

TITOLO: ESTRAZIONE DEL DNA - Biologia 04

OBIETTIVI: Il DNA, o acido desossiribonucleico, è una lunga e sottile molecola organica costituita da una catena di quattro sub- unità, chiamate nucleotidi, ognuno formato dall'unione di uno zucchero (desossiribosio), un gruppo fosfato e una fra quattro basi azotate (adenina, guanina, citosina o imina). Nel DNA è conservata l'informazione che determina la struttura delle proteine e di conseguenza le caratteristiche delle cellule che compongono gli organismi viventi. Nella cellula a riposo il DNA si trova all'interno del nucleo associato a proteine dette istoni. Queste proteine, presenti solo nel nucleo degli eucarioti, permettono al DNA di ripiegarsi e di avvolgersi ripetutamente su se stesso formando un aggregato compatto all'interno del nucleo della cellula (la lunghezza del DNA contenuto in una cellula è pari a circa un metro di lunghezza: se tutto il DNA di un individuo fosse srotolato si otterrebbe un filo lunghissimo che arriverebbe al sole!). Ciascun partecipante preleverà il proprio campione biologico grazie ad un vigoroso risciacquo della bocca con una soluzione salina, potendo così estrarre il proprio DNA e osservare le proprie cellule al microscopio. Il DNA sarà estratto dalle cellule presenti nel campione grazie all'utilizzo di una soluzione contenente del comune detersivo per piatti in grado di demolire la parete fosfolipidica (grassa) delle membrane cellulari. Al campione verrà aggiunto del sale da cucina il quale facilita la separazione del DNA dalle proteine attorno alle quali è avvolto. L'aggiunta infine di succo d'ananas permette alla bromelina, in esso contenuta, di distruggere gli istoni, le proteine che legano il DNA. Per osservare il DNA, solubile in acqua e quindi invisibile, è necessario però metterlo a contatto con l'etanolo (o alcool etilico). In etanolo il DNA forma un denso aggregato che ricorda una medusa ed è visibile ad occhio nudo. Per quanto semplificata, la procedura permettere di ripercorrere le fasi principali di estrazione del DNA necessarie per successive analisi di biologia molecolare.

PRINCIPIO TESTATO: Estrazione del DNA

MATERIALI OCCORRENTI

- Vetreria:
- Strumenti:
- Reagenti:

PROCEDIMENTO

Nei laboratori di ricerca:

Estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA è una procedura che permette la separazione del DNA contenuto all'interno della cellula da tutti gli altri componenti, grazie all'uso di solventi. I ceppi di lieviti e batteri lattici sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico, mediante rottura meccanica con biglie di vetro della membrana e della parete cellulare, seguita da un'estrazione con fenolo cloroformio-alcool isoamilico. Per l'estrazione sono state utilizzate delle provette a vite contenenti le biglie di vetro ed il pellet cellulare. In ogni provetta con tappo a vite sono stati aggiunti 300 µl di *Breaking Buffer* (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8,) e 300 µl di *alcool isoamilico-fenolo-cloroformio*. In seguito si è passati alla fase di rottura meccanica, ponendo le provette con tappo a vite ben chiuse nel Fast Prep 24 Homogenizer (MP BIO) per tre cicli da 30 secondi l'uno a 4,5 m/s. Tale strumento crea una forte agitazione, di modo che le microbiglie di vetro sfregino contro la parete e la membrana cellulare. Una volta ottenuta la lisi della cellula, ad ogni provetta sono stati aggiunti 300 µl di TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8) e il tutto è stato poi centrifugato alla velocità di 13200 rpm per 10 minuti. Durante questo passaggio, si ha la formazione di due fasi, una inferiore, composta da sostanze cellulari, proteiche e solventi, e una superiore acquosa, contenente il DNA. La fase acquosa deve essere prelevata con molta cura, facendo attenzione a non prelevare anche le impurità proteiche e trasferita in una nuova *ependorf* da 1,5 ml contenente 700 µl di etanolo al 95%. Dopo una centrifugazione per 10 minuti a 13200 rpm, l'etanolo viene eliminato e a questo punto si procede con un secondo lavaggio con 150 µl di etanolo al 70% e si centrifuga nuovamente per 2 minuti. Al termine della centrifugazione si elimina l'etanolo in eccesso. Le *ependorf*, contenenti unicamente il DNA vengono lasciate asciugare per circa 20 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'evaporazione dell'etanolo alle provette vengono aggiunti 50 µl di

acqua ultra pura ed il tutto viene posto per 20 minuti nel *termomixer* a 37 °C, per facilitare la solubilizzazione del DNA estratto. Si procede in seguito alla quantificazione del DNA mediante spettrofotometro Nanodrop e successiva diluizione del DNA a 100 ng/μl. Le provette contenenti il DNA diluito vengono conservate in congelatore ad una temperatura di -20°C. L'intera procedura di estrazione del DNA è stata condotta sotto cappa.