

Corso di Laurea in Biologia

Esperienza di laboratorio di Genetica – 1 cfu

DAL FENOTIPO AL GENOTIPO:

IL COLORE DEGLI OCCHI DI *DROSOPHILA* E IL GENE *WHITE*



OBIETTIVI dell'esperienza di laboratorio

1. Riconoscere e classificare fenotipi selvatici (occhio rosso) e mutanti *white* (occhio bianco) di *Drosophila melanogaster* a livello morfologico;
2. Isolare DNA genomico di *Drosophila melanogaster* da singolo insetto;
3. Amplificare via PCR una regione del gene *white* di *Drosophila melanogaster* in moscerini selvatici e mutanti;
4. Analizzare il prodotto di amplificazione PCR del gene *white* di *Drosophila melanogaster* mediante elettroforesi su gel di agarosio;
5. Riconoscere e classificare i genotipi differenti del gene *white* di *Drosophila melanogaster* sulla base del profilo di amplificazione;
6. Associare ai fenotipi classificati a livello morfologico il profilo molecolare, classificando i genotipi omozigoti ed eterozigoti;
7. Calcolare le frequenze alleliche, genotipiche e fenotipiche per il gene *white* di *Drosophila melanogaster* nella popolazione di moscerini analizzata.

INTRODUZIONE

Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster* a 22°C

Il ciclo vitale del moscerino della frutta è illustrato nella Figura 1 e può essere descritto in modo sintetico dalla successione di varie fasi di sviluppo:

- ❖ **Giorno 0:** Le femmine depongono le uova;
- ❖ **Giorno 1:** Le uova schiudono;
- ❖ **Giorno 2:** Le larve di primo stadio (instar) cercano cibo e mangiano, muovendosi attivamente;
- ❖ **Giorno 3:** Le larve di secondo instar sono più grandi;
- ❖ **Giorno 5:** Le larve di terzo ed ultimo instar sono ancora più grandi e continuano a muoversi e mangiare;
- ❖ **Giorno 7:** Le larve iniziano a salire sulle pareti del contenitore di allevamento, si fermano, si attaccano e si impupano (in totale dopo 120 ore dalla deposizione delle uova);
- ❖ **Giorno 11-12:** Dopo la metamorfosi, dalle pupe sfarfallano gli adulti. I tempi raddoppiano se la temperatura è 18°C.

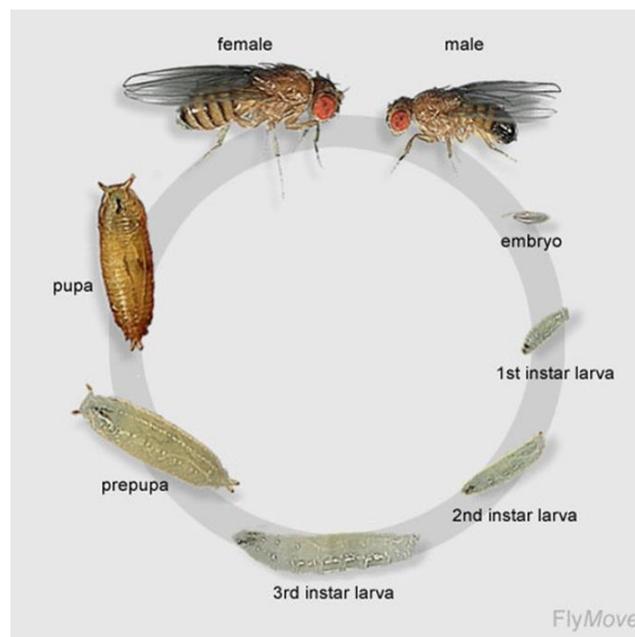


Figura 1 - Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*.

Le femmine sono sessualmente mature dopo 8-10 ore dalla schiusa e possono deporre mediamente fino a 100 uova fecondate al giorno e un totale di circa 500 uova nella loro vita.

Quindi, una coppia di moscerini in tre generazioni (poco più di un mese) se c'è abbastanza cibo, spazio e tutti i discendenti sopravvivono, avrà 125

milioni di pronipoti! E le 3 generazioni si sovrapporranno visto che *Drosophila* ha una vita media di quasi due mesi.

I maschi sono di dimensioni minori, hanno un numero ridotto di segmenti addominali, con gli ultimi due più scuri che nelle femmine (Figura 2).

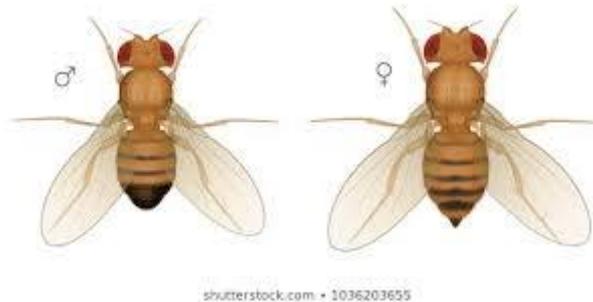


Figura 2 – Disegno di un maschio (sinistra) e una femmina (destra) di *Drosophila melanogaster*.

Terreno di coltura per l'allevamento di *Drosophila*

I ceppi di *Drosophila melanogaster* che saranno utilizzati nell'esercitazione sono stati allevati su un terreno a base di farina di mais, zucchero e lievito, disponibile sul mercato come premiscelato (*Instant Drosophila medium*).

Per la preparazione di 1 litro di terreno di coltura vengono aggiunti ad un litro di acqua 300 g di *Instant Drosophila medium* e 10 g di agar. La miscela viene portata a ebollizione per 5'. Quando si è raffreddata a circa 50-60°C si aggiungono 2,5 g di nipagina, un antimicotico, precedentemente scolti in 10 ml di alcool etilico al 95%, e si mescola. Il terreno viene quindi versato ancora caldo in tubi di plastica o bottiglie di vetro (Figura 3) e lasciato raffreddare, coperto con un panno. I tubini e/o le bottiglie si tappano con del cotone da batteriologia.

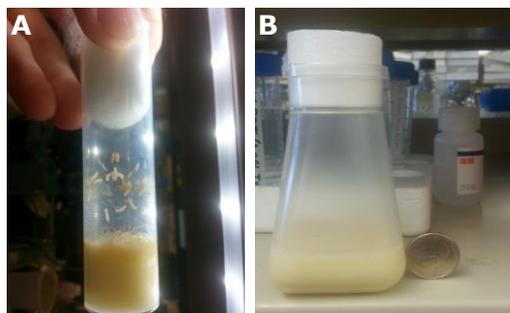


Figura 3 - A) Tubino di plastica da allevamento con terreno di coltura e larve sulla parete (i moscerini adulti sono stati precedentemente allontanati dopo accoppiamento ed ovodeposizione); **B)** bottiglia da allevamento ancora priva di moscerini. (<https://rafterylab.wordpress.com/2015/01/20/how-are-drosophila-reared-in-the-lab/>)

Mantenimento dei ceppi di *Drosophila*

I ceppi di moscerini vengono allevati in camere termostatate ad una temperatura di 18°C (o di 22-25°C se si desidera una crescita più veloce) in barattoli contenenti il terreno di coltura e vengono trasferiti su terreno fresco ogni 14/15 giorni.

Il trasferimento viene operato previa analisi al microscopio del fenotipo dei moscerini per accertarsi che nessun individuo con caratteristiche differenti da quelle corrispondenti al ceppo in esame sia presente nel barattolo.

Si selezionano poi una trentina di individui di ciascun sesso e si trasferiscono in un nuovo barattolo. Il numero di individui da trasferire non è fisso, ma dipende dal genotipo dei moscerini e un numero maggiore è richiesto se essi sono caratterizzati da bassa fertilità.

Le femmine vergini sono raccolte manualmente (con un pennellino o delle pinzette) come moscerini appena schiusi, di colore biancastro, addome non svasato e ali non ancora dispiegate (solo dopo 8 ore saranno pronte per la riproduzione sessuale).

Ceppi utilizzati

Per svolgere l'esperienza di laboratorio saranno utilizzati due differenti ceppi di *Drosophila melanogaster* che differiscono per il fenotipo "colore dell'occhio" (Figura 4).

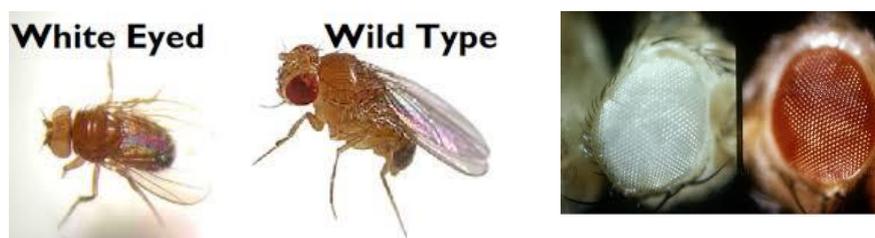


Figura 4 – Fotografia di una *Drosophila* con occhi bianchi (*white eyed*, mutante) e di una con gli occhi rossi (*wild type*, selvatica).

A destra un ingrandimento dell'occhio bianco (mutante) e rosso (selvatico). (<https://sites.google.com/site/biologydarkow/genetics/drosophila-genetics-model---white-eyed-vs-wild-type>, <https://www.sciencesource.com/archive/Wild-and-white-eyed-fruit-flies-SS2103411.html>)

I ceppi che saranno utilizzati sono:

- 1) Ceppo **Canton S** selvatico, con occhi rossi;

- 2) Ceppo **white** (**w 1118**) mutato, con occhi bianchi a causa di una delezione di 9 Kb (9000 bp) nella regione all'estremità 5' del gene X-linked *white* (Figura 5).

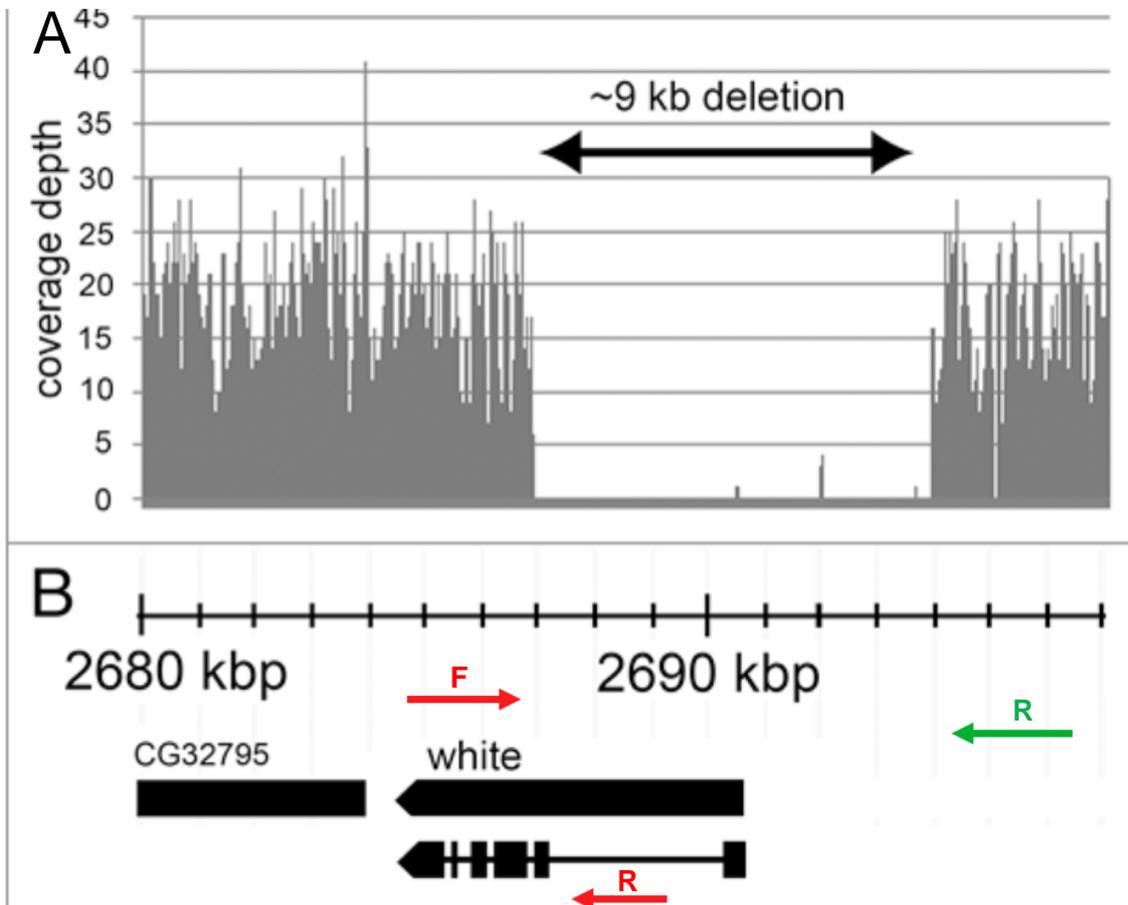


Figura 5 – A) Regione del gene *white* in cui è presente la delezione di 9 Kb nel ceppo mutante; **B)** Dettaglio della regione che sarà amplificata via PCR durante l'esperienza di laboratorio. Le frecce colorate indicano la posizione e la direzione (*forward* F e *reverse* R) dei primer che saranno utilizzati per l'amplificazione del DNA bersaglio. Platts *et al.* (2009) *Fly (Austin)* 3(3): 192–203.

Prima dell'esperienza in laboratorio

Per produrre la popolazione di *Drosophila* che sarà utilizzata durante l'esperienza di laboratorio, 30 maschi e 30 femmine vergini del ceppo Canton S sono stati messi insieme a 30 maschi e 30 femmine vergini del ceppo *white* e lasciati incrociare per due generazioni.

IN LABORATORIO

**E' INDISPENSABILE CONOSCERE LE NORME GENERALI DI
COMPORAMENTO NEI LABORATORI DIDATTICI DEL
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

(<http://www.dipartimentodibiologia.unina.it/wp-content/uploads/2019/10/Informativa-per-gli-studenti-La-Sicurezza-nei-Laboratori-Scientifici.pdf>).

L'esperienza di laboratorio si svolgerà in due parti.

La progenie di seconda generazione ottenuta dagli incroci precedentemente effettuati verrà separata in maschi e femmine con occhi rossi e maschi e femmine con occhi bianchi. Tutti i moscerini verranno contati. Ciascuno studente prenderà un moscerino di sesso e fenotipo a sua scelta da cui estrarre il DNA genomico e condurre una amplificazione mediante PCR di una regione del gene *white*.

Dopo l'amplificazione *in vitro* del DNA (PCR), il prodotto di amplificazione verrà analizzato per elettroforesi su gel di agarosio. L'analisi del profilo di amplificazione consentirà di attribuire a ciascun moscerino il corrispondente genotipo.

Infine, sulla base dei genotipi attribuiti, verrà calcolata la frequenza dell'allele *white* e dell'allele selvatico nella popolazione analizzata e sarà verificato l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Conoscenze teoriche necessarie

La comprensione delle varie fasi dell'esperienza di laboratorio richiede alcune conoscenze teoriche di genetica di base:

- 1) Concetto di fenotipo e genotipo;
- 2) Concetto di selvatico e mutante;
- 3) Concetto di omozigote, eterozigote, emizigote;
- 3) Principi della trasmissione ereditaria dei caratteri;
- 4) Differenza nella trasmissione di caratteri autosomici e X-linked;
- 4) Concetti di frequenze alleliche, genotipiche e fenotipiche;

E' poi necessario conoscere i principi teorici alla base della tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

PARTE 1

Analisi dei fenotipi

Prima di separare i moscerini con occhi bianchi da quelli con occhi rossi e attribuire il sesso, è necessario porre a freddo (-20°C o -80°C per 15-20 minuti) i tubi che li contengono per evitare che, una volta aperto il tubo, i moscerini volino via.

Trascorso il tempo necessario, con l'ausilio di un binocolare (o di una lente di ingrandimento), di un foglio di carta bianco e di un puntale per pipettatore, ogni studente parteciperà alla conta e alla separazione dei moscerini in base al colore dell'occhio (rosso, WT - bianco, white) e al sesso (maschio - femmina) (Figura 6).

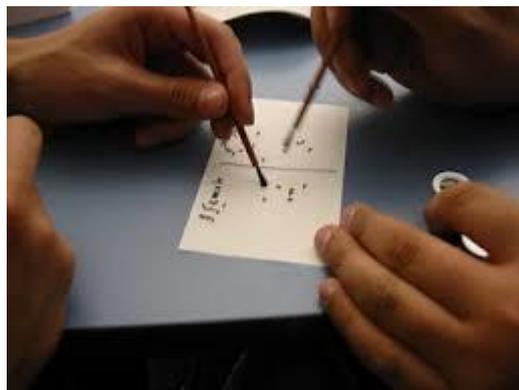


Figura 6 – Separazione manuale dei moscerini in base al sesso e al colore dell'occhio.

I risultati ottenuti saranno riportati da ciascuno studente nella seguente tabella:

	ROSSO (WT)		BIANCO	
	maschio	femmina	maschio	femmina
# individui				
campione				

Ogni studente sceglie un moscerino del quale, alla fine dell'esercitazione, conoscerà il genotipo. Nell'ultima riga della tabella precedente (campione), lo studente indica con una croce il sesso e il fenotipo del moscerino scelto.

Estrazione del DNA genomico

Prima di procedere, accendere i blocchi riscaldanti e assicurarsi che abbiano raggiunto la temperatura di 98°C.

Ciascuno studente sigla con un pennarello indelebile una provetta da 1,5 ml, in modo da poterla riconoscere nelle varie fasi dell'esercitazione.

- Porre ciascun moscerino in una provetta da 1,5 ml e aggiungere 20 microlitri di 1X PBS;
- Utilizzando un pestello di plastica, rompere i tessuti e mescolare a temperatura ambiente;
- Incubare a 98°C per 2 min;
- Mescolare nuovamente a temperatura ambiente.

Amplificazione via PCR del DNA estratto

Ciascuno studente allestisce la reazione di amplificazione *in vitro* del DNA in una provetta da 200 microlitri, opportunamente siglata per essere riconosciuta nelle fasi successive dell'esperienza, seguendo uno dei due schemi seguenti, a seconda del tipo di Taq a disposizione nel laboratorio:

schema 1: Taq, buffer e dNTPs separati

Reagente	[] iniziale	[] finale	Volume
Taq Buffer	10X	1X	2,5 µl
Primer mix	10 µM (each)	0,4 µM (each)	3 µl
dNTP mix	2,5 mM (each)	100 µM (each)	1 µl
Taq polimerasi	1 U/µl	0,04 U/µl	1 µl
H ₂ O distillata			15,5 µl
DNA stampo			2 µl
Volume finale			25 µl

N.B.: La *primer mix* è una miscela dei tre *primer* indicati nella Figura 5 (un *forward* F e due *reverse* R). La *dNTP mix* è una miscela di dATP, dTTP, dCTP e dGTP.

Suggerimento: per essere certi di aver aggiunto tutti i reagenti, spuntare progressivamente con la penna il reagente aggiunto.

schema 2: Taq, buffer e dNTP premiscelati

Reagente	[] iniziale	[] finale	Volume
Taq mix	2X	1X	12,5 µl
Primer mix + H ₂ O	10 µM (each)	0,4 µM (each)	10,5 µl
DNA stampo			2 µl
Volume finale			25 µl

N.B.: La *primer mix* è una miscela dei tre *primer* indicati nella Figura 5 (un *forward* F e due *reverse* R) e acqua.

Suggerimento: per essere certi di aver aggiunto tutti i reagenti, spuntare progressivamente con la penna il reagente aggiunto.

Le provette vanno poste nel termociclatore (Figura 7), dopo averle chiuse bene, assicurandosi che non siano presenti bolle nella miscela di reazione.



Figura 7 - Fotografia di un termociclatore.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:PCR_masina_kasutamine.jpg)

Avviare il termociclatore impostando il seguente programma termico:

Fase	Temperatura	Tempo	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	95°C	1 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	35
Annealing	63°C	30 sec	
Estensione	72°C	40 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1

I prodotti di amplificazione saranno analizzati durante la seconda parte dell'esperienza di laboratorio.

Preparazione del gel di agarosio 1%

In una beuta di vetro

- Aggiungere 1 g di agarosio a 100 ml di tampone TBE 1X;
- Portare a ebollizione in forno a microonde;
- Raffreddare, mescolando di tanto in tanto, e aggiungere il *Safe DNA gel stain*;
- Versare il TBE/agarosio nel lettino sigillato, al quale è stato montato un pettine per far formare i pozzetti, evitando che si formino bolle;
- Lasciare gelificare bene;
- Dopo aver rimosso il pettine e le chiusure del lettino, immergere il gel nella tanica da elettroforesi contenente TBE 1X (Figura 8).
(N.B.: Il gel deve essere completamente immerso nel tampone e deve avere i pozzetti posizionati in corrispondenza del polo negativo).

PARTE 2

Preparazione del campione da caricare

Prelevare dal termociclatore le provette allestite durante la PARTE 1 dell'esercitazione.

Ad ogni provetta aggiungere 2 microlitri di *loading buffer*, il tampone di caricamento (costituito da glicerolo, acqua e un colorante carico negativamente) che serve ad "appesantire" il campione da caricare, evitando che diffonda nel tampone di elettroforesi, e a seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Il colorante, infatti, migra nel campo elettrico verso il polo positivo, così come il DNA.

Caricamento del gel di agarosio ed elettroforesi

Ogni studente caricherà in uno specifico pozzetto il suo campione (Figura 8), cercando di non bucare il fondo del pozzetto e di non far diffondere il campione nel tampone di elettroforesi.

In ogni gel, oltre ai campioni di DNA amplificati tramite PCR, sarà caricato un marcatore di peso molecolare, che servirà ad attribuire la dimensione dei frammenti amplificati. Il marcatore utilizzato è il 1 kb DNA Ladder, costituito da una miscela di frammenti di dimensioni comprese tra 200 bp e 10000 bp.

Su uno dei gel saranno caricati anche tre controlli positivi precedentemente amplificati dal docente (amplificazione di un individuo white, di un selvatico omozigote e di un selvatico eterozigote).

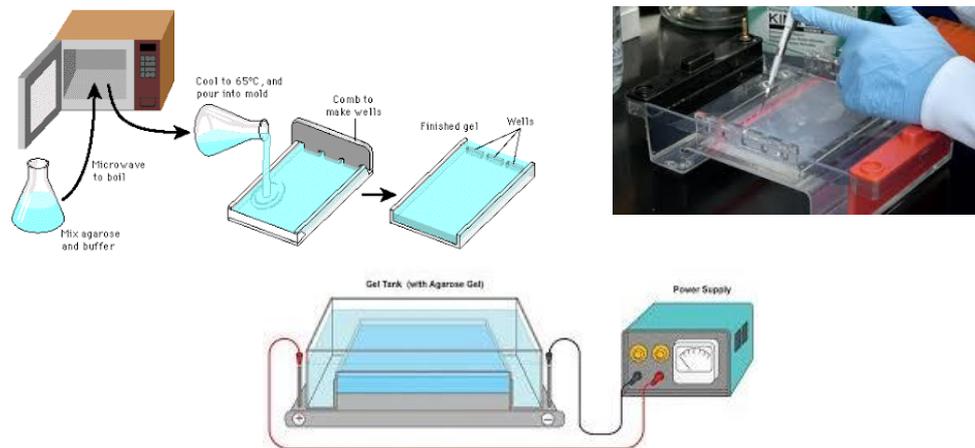


Figura 8 – Preparazione del gel di agarosio, semina nei pozzetti e collegamento della tanica all'alimentatore.

Ogni studente riporta nello schema seguente l'ordine di caricamento del gel, utilizzando una sigla univoca per indicare il proprio campione. Lo schema sarà utilizzato anche in seguito per riportare il profilo di amplificazione di ciascun campione.

	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12
nome	LADDER										
bp	1000										
	900										
	800										
	700										
	600										
	500										
	400										
	300										
	200										

N.B.: per semplicità, nello schema non sono indicate le bande del 1 kb Ladder di dimensioni superiori a 1000 bp.

In parallelo, su un gel saranno caricati i controlli positivi, cioè i campioni ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico estratto prima dell'esercitazione da un moscerino selvatico omozigote (occhi rossi), da uno selvatico eterozigote (occhi rossi) e da uno mutante white (occhi bianchi).

Dopo aver caricato il gel, si chiude la tanica elettroforetica, si collegano gli elettrodi all'alimentatore (assicurandosi che il collegamento con il polo

positivo e negativo sia corretto) e si avvia l'elettroforesi a 100 V costanti per 20 minuti.

Analisi dei profili di amplificazione e attribuzione del genotipo

Al termine della corsa elettroforetica, i gel vengono posti su un transilluminatore UV, rendendo così visibile il DNA che ha migrato dal polo negativo verso quello positivo. Frammenti di DNA di dimensioni differenti migrano a velocità differenti e quindi occupano posizioni differenti nel gel dopo la separazione per elettroforesi. La visualizzazione dei frammenti di DNA è possibile grazie alla presenza nel gel di agarosio del colorante *Safe DNA gel stain*.

I profili di amplificazione possibili sono visibili nella Figura 9 e sono illustrati negli schemi successivi.

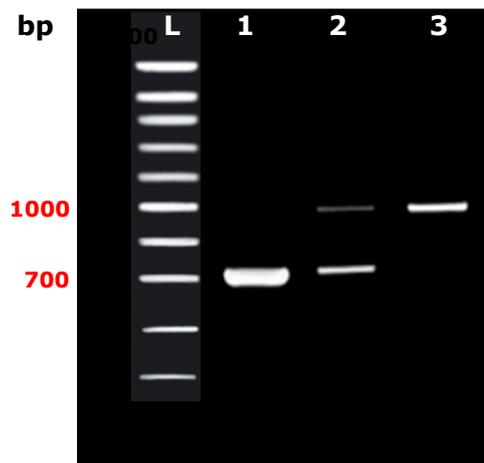
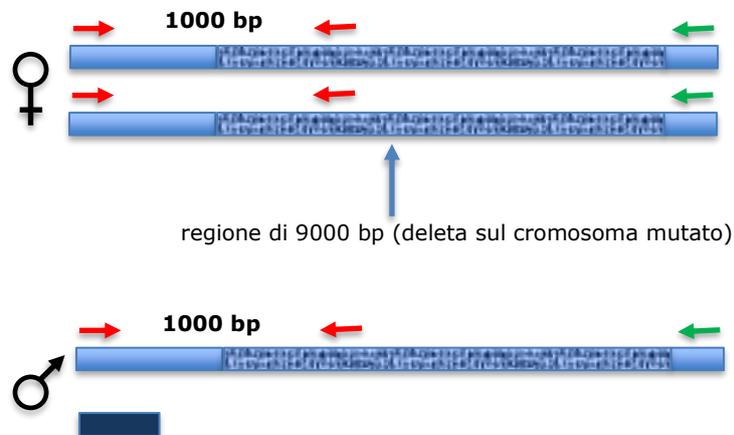


Figura 9 – Profilo di amplificazione della regione del gene *white* di una *Drosophila* **1)** maschio con occhi bianchi (emizigote w/Y), **2)** femmina con occhi rossi eterozigote (w^+/w) e **3)** femmina con occhi rossi omozigote (w^+/w^+). **L)** DNA ladder.

Da un moscerino femmina con occhi bianchi (omozigote w/w) oppure da un maschio con occhi bianchi (emizigote w/Y) si ottiene un frammento di 700 bp, frutto dell'amplificazione della regione compresa tra il primer rosso F e quello verde R.



Da un moscerino femmina con occhi rossi omozigote w^+/w^+ oppure da un maschio con occhi rossi (emizigote w^+/Y) si ottiene un frammento di 1000 bp, frutto dell'amplificazione della regione compresa tra i primer rossi F e R. La distanza tra il primer rosso F e il verde R sul cromosoma non delecto è elevata (oltre 9000 bp) e la *Taq* polimerasi non riesce, nelle condizioni di reazione utilizzate, ad amplificare un frammento.



Da un moscerino femmina con occhi rossi eterozigote (w^+/w) si ottiene un frammento di 1000 bp, frutto dell'amplificazione della regione compresa tra i primer rosso F/rosso R, e un frammento di 700 bp, frutto dell'amplificazione della regione compresa tra i primer rosso F/verde R.



N.B.: Gli schemi non sono in scala.

Ogni studente riporta il profilo ottenuto dal proprio campione nella tabella seguente, indicandolo con un pallino. Allo stesso tempo, utilizzando i dati delle amplificazioni dei colleghi, riporta il numero ottenuto di omozigoti, emizigoti ed eterozigoti maschi e femmine.

Sesso	Maschio		Femmina		
fenotipo	selvatico	white	selvatico	selvatico	white
genotipo	w^+/Y	w/Y	w^+/w^+	w^+/w	w/w
campione					
#individui					

Calcolo delle frequenze alleliche

Sulla base dei risultati ottenuti, si potranno calcolare le frequenze dell'allele selvatico w^+ e di quello mutato w .

Essendo il gene *white* localizzato sul cromosoma X, nella popolazione maschile le frequenze alleliche coincidono con quelle genotipiche e con quelle fenotipiche in quanto ogni maschio ha un solo allele *white* (essendo emizigote). Di conseguenza, la frequenza di w^+ nei maschi è pari al rapporto tra il numero di maschi con fenotipo selvatico e il numero totale di maschi. Allo stesso modo, la frequenza di w nei maschi è pari al rapporto tra il numero di maschi con fenotipo white e il numero totale di maschi.

Nelle femmine, invece, la frequenza dell'allele w^+ è

$$(2 w^+w^+ + w^+w)/2 \times \text{numero femmine}$$

e quella dell'allele w è

$$(2 ww + w^+w)/2 \times \text{numero femmine.}$$

Sesso	Maschi	Femmine
frequenza allele w^+		
frequenza allele w		

Se la popolazione analizzata fosse costituita da un uguale numero di maschi e femmine, le frequenze alleliche nella popolazione totale sarebbero

frequenza dell'allele w^+ = $2/3 \text{ freq } (w^+)_{\text{femmine}} + 1/3 \text{ freq } (w^+)_{\text{maschi}}$

frequenza dell'allele w = $2/3 \text{ freq } (w)_{\text{femmine}} + 1/3 \text{ freq } (w)_{\text{maschi}}$

Se la popolazione fosse in equilibrio di Hardy-Weinberg, le frequenze alleliche nei maschi e nelle femmine dovrebbero essere le stesse.

Ci aspettiamo che la popolazione non sia in equilibrio, in quanto i moscerini con occhi bianchi hanno difficoltà visive e sono svantaggiati (hanno una minore idoneità biologica) rispetto a quelli con occhi rossi: l'accoppiamento tra moscerini con occhi rossi potrebbe essere favorito.

Breve storia del gene *white* di *Drosophila*

QRCode



<https://www.docenti.unina.it/#!/webdocenti/user/didactics/navigation?directoryId=34197072&materialType=generic>

Note

Note

REAGENTI E SOLUZIONI UTILIZZATE

PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*, pH 7,4)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

TBE 1X (*Tris-Borate/EDTA*, pH 8,3)

Tris/borato	89 mM
EDTA	2 mM

Primer mix 10 µM

miscela di tre oligonucleotidi, ciascuno 10 µM, in soluzione acquosa

dNTP mix 2,5 mM

miscela di dATP, dTTP, dCTP e dGTP, ciascuno 2,5 mM, in soluzione acquosa

Safe DNA gel stain – CAS 67-68-5

Gel loading buffer 6X

glicerolo 30%
blu di bromofenolo 0,25%

1 kb bp DNA Ladder

Miscela di frammenti di DNA di dimensioni comprese tra 200 e 10000 bp in soluzione acquosa

Luciano Acciò