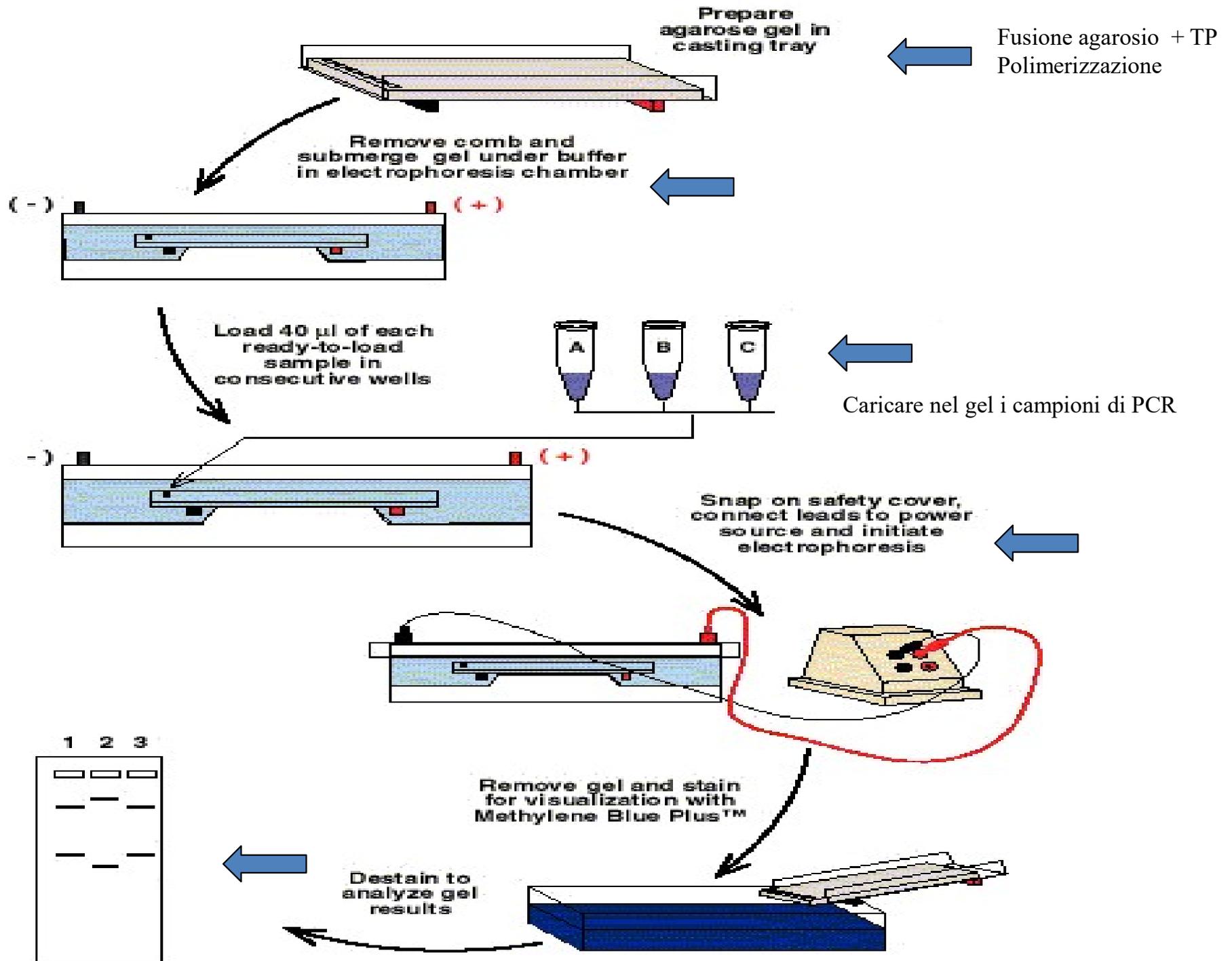
Marker: Gel Pilot wide Range Qiagen

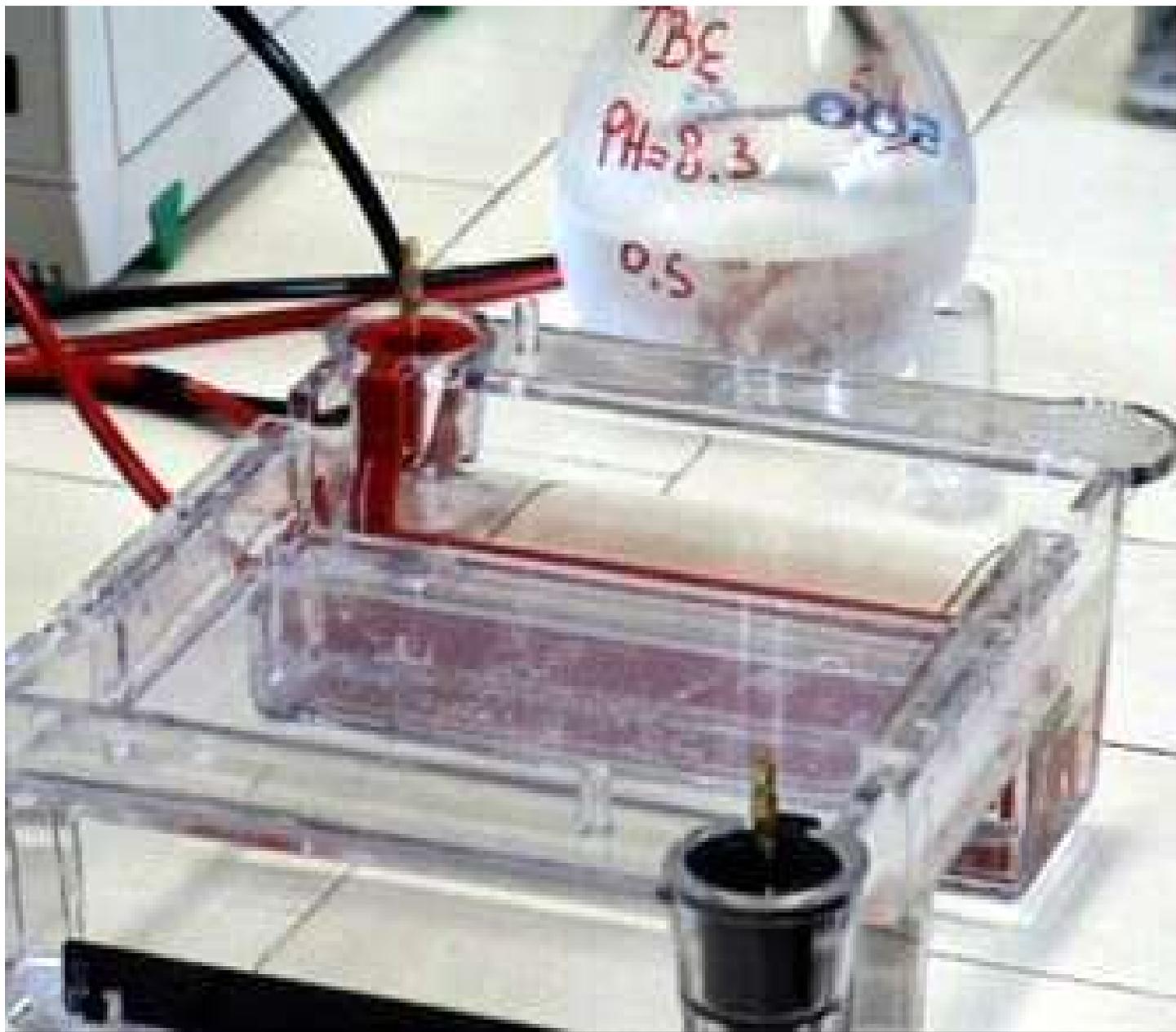
# Elettroforesi

Separazione di frammenti di acido nucleico, in funzione del peso molecolare.

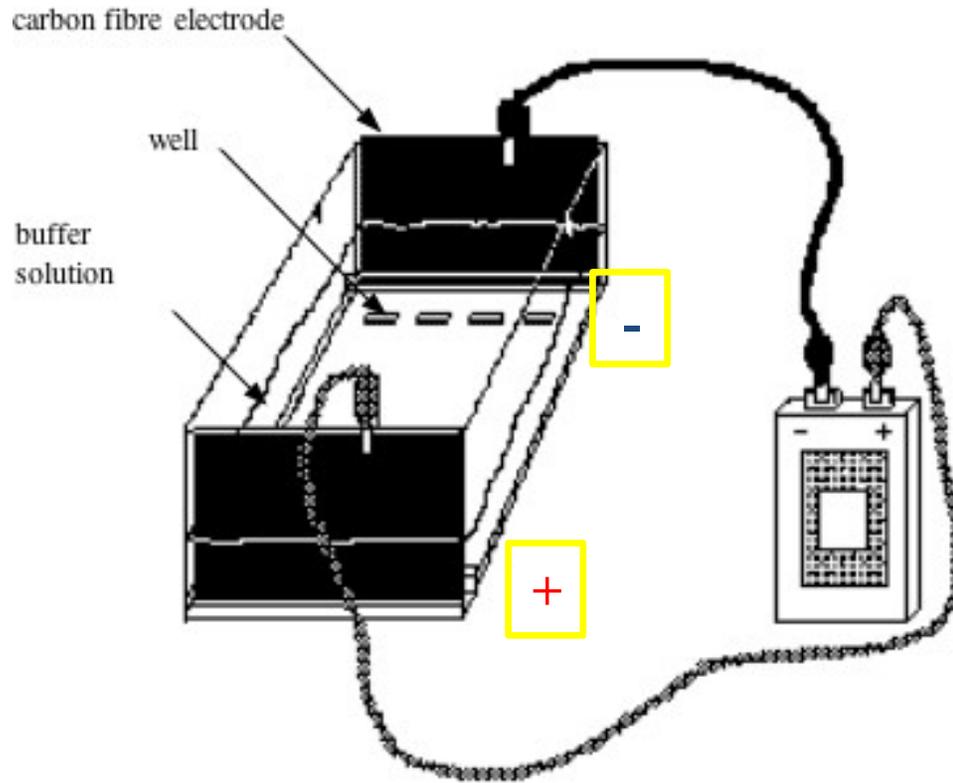
Il principio di base è quello di un setaccio molecolare attraverso il quale frammenti di molecole di DNA vengono fatti passare mediante un campo elettrico.

Frammenti di DNA, carichi negativamente per i residui di fosfato, in un campo elettrico tendono ad andare verso il polo positivo





# Elettroforesi

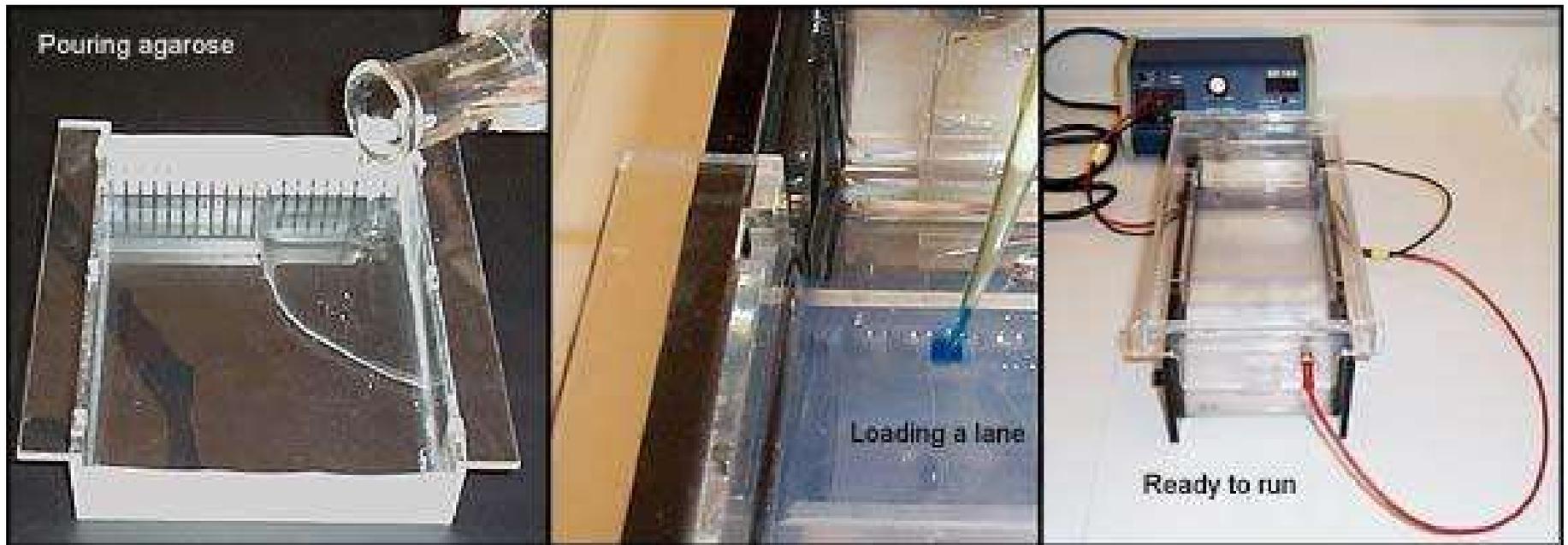


## Reagenti necessari

- Agarosio (>100 bp)
- Tampone elettroforetico (TAE o TBE)
- Colorazione con intercalante "SYBR safe"
- Loading buffer
- Marker
- Transilluminatore UV

L'**agarosio** è un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro a seconda della sua concentrazione. E' quindi la percentuale di agarosio che determina la gamma dei frammenti di DNA separabili - **concentrazione 1-2.5%**: maggiore è la dimensione del DNA minore sarà la concentrazione di agarosio da utilizzare (=maglia del polimero più larga).





Per visualizzare le bande elettroforetiche, viene aggiunta alla preparazione del gel una quantità di **intercalante** del DNA che se esposto a luce UV emette fluorescenza (SYBR-Safe).

Il gel viene quindi posto in apposita vaschetta elettroforetica. Dopo la loro polimerizzazione viene riempita del **tampone di corsa (TBE, TAE)**.

#### **Tris-borato o Tris-acetato**

*Il Tris contenuto nel tampone è un sale molto usato nei laboratori. Tampona tra pH7 e pH8, un range in cui il DNA si mantiene molto bene. L'EDTA, invece, è un chelante che sequestra ioni  $Mg^{2+}$  presenti in soluzione e che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi).*

Prima di caricare il gel si aggiunge al campione un colorante con velocità di migrazione nota in modo da seguire l'andamento dell'elettroforesi. Tale colorante è chiamato **Loading buffer**.

Sul gel si riserva un pozzetto in cui verrà messo il **marker**. Questo è composto da una miscela di frammenti lineari di DNA i quali migrano nel gel con dimensioni note.

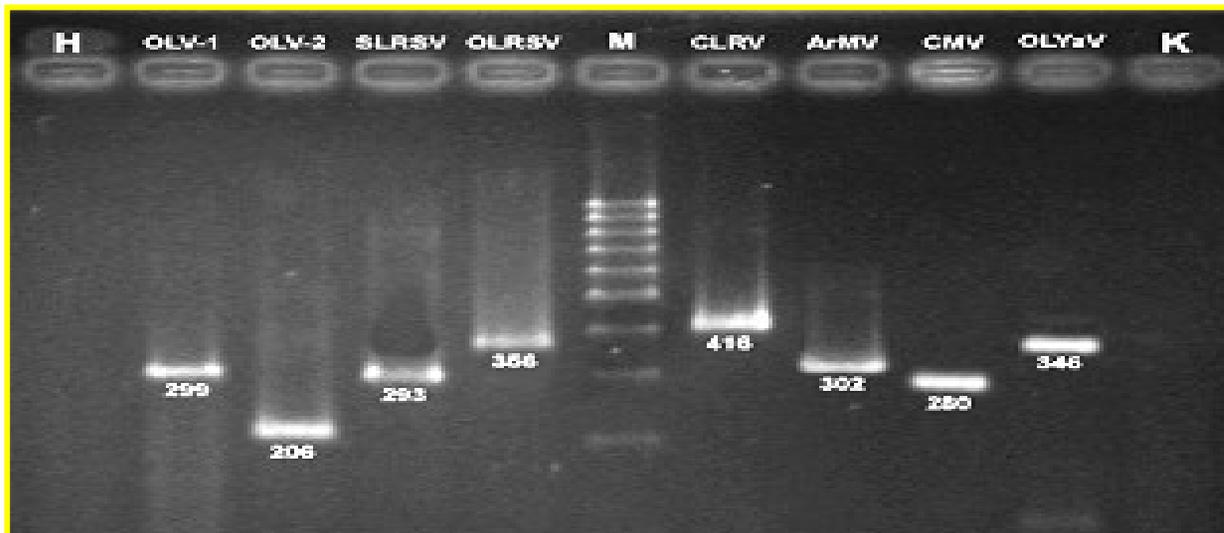
Nella corsa elettroforetica, si deve applicare una **differenza di potenziale** proporzionale alla distanza tra gli elettrodi. Si applica un **voltaggio** di **3-5V/cm** (calcolato come distanza tra i due elettrodi).

*Se fosse maggiore si rischierebbe di scaldare il tampone di corsa e quindi di danneggiare il DNA.*

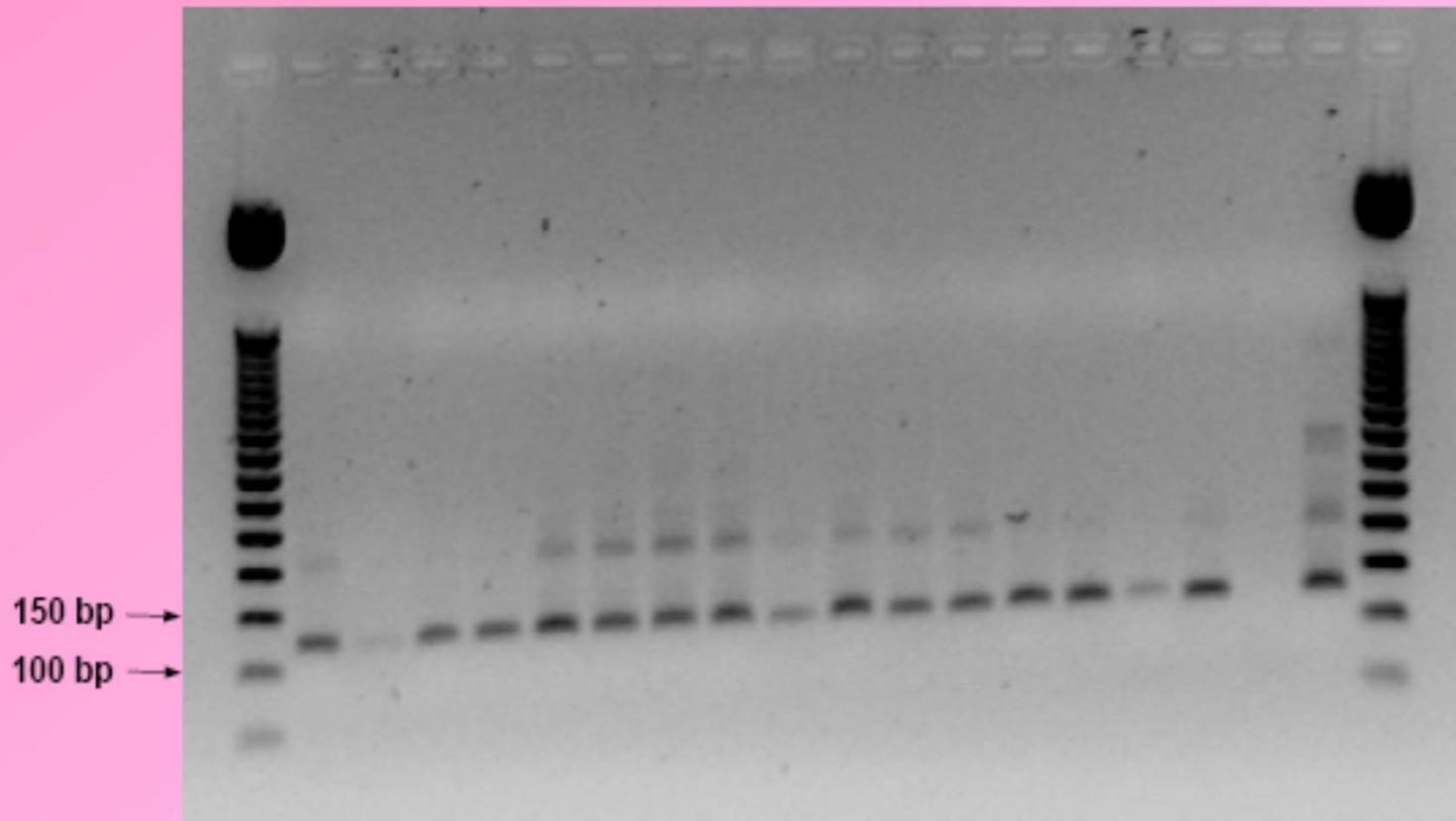
# Elettroforesi su gel di agarosio

1. Caricamento di campioni amplificati su gel di agarosio
2. Separazione degli ampliconi mediante corsa elettroforetica

3. Visualizzazione dei prodotti di amplificazione (con apparato fotografico gel-doc o transilluminatore UV)

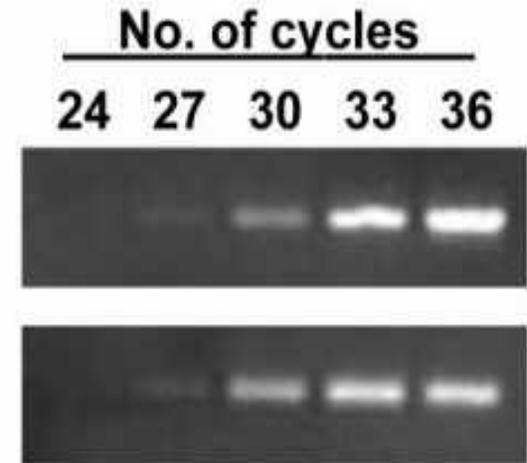
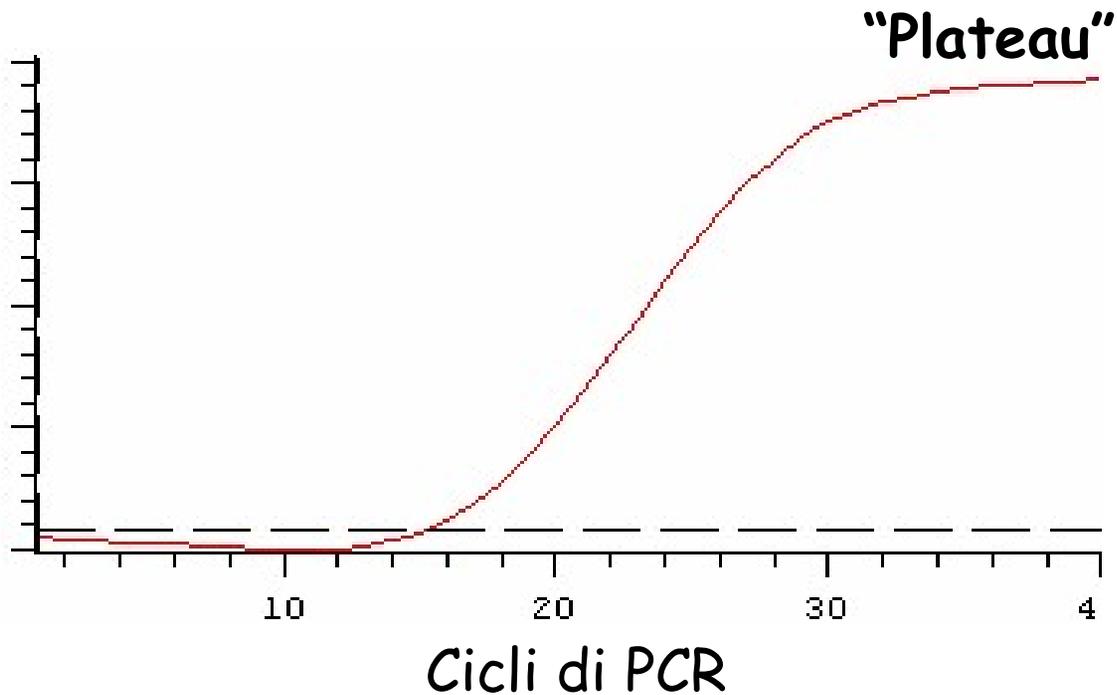


# Elettroforesi su gel di agarosio



La velocità di migrazione dei prodotti di amplificazione è inversamente proporzionale alla loro grandezza ed ha come riferimento marker molecolari a peso molecolare noto.

# Visualizzazione del prodotto di sintesi su gel di agarosio (elettroforesi)



Effetto "plateau":

Esaurimento Taq

Accumulo dei prodotti