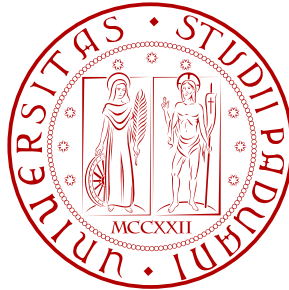


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE



ELABORATO DI LAUREA

Analisi del promotore di p23 in Arabidopsis thaliana
mediante tecniche di RT-PCR semiquantitativa

TUTOR: Prof.ssa Fiorella Lo Schiavo
Laboratorio di Biologia e Fisiologia delle Piante

LAUREANDO: Gaetano Calabrese

ANNO ACCADEMICO: 2010/2011

Indice

1 Introduzione	1
2 Descrizione delle metodologie utilizzate	2
2.1 Estrazione e purificazione di RNA	2
2.1.1 Estrazione in fenolo-cloroformio	2
2.1.2 Purificazione con colonnine RNeasy Qiagen™	4
2.2 Reverse Transcription PCR	4
2.2.1 Oligo(dT) e Random Primers	5
2.3 RT-PCR semiquantitativa	5
2.4 Gel elettroforesi	6
3 Presentazione dei risultati ottenuti e commenti	6
4 Conclusioni	9
5 Riferimenti bibliografici	10

Analisi del promotore di p23 in *Arabidopsis thaliana* mediante tecniche di RT-PCR semiquantitativa

1 Introduzione

Il controllo dell'espressione di un gene può manifestarsi a livello della trascrizione, della traduzione, del processamento del trascritto, del trasporto o della degradazione del mRNA o della proteina. La generazione di proteine reporter, sotto il controllo del promotore d'interesse, può semplificare l'analisi di alcuni di questi complessi processi; si può infatti isolare la componente regolatoria caratteristica del promotore ed eliminare eventuali controlli trascrizionali e post-traduzionali sul gene che altererebbero i dati¹. La proteina oggetto del nostro studio è la p23, una proteina partner di Hsp90, quest'ultima appartiene alla famiglia delle "heat shock proteins", proteine sensibili allo stress termico, ed è nota per funzionare da "chaperone" molecolare, spesso coinvolta in interazioni con altre proteine. In particolare l'interazione di p23 con Hsp90 si ipotizza possa giocare un ruolo importante nello stabilizzare il folding di proteine regolatorie del citosol².

	Lunghezza CDS	TAIR Accession Number	Lunghezza Proteina	Peso Molecolare Proteina
p23-2	450 bp	AT3G03773	150	14.773 kDa
p23-1	723 bp	AT4G02450	241	25.470 kDa

Figura 1. Tabella con informazioni relative alle proteine d'interesse

Al fine di analizzare l'espressione di P23 in pianta, nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio sono state generate, tramite "floral dip" con *Agrobacterium*, diverse linee di *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. esprimenti il gene della β -glucuronidasi sotto controllo dei promotori di p23-1 e p23-2, due isoforme della stessa proteina, in modo da poter visualizzare, mediante saggio istochimico, i loro pattern d'espressione. Tra tutte le linee isolate sono state scelte la linea 1.3 per il promotore di p23-1 e la linea 10B per il promotore di p23-2, rispettivamente rinominate 1 e 2.

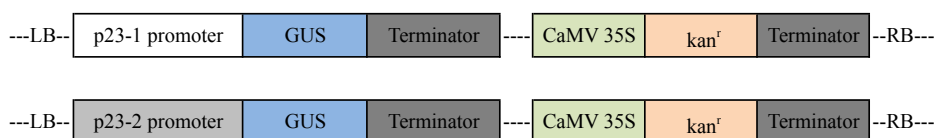


Figura 2. Rappresentazione del costrutto utilizzato per la trasformazione con *Agrobacterium*

Inizialmente lo scopo del mio lavoro è stato di comparare i livelli d'espressione della β -glucuronidasi in queste due linee con i rispettivi livelli di p23 endogene. Per far ciò sono stati confrontati i livelli del trascritto dei due geni tramite tecniche di RT-PCR semiquantitativa, utilizzando ELF1 α e Actina2, geni "housekeeping" costitutivamente espressi in *A. thaliana* per normalizzare l'RNA totale estratto in ciascun campione.

2 Descrizione delle metodologie utilizzate

Per effettuare l'analisi dei promotori di p23-1 e p23-2 si è proceduto innanzitutto all'estrazione dell'RNA totale da seedlings di 10 giorni. Nella linea 2 si è osservata una crescita più stentata. Successivamente si è passati ad uno step di purificazione in colonna, accompagnato da una prima analisi con gel elettroforesi per determinare la qualità dell'operazione. In seguito è stata eseguita una Reverse Transcriptase PCR in presenza di oligo(dT) o random esameri, in modo da ottenere due campioni di cDNA per ciascuna linea. Nell'ultimo passaggio questo cDNA serve come stampo per amplificare, con la RT-PCR semiquantitativa, i geni housekeeper, la p23 endogena e la glucuronidasi ectopica. L'ultimo step è consistito nella corsa degli amplificati su gel elettroforesi con successiva analisi ed interpretazione dei dati. Qui di seguito sono descritte in modo dettagliato tutte le tecniche utilizzate, ciascuna corredata di protocollo esecutivo e descrizione delle caratteristiche.

2.1 Estrazione e purificazione di RNA

L'acido ribonucleico, RNA, è un polimero formato da monomeri ribonucleotidici legati covalentemente tra loro. A differenza del DNA l'RNA risulta essere facilmente degradabile e ciò è fondamentale nel determinare la qualità dell'estrazione. Per questo motivo si è cercato di mantenere un ambiente sterile, non contaminato da RNAsi, le quali sono poco attive a temperature basse e in soluzioni non acquose. Un RNA puro e non degradato è la condizione che consente uno studio più preciso ed accurato: consiste in questo l'obiettivo del passaggio. L'estrazione avviene su seedlings di *Arabidopsis* di dieci giorni. Questi sono stati seminati su terreno MS-1/2 con Kanamicina $50\mu\text{g/ml}$ e sottoposti ad un periodo di vernalizzazione a 4°C per due giorni. In seguito sono stati spostati in una camera di crescita con ciclo giorno-notte controllato (long day, 16 ore luce-8 ore buio) e lasciati crescere per dieci giorni. In questo modo i seedlings delle due linee sono stati raccolti allo stesso stadio di sviluppo. In genere migliore è la condizione delle piante, maggiore è la quantità di RNA.

2.1.1 Estrazione in fenolo-cloroformio

Questa tecnica è comunemente utilizzata per separare efficacemente le proteine dagli acidi nucleici, e consiste nel trattare la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici con una miscela di sali guanidinio-fenolo-cloroformio, parzialmente immiscibile in acqua. Il protocollo può essere effettuato su 100-200 mg di campione polverizzato in azoto liquido e permette il recupero dell'RNA totale anche da piccole quantità di tessuto o cellule rendendo possibile l'impiego di queste anche per studi di espressione che richiedono di lavorare con un campione particolarmente puro³.

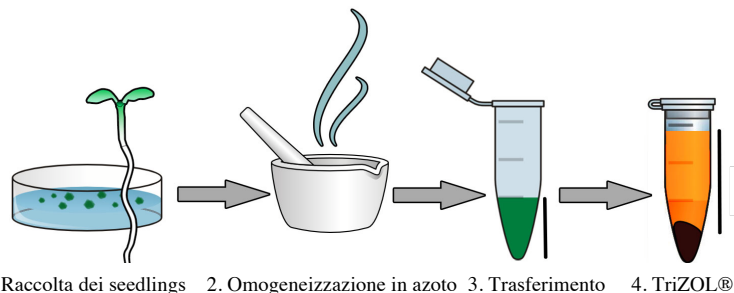


Figura 3. Visualizzazione con immagini degli steps dell'estrazione di RNA in fenolo-cloroformio

Alla polvere ottenuta dall'omogeneizzazione in mortaio viene aggiunto 1 ml di TRIzol, una soluzione contenente fenolo, guanidintiocianato, ammoniotiocianato, glicerolo, sodio acetato e acqua.

Questa soluzione, grazie alla presenza di guanidintiocianato, ha la capacità di denaturare le proteine ed assicurare l'integrità dell'RNA grazie proprio all'inattivazione dell'attività RNAsica durante la fase in cui le cellule vengono distrutte e i componenti rilasciati vengono disciolti. Il passaggio successivo prevede di mescolare per agitazione il campione fino all'ottenimento di una soluzione omogenea e di lasciarlo riposare a temperatura ambiente per cinque minuti. È poi prevista una centrifugazione di cinque minuti a 16000g a 4°C grazie alla quale si va a recuperare il surnatante eliminando il pellet formato dai componenti più pesanti delle cellule, un esempio sono le membrane.

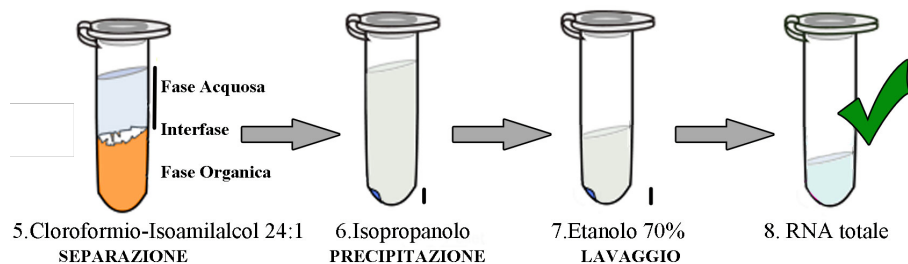


Figura 4. Visualizzazione con immagini degli steps dell'estrazione di RNA in fenolo-cloroformio

L'aggiunta di 400 μl di cloroformio-isoamil alcol 24:1 e un'ulteriore centrifugazione di quindici minuti a 16000g a 4°C permettono ai vari componenti di distribuirsi in due fasi: una soluzione acquosa trasparente in alto ed una fase organica rossa più in basso costituita da cloroformio e fenolo, collegate tra loro da un'interfase. Gli acidi nucleici, come RNA e DNA, si distribuiscono nella fase acquosa; le proteine, disciolte in fenolo, e i lipidi, disciolti in cloroformio, nella fase organica. L'isoamil alcol serve a ridurre la formazione di schiuma ed aiuta a mantenere inattivate le RNasi⁴. Viene recuperata con attenzione la fase acquosa e posta in un nuovo tubo da 1,5 ml. Si aggiungono 350 μl di isopropanolo e 350 μl di soluzione salina PBS mescolando poi delicatamente per inversione fino ad ottenere una soluzione limpida e si lascia riposare a temperatura ambiente per dieci minuti. Questa fase consiste nella precipitazione degli acidi nucleici. A livello atomico la forza elettrica che normalmente tiene assieme i cristalli di sale via legame ionico è indebolita dalla presenza dell'acqua che tende a strappare gli ioni e solvatarli. Lo stesso meccanismo interviene nel caso delle cariche negative dei gruppi fosfati presenti negli acidi nucleici. Sebbene siano presenti ioni positivi in soluzione, poiché la presenza dell'acqua previene che questi si leghino a formare un legame ionico con conseguente precipitazione. L'isopropanolo aggiunto alla soluzione è molto meno polare dell'acqua perciò è in grado di schermare le interazioni di questa, promuovendo l'attrazione tra i gruppi fosfato e i cationi presenti, come Na^+ . Sono sufficienti 0,7 volumi di isopropanolo per indurre la precipitazione degli acidi nucleici. Si procede con una centrifugazione di quindici minuti a 16000g a 4°C per poi rimuovere completamente il surnatante. L'isopropanolo purtroppo è poco volatile: per questo sono necessari due lavaggi con 500 μl e 150 μl di etanolo 70% freddo seguiti da una centrifugazione di cinque minuti a 16000g a 4°C per far asciugare il pellet di acidi nucleici⁵. Si risospinge il tutto in acqua "RNase-free" e si tiene a 60°C per cinque minuti. Successivamente il protocollo permette di continuare con il processo di purificazione in colonnina o, in caso l'operatore decida di conservare l'estratto per tempi più lunghi, questo può essere mantenuto a -80°C.

2.1.2 Purificazione con colonnine RNeasy Qiagen™

Questa procedura è molto utilizzata per la purificazione dell'RNA perché è capace di combinare le proprietà di legame selettivo di una membrana di silice con le velocità d'operazione data dall'uso delle centrifughe. Un sistema specifico di buffer salini permette di legare alla membrana fino a 100 μg di RNA con una lunghezza che superi le 200 basi.

I campioni provenienti dalla precedente estrazione sono stati fatti passare attraverso la colonna, dove l'RNA totale si è legato alla membrana e i contaminanti sono stati efficientemente lavati via. In seguito è stato eluito con 30-100 μl di acqua priva di RNasi. Il protocollo inoltre consente di aumentare la concentrazione di mRNA, poiché la maggior parte degli RNA con lunghezza minore di 200 basi sono selettivamente esclusi. Esempi sono i 5.8S rRNA, 5S rRNA e i tRNA, che in totale comprendono il 15-20% dell'RNA totale. Si inizia col portare il campione ad un volume di 100 μl con "RNase-free" water e si aggiungono 350 μl di Buffer RLT, fornito dal kit, mescolando bene. Si aggiungono 250 μl di etanolo assoluto all'RNA diluito e si mescola bene pipettando delicatamente. Il campione di 700 μl viene trasferito ad una RNeasy Mini spin column posta in un tubo di raccolta da 2 ml, e dopo aver chiuso delicatamente il coperchio si procede con una centrifugazione alla massima velocità per quindici secondi. A questo punto l'RNA totale risulta essere legato alla colonnina mentre tutti i contaminanti si trovano nel "flow-through" che può essere eliminato. Il rischio è che si sia legato anche del DNA, per questo il passo successivo consiste nel digerirlo ed eliminarlo. Si aggiungono 350 μl del Buffer RW1 in dotazione con il kit alla colonna e si procede con una centrifugazione alla massima velocità per quindici secondi. A 10 μl di soluzione madre di DNasi I si aggiungono 70 μl del Buffer RDD, entrambi forniti dal kit, e dopo averla mescolata per inversione si pone direttamente sulla membrana della colonna lasciandola agire a temperatura ambiente per 15 minuti. A questo punto si aggiungono 350 μl di Buffer RW1 alla colonna e si passa ad una centrifugazione per quindici secondi eliminando poi il "flow-through". Lo scopo degli step successivi è lavare la membrana da ulteriori contaminanti che non sono passati in precedenza aggiungendo 500 μl di Buffer RPE, in dotazione, e procedendo a centrifugazione per quindici secondi eliminando il "flow-through". Il tutto va ripetuto due volte e quindi una terza con centrifugazione per due minuti. L'ultimo step consiste nel raccogliere tutto quello che è legato alla membrana, quindi tutto l'RNA purificato. Si posiziona la colonnina in un nuovo tubo collettore da 1.5 ml e aggiungendo 30-50 μl di acqua "RNase-free" direttamente sulla membrana si procede all'ultima centrifugazione per un minuto per eluire l'RNA⁶. La qualità dell'RNA raccolto può essere saggiata con una corsa elettroforetica su gel di agarosio⁷. Il risultato della corsa è visibile nella Figura 6.

2.2 Reverse Transcription PCR

Questa procedura, successiva all'estrazione di RNA totale, vede l'impiego di quest'ultimo come template in una reazione assieme a un primer complementare, 2'-deossinucleoside 5'-trifosfati (dNTPs) e trascrittasi inversa per generare un DNA complementare a singolo filamento (cDNA)⁸. La reazione di retrotrascrizione si conduce in tubi con 20 μl di soluzione di cui fino ad 1 μg è costituito da RNA totale, mRNA con poly(A). Vengono raccolti 4,5 μl di RNA template e vengono combinati con 0,5 μl di soluzione di primer. Dopo un passaggio di denaturazione a 70°C si lascia riposare cinque minuti in ghiaccio. A questo punto si crea la mix di reazione contenente 4 μl di ImProm-IITM 1X Reaction Buffer, 2,4 μl di magnesio cloruro 3mM, 1 μl di dNTPs, 1 μl di ImProm-IITM Reverse Transcriptase e 6,6 μl di acqua "RNase-free" per un totale di 15 μl . Come step finale si aggiungono 5 μl di soluzione RNA-primer ai 15 μl della mix su ghiaccio. Segue una fase di annealing a 25°C di cinque minuti durante la quale le molecole di RNA si appaiano al primer attraverso legami idrogeno formando il punto d'attacco per la Trascrittasi Inversa (RT). Dopo di ciò la reazione viene incubata cinque minuti a 37°C, quarantacinque minuti a 42°C e dieci minuti a 55°C, temperature alle quali l'enzima è attivo. In molti casi è preferibile condurre la sintesi di cDNA alle temperature più alte, soprattutto se il template ha un'elevato grado di struttura secondaria, ricordando che l'enzima è attivo nel range 37-55°C. Ultimo passaggio è l'inattivazione dell'enzima a 70°C per quindici minuti. Si procede con l'aggiunta di 80 μl di acqua mQ e la conservazione del campione ricco di cDNA a -20°C^{9,10}.

2.2.1 Oligo(dT) e Random Primers

La reazione di trascrizione inversa può prevedere l'uso di diverse tipologie di primer: oligo(dT) primer, random primers o primers gene-specifici, ma nell'esperimento sono stati usati solo i primi due. Il metodo più generale per iniziare una reazione di sintesi di cDNA a partire da RNA è l'utilizzo di random esameri. Questi non sono selettivi e si appaiano a tutte le molecole di RNA presenti, incluse quelle che non contengono la coda di poly(A)+. L'uso di questi porta ad una popolazione di cDNA iniziati internamente lungo tutta la sequenza di RNA. L'impiego di Oligo(dT) coincide con la retrotrascrizione di tutti gli mRNA processati aventi la coda di poly(A) 3'-terminale. In entrambi i casi non è necessario conoscere la sequenza del gene. Alla fine sono state effettuate due reazioni per ogni cDNA: Linea 1 Random, linea 1 Oligo(dT), linea 2 Random, linea 2 Oligo(dT)^{9,11}.

2.3 RT-PCR semiquantitativa

La potenza della PCR è stata associata con la reazione di retrotrascrizione come strumento per monitorare e quantificare l'espressione genica. Il cDNA prodotto con la retrotrascrizione viene replicato usando la DNA polimerasi di *Thermus aquaticus*. Cicli ripetitivi di RT-PCR semiquantitativa amplificano le sequenze, permettendo poi con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio l'analisi del numero di copie del templato. Questo metodo non richiede una grande quantità di materiali di partenza ed è molto sensibile: l'unica informazione necessaria è costituita dalla sequenza del gene d'interesse, allo scopo di disegnare i primers che dovranno essere complementari al 5' e 3' terminale della sequenza che si vuole amplificare⁸.

	Forward Primer	Reverse Primer	Lunghezza amplicone
Actina 2	5'-TTCCTCTCCGCTTTGAATTGTCTCG-3'	5'-GCCTTCACCATACCGGTACCATTG-3'	256 bp
GUS	5'-GATTGGGGCCAACCTCCTACCG-3'	5'-CGGCTAACGTATCCACGCCGTAT-3'	575 bp
p23-2	5'-GAGCGCTTTGAATTCAGCTT-3'	5'-GAGGCTGTTTCAGAGTTGACC-3'	215 bp
p23-1	5'-GTCAATGTTGAGGAAAGCAAATCAAC-3'	5'-CGAGAAATCCATTCTTCATTCC-3'	297 bp

Figura 5. Elenco dei primers utilizzati e relativa lunghezza dell'amplicato.

La reazione si conduce in tubi con 50 μ l di soluzione di cui 5 μ l sono di cDNA templato e 2 μ l di primers, 1 μ l per il primer Forward ed 1 μ l per il primer Reverse. I restanti 43 μ l corrispondono alla mix di reazione contenente 10 μ l di Taq polimerasi Reaction Buffer 5X, 1 μ l di dNTPs, 0,1 μ l di Taq polimerasi e 31,9 μ l di acqua mQ. È preferibile lavorare in ghiaccio in modo da evitare di attivare o danneggiare l'enzima. Come step finale si aggiungono 7 μ l di soluzione cDNA-primers ai 43 μ l della mix. Segue un ciclo a 95°C nel termociclatore per cinque minuti durante il quale i duplex cDNA-RNA formati durante la retrotrascrizione si disaggregano. Dopodichè inizia un nuovo ciclo di 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 58°C e 45 secondi a 72°C che viene ripetuto fino a 33 volte. A 95°C avviene la denaturazione del DNA, il quale perdendo i legami idrogeno tra le basi complementari si ottiene in forma di singolo filamento. A 58°C avviene la fase di annealing durante la quale i primers si appaiano al ssDNA templato formando legami idrogeno; la temperatura in questa fase è di solito 3 o 5 gradi Celsius sotto la temperatura di melting dei primers. A 72°C si raggiunge l'optimum per l'attività della Taq polimerasi che si attacca al frammento iniziatore, individuato dall'appaiamento primer-DNA, e inizia a sintetizzare il filamento complementare al DNA templato aggiungendo dNTPs in direzione 5'-3' tramite la condensazione del fosfato-5' dei dNTPs con il gruppo idrossile-3' alla fine del filamento nascente: si parla di "fase di estensione".

Il tempo necessario per questa fase dipende sia dal tipo di DNA polimerasi utilizzata, sia dalla lunghezza del frammento da amplificare: al massimo della processività una polimerasi collega circa 1000 basi al minuto, così ad ogni ciclo la quantità di DNA target è duplicata, portando all'amplificazione esponenziale dello specifico frammento. Si conclude con una fase di mantenimento a 4°C per bloccare la reazione.

I primers scelti sono stati disegnati in modo da amplificare circa 250 basi ad eccezione del GUS per il quale l'amplicone risulta superiore alle 500 basi. Il numero di cicli è stato scelto nelle varie PCR in modo che nessuno degli amplificati rimanesse in fase di amplificazione esponenziale alla fine del protocollo, permettendo la comparazione nella fase di analisi¹².

2.4 Gel elettroforesi

Ciascun campione raccolto è analizzato tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% con buffer TAE. Le corse hanno una durata media di quindici minuti, il tempo necessario a risolvere di qualche centimetro le bande, mentre per la visualizzazione è stato utilizzato SYBR Green, un colorante degli acidi nucleici non tossico, il quale risulta fluorescente se esposto alla luce UV.

3 Presentazione dei risultati ottenuti e commenti

Allo scopo di determinare la buona riuscita del processo di estrazione e purificazione dell'RNA e garantirci che l'RNA estratto sia di buona qualità, l'estratto di RNA totale proveniente dalle due linee è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel d'agarosio. Nella Figura 6. si possono osservare prevalentemente due bande, le quali possono essere identificate come gli RNA ribosomiali 18S e 28S. La presenza di queste attesta la buona qualità dell'estratto.

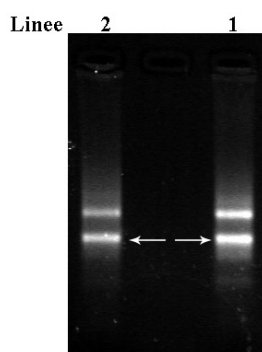


Figura 6. Immagine a luce UV della corsa elettroforetica dell'RNA totale delle linee 2 (promotore p23-2) e 1 (promotore p23-1) su gel d'agarosio

Al fine di definire i parametri della procedura, così da diminuire gli errori derivanti da un prelievo in un ciclo in cui la visualizzazione alla luce UV sarebbe impossibile, poiché a saturazione, è stata allestita la curva dei cicli ottenuta con corsa elettroforetica dei campioni della prima RT-PCR, rappresentata in Figura 7. Inoltre è stato scelto un gene "housekeeping", o standard endogeno espresso costitutivamente, contro cui normalizzare i valori ottenuti nei vari campioni in modo da uniformare i dati. Osservando la figura, l'actina risulta essere il candidato ottimale come "housekeeper" in quanto ha espressione pressoché costante in entrambe le linee; al contrario, l'espressione del gene *ELF1α* sembra essere non costante ed è a saturazione già a 29 cicli. Il numero di cicli scelti nelle RT-PCR successive è un valore tra 27 e 28 per l'actina e il *GUS*, mentre per le p23 è compreso tra 32 e 35. Si osserva un amplificato maggiore per le linee retroscritte con random primers e quasi assente anche a 33 cicli per le linee retroscritte con oligo(dT), perciò si è deciso di procedere con l'estrazione a 32 e 35 cicli.

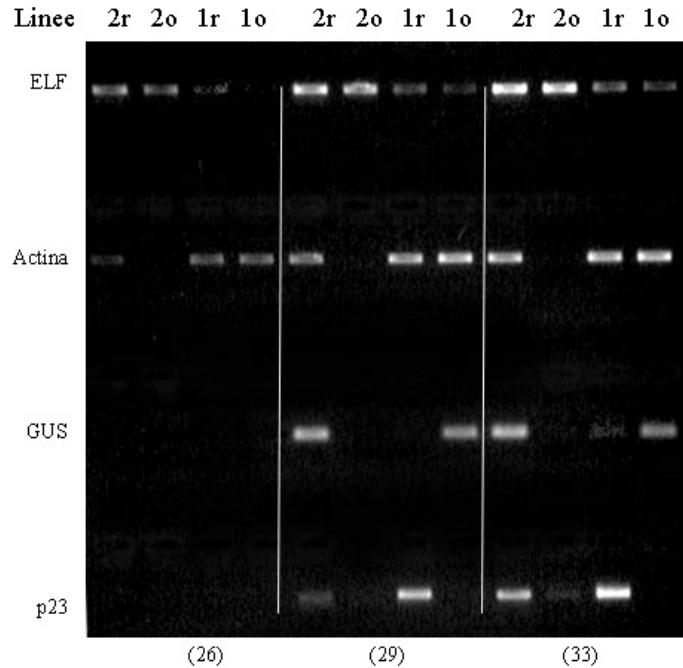


Figura 7. Immagine con luce UV della corsa elettroforetica dei campioni ottenuti con la prima RT-PCR semiquantitativa su gel d'agarosio.
Linee 1, 2 Primers (r) random esameri (o) oligo(dT)

Risulta verosimile l'eventualità che nel campione 2-oligo(dT) dell'actina sia stato commesso un errore nell'allestire l'esperimento: probabilmente un errore nel prelievo del campione.

Nella Figura 8. è presentata la corsa elettroforetica dei campioni della seconda RT-PCR impostata con i parametri ricavati dall'analisi dell'esperimento precedente. Si nota come la reazione sia proceduta secondo l'attesa, confermando la bontà delle condizioni impostate. Emergono però due nuove informazioni: il GUS non sembra venir amplificato, e, infatti, nell'immagine si vedono solo i primers che hanno corso di più poiché a basso peso molecolare, ed è presente una doppia banda per l'amplificato di p23 nei campioni della linea 1. In entrambi i casi si è proceduto con la stessa soluzione: aumentare la temperatura di annealing di qualche grado.

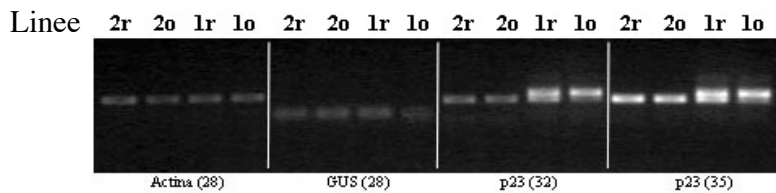


Figura 8. Immagine con luce UV della corsa elettroforetica dei campioni ottenuti con la seconda RT-PCR semiquantitativa su gel d'agarosio
Linee 1, 2 Primers (r) random esameri (o) oligo(dT)

La PCR, in quanto processo esponenziale, è in grado di amplificare notevolmente anche piccole differenze di efficienza di reazione portandole a grandi discrepanze nei risultati finali. Infatti, questo procedimento ha un margine di errore intrinseco di circa il 20%, e anche due campioni trattati allo stesso modo corrono il rischio di dare risultati differenti. In questo passaggio si è preferito dunque effettuare due repliche tecniche e poi mediare i risultati¹³.

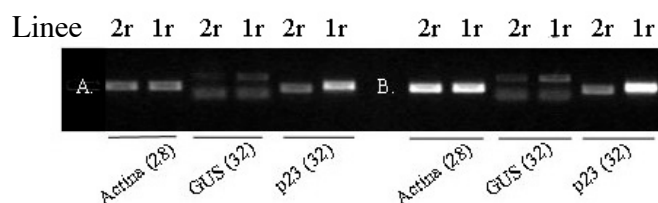


Figura 9. Immagine con luce UV della corsa elettroforetica dei campioni ottenuti con la terza RT-PCR semiquantitativa su gel d'agarosio
Linee 1, 2 Primers (r) random esameri

Secondo quanto atteso si osserva come le due reazioni di PCR, anche se svolte in maniera indipendente, abbiano dato gli stessi risultati con differenze trascurabili. I dati sembrano suggerire che il GUS venga espresso meno delle p23 endogene e queste siano diversamente espresse anche tra loro con un rapporto 2.5:1 in favore della p23-1. È importante ai fini dell'esatta comprensione dei risultati notare come la nuvola di primer sotto la banda del GUS sia ancora visibile nonostante la temperatura di annealing sia stata alzata.

	Linea _{primer}	Actina	GUS	p23-2	p23-1	p23/Actina	p23-1/p23-2	GUS/p23-1	GUS/p23-2
A	10B _{random} 2	3319.89	199.31	2659.77		80%	236.97%	14%	7%
	1.3 _{random} 1	3075.48	806.63		5838.79	190%			
B	10B _{random} 2	5626.55	606.80	2589.06		46%	274%	17%	23%
	1.3 _{random} 1	5800.26	1229.87		7302.79	126%			
						Medie		255% ± 26% 15.5% ± 2.1% 23%	

Figura 10. Analisi dei dati ottenuti tramite RT-PCR semiquantitativa. Le prime quattro colonne riportano i valori di fluorescenza ricavati dall'analisi dei pixels col software ImageJ. Nella quinta colonna i dati delle p23 sono normalizzati su actina, successivamente confrontati e mediati nella sesta colonna. Nelle ultime due colonne sono riportati i valori derivati dal confronto dell'espressione di p23 con quella sotto controllo del promotore di p23.

4 Conclusioni

In questo elaborato è stato possibile applicare alcune tra le tecniche più adoperate nel campo della biologia molecolare e mettere appunto un protocollo che portasse all'analisi del promotore di p23 in pianta. Ciascun passaggio, ove possibile, è stato analizzato ed approfondito con i principi biologici, chimici e fisici che lo permettono, e ha fornito dati utili alla costruzione di una serie d'informazioni sul gene d'interesse del nostro studio.

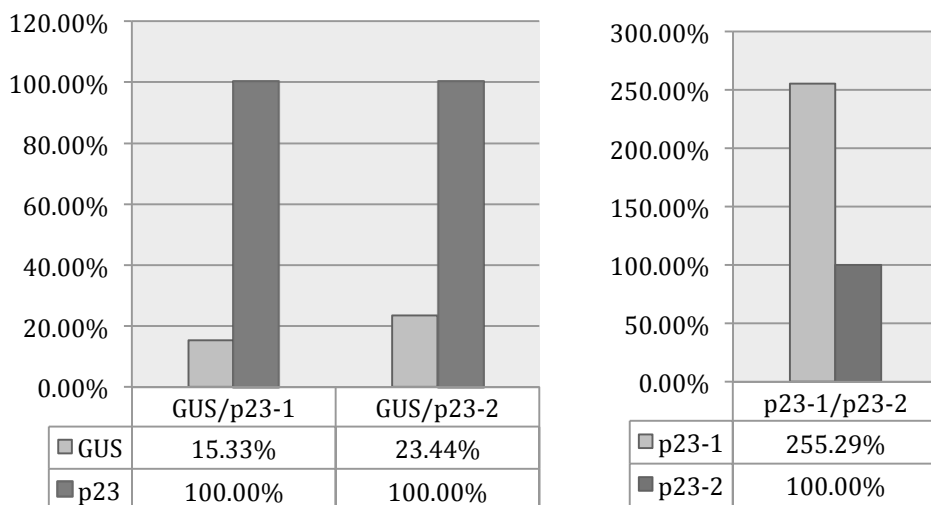


Figura 11. Espressione del gene GUS sotto controllo dei promotori di p23 comparata con quella delle p23 endogene ed espressione del gene endogeno p23-1 confrontato col gene endogeno p23-2.

A fronte dei risultati ottenuti si può quindi concludere che nei seedlings di dieci giorni il gene GUS, sotto controllo del promotore di p23-1, viene espresso circa il 15% rispetto alla p23-1 endogena, mentre il gene GUS, sotto controllo del promotore di p23-2, è espresso il 23% rispetto alla p23-2 endogena. Questo risultato è contrario alla previsione in cui si attendevano valori del costrutto attorno al 90-100% dell'endogeno, data l'identità tra i promotori a monte dei costrutti e i promotori endogeni. Molti fattori possono contribuire a spiegare questi risultati: l'errore intrinseco del processo di estrazione, lo stesso errore intrinseco della PCR, in quanto processo esponenziale, imprecisioni dell'operatore e condizioni negative derivate da come e dove si è inserito il gene, come il silenziamento da parte dei repressori trascrizionali. Questi ultimi fattori potrebbero avere maggiore rilevanza nel nostro caso, giacché la linea 2 genera un nuovo fenotipo che mostra crescita rallentata e ciò sostiene l'ipotesi che il costrutto si possa essere inserito in una posizione sensibile del genoma.

Un altro dato ricavato dai risultati è il confronto di espressione tra p23-1 endogena e p23-2 endogena: questo mostra come la prima delle due venga espressa 2.5 volte rispetto alla seconda.

Le prospettive per analizzare a fondo funzione, regolazione ed espressione della p23 sono ampie e attualmente oggetto delle ricerche condotte nel laboratorio che mi ha ospitato. Ulteriori studi saranno sicuramente utili per mettere in luce le funzioni di questa proteina.

5 Riferimenti bibliografici

- 1 Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**(13), 3901 -3907
- 2 Harrar, Y., Bellini, C., Faure, J.D. (2001) FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *TRENDS in Plant Science* **6**(9), 426-431
- 3 Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**(1), 156-159
- 4 Invitrogen, (2010) TRIzol® Reagent, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
- 5 Sambrook, J., Russel, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *CSHL Press*
- 6 Qiagen, (2010) RNeasy Mini Handbook, <http://www.qiagen.com/hb/rneasymini>
- 7 Box, M.S., Coustham, V., Dean, C., Mylne, J.S. (2011) Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. *Plant Methods* **7**(7)
- 8 Neal Stewart, C.N. Jr (2008) Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications, Ed *Wiley*
- 9 Promega, (2009) ImProm-IITM Reverse Transcription System: Technical manual, <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/impromii-reverse-transcription-system-protocol/>
- 10 Myers, T.W., Gelfand, D.D. (1991) Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase. *Biochemistry* **30**(31), 7661-7666
- 11 Adomas, A.B., Lopez-Giraldez, F., Clark, T.A., Wang, Z., Townsend, J.P. (2010) Multi-targeted priming for genome-wide gene expression assays. *BMC Genomics* **11**(477)
- 12 Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., Scambia, G. (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online* **3**(1), 19-25
- 13 Brown, T.A. (2010) Gene Cloning and DNA analysis: An introduction. Eds *Wiley-Blackwell*