

Determinazione del polimorfismo del gene TAS2R38 coinvolto nella percezione del gusto amaro.

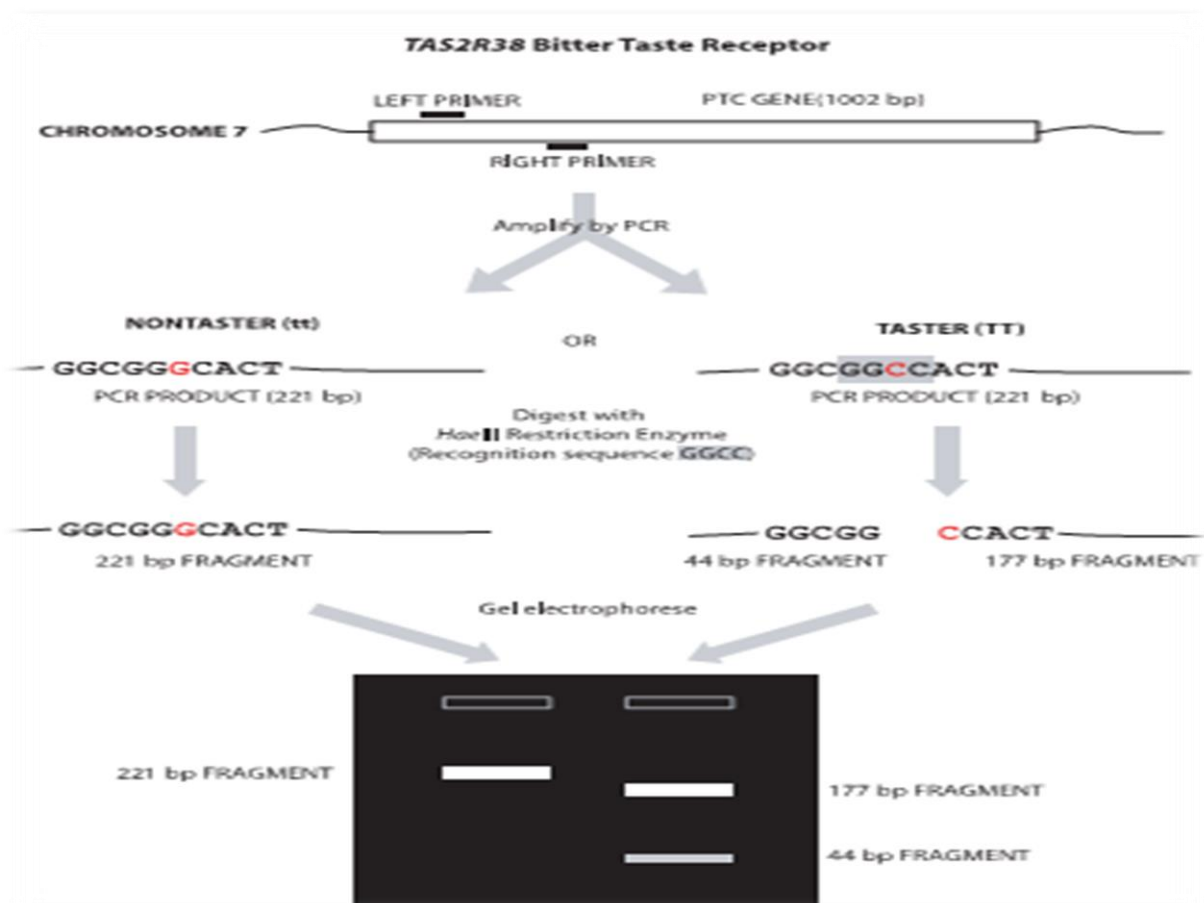
I mammiferi riconoscono soltanto 5 gusti di base: **dolce, acido, amaro, salato e umami** (il sapore di glutammato).

Il riconoscimento dei gusti è mediato da cellule sensoriali specializzate (papille gustative) connesse direttamente al sistema nervoso centrale. La percezione del gusto è un processo che si compone di due fasi: inizialmente le molecole si legano a recettori specifici posizionati sulla superficie delle cellule sensoriali, poi le cellule sensoriali generano un impulso nervoso elaborato dal cervello. Per esempio, la stimolazione di cellule sensoriali deputate a rispondere allo stimolo del **dolce** genera la percezione del sapore dolce nel cervello.

Il gusto amaro viene riconosciuto da recettori proteici nella cui produzione sono implicati circa 30 geni differenti (28 geni funzionali validati e 16 pseudogeni). Uno dei più importanti è il gene che codifica per il recettore sensibile alla **phenylthiocarbamide (PTC)**, **TAS2R38** (fra gli altri permette di discriminare e apprezzare il ricercato e particolare gusto amaro della cicoria).

Nella popolazione umana tale gene presenta 3 siti nucleotidici polimorfici (ossia differenti forme geniche alleliche) e noi analizzeremo uno di questi polimorfismi genici, che genera due diverse forme geniche alleliche, l'allele dominante **T** e il recessivo **t**.

Gli individui **omozigoti recessivi** (non-taster **tt**) non percepiscono l'intenso gusto amaro della **PTC**, a differenza dei tasters (**omozigoti dominanti TT** e **eterozigoti Tt**) che lo percepiscono in modo simile. L'allele recessivo **t** a livello della base 145 della sequenza di DNA del gene cromosomico, possiede una **Guanina** al posto della **Citosina** che è presente nell'allele dominante **T**, questa differenza determina l'assenza nell'allele recessivo **t** del sito di taglio del DNA riconosciuto dall'enzima di restrizione **HaeIII (GG\CC)** (**T = GG\CC** ; **t = GG\GC**).



L'esperienza di laboratorio si articolerà in 2 sessioni:

Sessione A:

- 1 Estrazione di DNA genomico da tampone buccale/salivare;
- 2 Amplificazione con PCR di un tratto del gene *TAS2R38* contenente il sito polimorfico considerato
- 3 Preparazione del Gel d'Agarosio

Sessione B:

- 1 Digestione dell'amplificato con l'enzima di restrizione **HaeIII (GG\CC)**
- 2 Analisi dei prodotti di restrizione del DNA mediante Elettroforesi in gel di agarosio
- 3 Interpretazione dei risultati e discussione.

A1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TAMPONE BUCCALE

Ogni protocollo di estrazione del DNA necessita fondamentalmente di 2 passaggi: la lisi cellulare, per il rilascio del DNA, e l'allontanamento di tutti quei materiali e molecole (proteine, sali, composti organici, RNA, ecc.) che potrebbero interferire con le successive fasi di analisi. L'estrazione del DNA genomico può avvenire con l'impiego di solventi organici (es: fenolo, cloroformio, alcoli), oppure tramite l'utilizzo di appositi kit rapidi di estrazione e purificazione. La procedura di estrazione scelta è riportata sotto:

1. Eseguire il tampone buccale roteando per circa **30"** secondi il tampone cotonato sulla superficie interna della guancia e lasciare asciugare il tampone per almeno **5'** minuti a temperatura ambiente (**TA**)
2. Immergere il tampone in una provetta da 1,5 ml contenente **22 µl** di soluzione **T (Tissue Prep Solution) + 180 µl** di soluzione di estrazione **E (Extraction Solution)**; lasciare incubare per **3'-5'** (min.) a temperatura ambiente (**TA**) roteando 3-4 volte lentamente il tampone all'interno della provetta per agevolare il distacco delle cellule.
3. Spremere bene il tampone contro la parete della provetta, buttare il tampone e chiudere la provetta.
4. Miscelare con agitatore "Vortex" per **20"- 40"** (sec.).
5. Incubare il campione a **TA** per circa **8'**.
6. Incubare il campione a **95-100°C** per **3'-4'**.
7. Aggiungere **180 µl** di soluzione di neutralizzazione **N (Neutralization Solution)** e miscelare con Vortex per **10"**
8. Effettuare una breve centrifugazione in minicentrifuga per **15-30"** a **5000 rpm** per precipitare eventuali frammenti cellulari ecc.

Il campione così ottenuto contiene il **DNA genomico** umano (**Estratto totale**) e può essere conservato a 4°C per qualche giorno, oppure essere utilizzato subito per l'amplificazione del DNA mediante PCR.

A2 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR DEL TRATTO DI SEQUENZA GENICA (DNA) CONTENENTE IL SITO NUCLEOTIDICO POLIMORFICO

Preparazione della miscela di amplificazione per 1 campione:

REAGENTE	VOLUME µl
Mix di reazione C	16 µl
Estratto totale DNA Genomico	4 µl
VOLUME TOTALE	20 µl

Protocollo di amplificazione PCR del DNA

Fasi (step)	Temperatura °C	TEMPO	N° CICLI
Denaturazione Iniziale e attivazione della DNA Polimerasi	94	3 minuti	1 x
Denaturazione	94	15 secondi	35 x
Appaiamento primers	68	15 secondi	
Estensione primers (sintesi DNA)	72	30 secondi	
Estensione finale	72	2 minuti	1 x

Le microprovette vengono incubate nel Termociclatore per l'effettuazione della reazione di amplificazione.
Tempo totale PCR circa 60 minuti.

Componenti della mix di reazione C:
PCR Buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , 0.002% (w/v) gelatin.
dNTPmix: 400 µM di ognuno dei 4 deossinucleotidi trifosfati
JumpStartTaq polimerasi 1U
JumpStart Taq antibody 1U
Acqua Ultrapura sterile (MilliQ) + Primers Forward e Reverse 0,4 µM ognuno

A3 PREPARAZIONE DEL GEL DI AGAROSIO al 2%

1. Allestire la vaschetta per la preparazione del gel d'agarosio e inserire il pettine per formare i pozzetti
2. Pesare la giusta quantità di agarosio (0,8 gr) e metterlo in una beuta di vetro PIREX
3. Aggiungere alla beuta con agarosio il volume desiderato di Tampone elettroforetico 1X (40 ml di BIONIC 1X)
4. Mettere la beuta nel microonde (High) o su piastra riscaldante\agitatore (200°C) fino a completa dissoluzione dei granuli di agarosio (la soluzione deve diventare trasparente e omogenea)
5. Attendere che il gel si raffreddi a circa 50-60°C e aggiungere al gel liquido il colorante del DNA Gel-Red, così da ottenere una concentrazione finale 1X (3,5 µl)
6. Versare la soluzione di gel d'agarosio nella vaschetta per la preparazione del gel evitando la formazione di bolle.
7. Lasciar solidificare il gel per circa 30' a TA
8. Porre il gel nella cella elettroforetica cosicché i pozzetti si trovino dal lato dell'elettrodo negativo (nero)
9. Riempire la cella elettroforetica con tampone BIONIC 1X fino a coprire l'intera superficie del gel
10. Rimuovere delicatamente il pettine facendo attenzione a non rompere il gel

B1 DIGESTIONE DEGLI AMPLIFICATI CON ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE SEQUENZA SPECIFICA: *Hae III* (GG\CC)

La caratteristica più importante di un enzima di restrizione è la capacità di tagliare il DNA a doppia elica a livello di specifiche sequenze di coppie di basi chiamate "siti di restrizione". Per lo studio del polimorfismo **145 c/g (49 pro/ala)** del gene *TAS2R38* utilizzeremo l'enzima di restrizione *Hae III* (GG\CC). Nella nostra esperienza, la mix di digestione enzimatica avrà un volume totale di **20 µl** e la composizione riportata sotto:

REAGENTE	VOLUME µl
Tampone 10X + <i>Hae III</i> 10U/µl + Acqua MilliQ	10 µl
DNA (prodotto di PCR)	10 µl
Volume totale	20 µl

La mix di digestione sarà lasciata incubare per circa 15'-30' a 37°C.

B2 SEPARAZIONE ED ANALISI DEI FRAMMENTI DI RESTRIZIONE DEL DNA MEDIANTE ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

I frammenti di DNA ottenuti dalla digestione enzimatica, possono essere facilmente separati e visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con fluorocromi che legano il DNA come il Gel-Red.

CARICAMENTO DEL GEL ED ELETTROFORESI

REAGENTE	VOLUME µl
Campione (Amplificato digerito)	9
VOLUME TOTALE	9

REAGENTE	VOLUME µl
Campione (Amplificato NON digerito)	9
VOLUME TOTALE	9

(Se necessario aggiungere 1-2 ul di Loading Dye 10x (colorante di caricamento) a ciascun campione)

1. Caricare i volumi indicati in pozzetti separati per ogni campione, usando un puntale nuovo per ogni campione.
2. Caricare il Marcatore di peso molecolare (circa 5 µl).
3. **Annotare l'ordine dei campioni caricati.**
4. Chiudere la cella elettroforetica e collegare gli elettrodi all'alimentatore
5. Accendere l'alimentatore, regolarlo su 130 Volt e far "correre" per 20'-**30'**
6. Spegnerne l'alimentatore e aprire la cella elettroforetica
7. Togliere il supporto con il gel e osservare le bande al trans-illuminatore UV

