

Il DNA non è una sostanza strana, anzi è qualcosa che *si mangia*...

DNA da una cipolla...

L'estrazione del DNA dalle cellule di cipolla attraverso due protocolli alternativi: uno con reagenti "da laboratorio", l'altro con prodotti di uso domestico...



Università Cattolica del Sacro Cuore
Centro Ricerche Biotecnologiche



Dr. Franco Lucchini

Estrazione di DNA genomico da una cipolla: Procedura Standard

- **Materiale necessario:**
- **Una cipolla**
- **Un coltello ed un supporto per affettare la cipolla**
- **Un mortaio con pestello**
- **Un quadrato di garza idrofila del tipo da medicazione**
- **Una provetta da 20 ml**
- **Due provetta da 10 ml**
- **Soluzione di LISI (Vedi oltre)**
- **Alcol Etilico 95% oppure Isopropanolo 100%**
- **Alcol etilico al 70% per conservare il DNA**



I componenti della Soluzione di LISI:

COMPOSIZIONE : 0,1M TRIS-HCl pH8,5; 0,05M EDTA pH8,5; 0,2M NaCl; SDS 0,2%

TRIS-HCl pH8

è un Tampone. Mantiene il pH della soluzione in condizioni leggermente alcaline per mantenere in soluzione il DNA. In condizioni acide il DNA precipiterebbe.

EDTA (Acido EtilenDiamminoTetracetico)

è un Chelante. Sottrae alla soluzione lo ione Magnesio (Mg^{++}) inibendo l'azione delle nucleasi, enzimi cellulari che potrebbero degradare il DNA;

SDS (Sodio Dodecil Solfato o Sodio lauril solfato)

è un Detergente. Disgrega le membrane cellulari e solubilizza le proteine e i lipidi.

NaCl (Sodio Cloruro)

Lo ione Sodio che si libera in soluzione neutralizzerà le cariche negative della molecola di DNA facilitandone la successiva precipitazione.



1^A Fase : Preparazione del lisato

- Affettare finemente la cipolla con il coltello.
- Trasferirne nel mortaio un quantitativo corrispondente a 5 g
- Aggiungere 5 ml di soluzione di lisi
- Schiacciare con il pestello fino ad ottenere una massa viscosa ed abbastanza omogenea.

Cosa succede? Alla rottura delle membrane cellulari, il DNA fuoriesce ed entra in soluzione nel tampone di lisi insieme agli altri componenti cellulari solubili.



2^A Fase : Filtrazione per la separazione dei detriti cellulari

- **Formare un cono con la garza idrofila ed introdurlo nella provetta da 20 ml con l'aiuto di una matita**
- **Versare lentamente il contenuto del mortaio nella garza in modo da trattenere i detriti grossolani e raccogliere nella provetta un liquido limpido.**
- **Rimuovere la garza e spostare 2 ml del liquido limpido ottenuto in una nuova provetta da 10 ml.**



Opzionale : Digestione ed estrazione delle proteine

- Aggiungere Proteinasi K ed incubare a 55° per 2 ore
- Raffreddare ed aggiungere un uguale volume di Fenolo-cloroformio-alcole isoamilico (25:24:1) portato a pH 8 con Tris-HCl
- Agitare vigorosamente fino ad emulsionare le due fasi liquide (la fase organica non è solubile nella fase acquosa)
- Centrifugare per 10' a 10000g per separare nuovamente le due fasi.

Spostare solo la fase acquosa superiore (contenente il DNA) in una nuova provetta da 10 ml.

Cosa succede? Le proteine si sono solubilizzate nella fase organica (fenolo - cloroformio) e vengono così separate ed allontanate.



3^A Fase : Precipitazione del DNA

- Aggiungere 1,8 ml di ISOPROPANOLO oppure 5 ml di Alcol Etilico.
- Chiudere il tubo e miscelare invertendo più volte fino a vedere il DNA che precipita riunendosi in una massa filamentosa.

Cosa succede? L'alcole è fortemente idrofilo e sottrae le molecole di acqua al DNA. Il DNA, escluso dalla soluzione e saturato dal Sodio, si separa e precipita in forma di sale sodico



4^A Fase (opzionale) : Lavaggio del DNA

Con una bacchetta di vetro avvolgere la matassa di DNA e trasferirla in una nuova provetta contenente etanolo al 70%.

Cosa succede? In queste condizioni il DNA è stabile a temperatura ambiente per un lungo periodo di tempo (diversi anni)



Opzionale : Preparazione del DNA genomico per l'analisi elettroforetica

- *Estrarre la matassa di DNA dalla provetta tramite la bacchetta di vetro*
- *Lasciarla asciugare all'aria tenendo la punta della bacchetta verso l'alto*
- *Una volta che il DNA è asciutto (15'-30') immergere la punta della bacchetta con il DNA in una provetta contenente 1ml di TE. Dopo qualche minuto muovere delicatamente la punta della bacchetta fino a rilasciare il DNA nella provetta. Rimuovere la bacchetta.*
- *Lasciare solvatare per circa 1 ora il DNA a 37° o a temperatura ambiente.*
- *Agitare la provetta fino a quando la soluzione non sarà uniformemente densa. In caso di eccessiva viscosità, aggiungere altro TE.*
- *Prelevare 1µl della preparazione, aggiungerlo a 10 µl di GLB e caricarlo sul gel a fianco di un marcatore di peso molecolare.*
- *Separare elettroforeticamente a 40V per 2 o più ore.*



Materiale necessario per la "Procedura Casalinga" :

- Una cipolla
- Un coltello ed un supporto per affettare la cipolla
- Una scodella ed un cilindretto di legno o un cucchiaio)
- Un quadrato di garza idrofila del tipo da medicazione
- Una provetta da 20 ml o un bicchierino da liquore
- Due provette da 10 ml o flaconcini con tappo
- Soluzione di LISI semplificata (vedi di seguito)
- Alcol Etilico 95° o alcol denaturato al 95% (meglio se non colorato)
- Alcol Etilico al 70% per conservare il DNA
- Un paio di pinzette



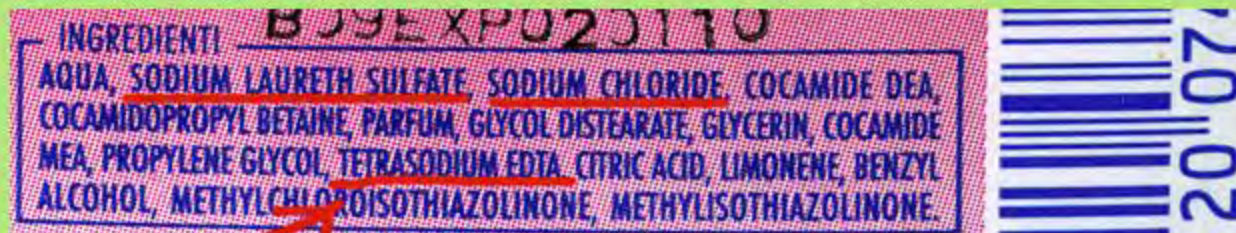
Estrazione di DNA genomico da una cipolla: Procedura "Casalinga"

Soluzione di LISI:

Sciogliere 1 cucchiaino raso di Sale da cucina (Sodio Cloruro) in mezzo bicchiere di Acqua distillata

Aggiungere circa il 10% di Sapone liquido per mani

Prima dell'acquisto controllarne l'etichetta: DEVE contenere **SDS** (Sodio Dodecil Solfato o Sodio lauril solfato) ed **EDTA** (Acido EtilenDiamminoTetracetico).



L'SDS è un componente abbastanza comune mentre L'EDTA si ritrova più frequentemente nei saponi non ecologici a basso costo. E' presente anche in alcuni shampoo e in detersivi per piatti. A differenza dei cosmetici, i detersivi per i piatti e per la casa non sempre indicano in etichetta la composizione dettagliata.



1^A Fase : Preparazione del lisato

- Affettare finemente la cipolla con il coltello.
- Trasferirne nella scodella un quantitativo corrispondente ad un cucchiaino da caffè colmo
- Aggiungere 5 ml di soluzione di lisi
- Schiacciare fino ad ottenere una massa viscosa ed abbastanza omogenea.

Cosa succede? Alla rottura delle membrane cellulari, il DNA fuoriesce ed entra in soluzione nel tampone di lisi insieme agli altri componenti cellulari solubili.



2^A Fase : Filtrazione per la separazione dei detriti cellulari

- **Formare un cono con la garza idrofila ed introdurlo nella provetta da 20 ml (o nel bicchierino) con l'aiuto di una matita**
- **Versare lentamente il contenuto della scodella nella garza in modo da trattenere i detriti grossolani e raccogliere nella provetta un liquido limpido.**
- **Misurando con un righello la provetta (o il flacone) riportare sulla stessa con un pennarello una scala graduata in 10 parti.**
- **Introdurre nella provetta il lisato limpido fino a raggiungere il secondo segno (due parti)**



3^A Fase : Precipitazione del DNA

- Aggiungere Alcol Etilico a 95° nella provetta fino a raggiungere il 7° segno (5 parti).
- Chiudere il tubo e miscelare invertendo più volte fino a che il DNA precipita riunendosi in una massa filamentosa.

Cosa succede? L'alcole è fortemente idrofilo e sottrae le molecole di acqua al DNA. Il DNA, escluso dalla soluzione e saturato dal Sodio, si separa e precipita in forma di sale sodico



4^A Fase (opzionale) : Lavaggio del DNA

Con una bacchetta di vetro avvolgere la matassa di DNA e trasferirla in una nuova provetta contenente etanolo al 70%.

Cosa succede? In queste condizioni il DNA è stabile a temperatura ambiente per un lungo periodo di tempo (diversi anni)

