

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 28

GENETICA AGRARIA – PLANT GENETICS

Responsabile: PASQUALINA WOODROW

Settori Scientifico-Disciplinari di riferimento: AGR/07

RADoR: PASQUALINA WOODROW

Tipologia: GENETICO, AGRONOMICO

Gruppi afferenti: GENETICA AGRARIA e FISILOGIA DELLE PIANTE COLTIVATE

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- piano rialzato del corpo A del DiSTABiF (locale);
- dimensioni:
- n. 2 postazioni di lavoro

Nel laboratorio di genetica agraria si seguono diversi filoni di ricerca su diverse specie di piante di interesse agrario tra cui: studio della correlazione funzionale delle famiglie retrotrasposoniche finalizzato alla comprensione, alla struttura, alla organizzazione ed all'evoluzione del genoma; studio delle box regolatorie di origine trasposonica, implicate nella risposta delle piante agli stress abiotici; caratterizzazione molecolare (SNPs, RAPD, AFLP, DGGE, retrotrasposoni); studio degli effetti dello stress da alto sale ed alta luce sull'espressione dei geni coinvolti nella sintesi di metaboliti secondari e cambiamenti metabolici di piante di grano duro; studio dei cambiamenti di espressione genica dei geni codificati proteine di resistenza coinvolte nelle interazioni pianta-patogeno; studio dell'effetto dei Biostimolanti sull'efficienza dell'uso delle risorse e la tolleranza allo stress.

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Polverizzazione di materiale vegetale in azoto liquido.
2. Estrazione degli acidi nucleici e corsa elettroforetica in gel di agarosio
3. Isolamento di geni mediante reazioni PCR
4. Caratterizzazione molecolare mediante SNPs, AFLP, RAPD, SSAP, DGGE
5. Analisi trascrizionale mediante Real-Time PCR, RT-PCR.
6. Esperimenti d'ibridazione mediante Southern Blotting

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DEL CICLO DI LAVORO E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Polverizzazione di materiale vegetale in azoto liquido

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, visiera per liquidi criogenici).

Il materiale vegetale fresco viene polverizzato in un mortaio con l'utilizzo di azoto liquido. Aliquote di circa 10-50 mg di materiale polverizzato vengono trasferite in provette Eppendorf® da 1.5 o 2.0 mL e conservate a -80 °C.

2. Estrazione degli acidi nucleici

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, visiera per liquidi criogenici) e lavorare sotto cappa chimica per la preparazione delle soluzioni.

I campioni da sottoporre ad analisi sono incubati con tamponi di lisi e centrifugati a 5000 rpm. Gli acidi nucleici sono allontanati mediante l'aggiunta di una soluzione di Cloroformio, alcool isoamilico (24:1) e precipitati con alcool etilico e isopropanolo. I campioni di RNA e DNA sono poi risospesi in acqua distillata e corsi in gel di agarosio all'1% (contenete bromuro di etidio) in una camera elettroforetica contenete Tampone TAE1X.

3. Isolamento dei geni mediante reazioni di amplificazione PCR (punti 3 e 4)

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio)

Per isolamento dei geni sono utilizzati Kit commerciali. Ogni Kit contiene l'enzima DNA polimerasi, i deossinucleotidi trifosfati 100 mM, soluzione tampone contenete NaCl, Mg²⁺, DMSO e oligonucleotidi 20pmol. Le reazioni allestite in tubi da 200 µl sono incubate in un termociclatore per due ore.

Il prodotto della reazione è sottoposto a corsa in gel di agarosio all'1% (contenete bromuro di etidio) in una camera elettroforetica contenete Tampone TAE1X ed eluiti con una lama bisturi per poi essere purificati usando il kit di purificazione che utilizza colonnine dotate di filtro di nylon carico positivamente. La caratterizzazione molecolare delle piante mediante uso di marcatori SNPs, RAPD, AFLP, SSAP, DGGE e Retrotrasposoni è effettuata attraverso varianti di amplificazione PCR (Enzimi di restizioni, Polimerasi) utilizzando kit commerciali specifici in base al tipo di marcatore utilizzato.

4. Analisi trascrizionale

DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).

L'analisi d'espressione dei geni d'interesse è effettuata utilizzando le reazioni di amplificazione RT-PCR e Real-Time PCR. Anche in questo caso si utilizzano Kit commerciali contenenti l'enzima Trascrittasi inversa, deossinucleotidi trifosfati 100 mM, soluzione tampone contenete NaCl, Mg²⁺, DMSO e Sybr green e oligonucleotidi 20pmol. La reazione è poi incubata in un termociclatore e l'analisi quantitativa e rilevata attraverso l'uso di software specifici.

5. Esperimenti d'ibridazione

DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).

In questi esperimenti il DNA è trasferito per capillarità dal gel di agarosio ad un filtro di nitrocellulosa carico positivamente. L'identificazione del gene è effettuata attraverso l'uso di sonde marcate con la digoxigenina. La rilevazione del segnale viene effettuata mediante l'utilizzo di anticorpi antidigoxigenina.

Lista delle attrezzature presenti:

- Centrifuga per Eppendorf
- pH-metro
- Piastre riscaldanti/agitanti n. 2
- Pompe a membrana da vuoto n. 1
- Termociclatori (PCR)
- Vortex
- Camera elettroforetica per DGGE
- Camera elettroforetica per gel di poliacrilammide
- Camera elettroforetica per gel di agarosio
- HPLC
- Bilancia analitica

Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)

- Cappa chimica

Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori

- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice (verie misure)
- Visiera per liquidi criogenici
- Visiera protettiva
- Guanti per liquidi criogenici
- Grembiule per liquidi criogenici
- Guanti per autoclave
- Mascherine a carbone attivo per acidi/solventi
- Mascherine per polveri

Elenco taglienti

Lama bisturi

Categorie ISI WEB di riferimento

Biochemistry, Food science, Genetics, Plant science,

Categorie ERC di riferimento

LS1_2 Biochemistry

LS2_6 Genomics (e.g. comparative genomics, functional genomics)

LS2_8 Transcriptomics

LS2_10 Metabolomics

LS2_12 Bioinformatics

LS9_5 Food sciences