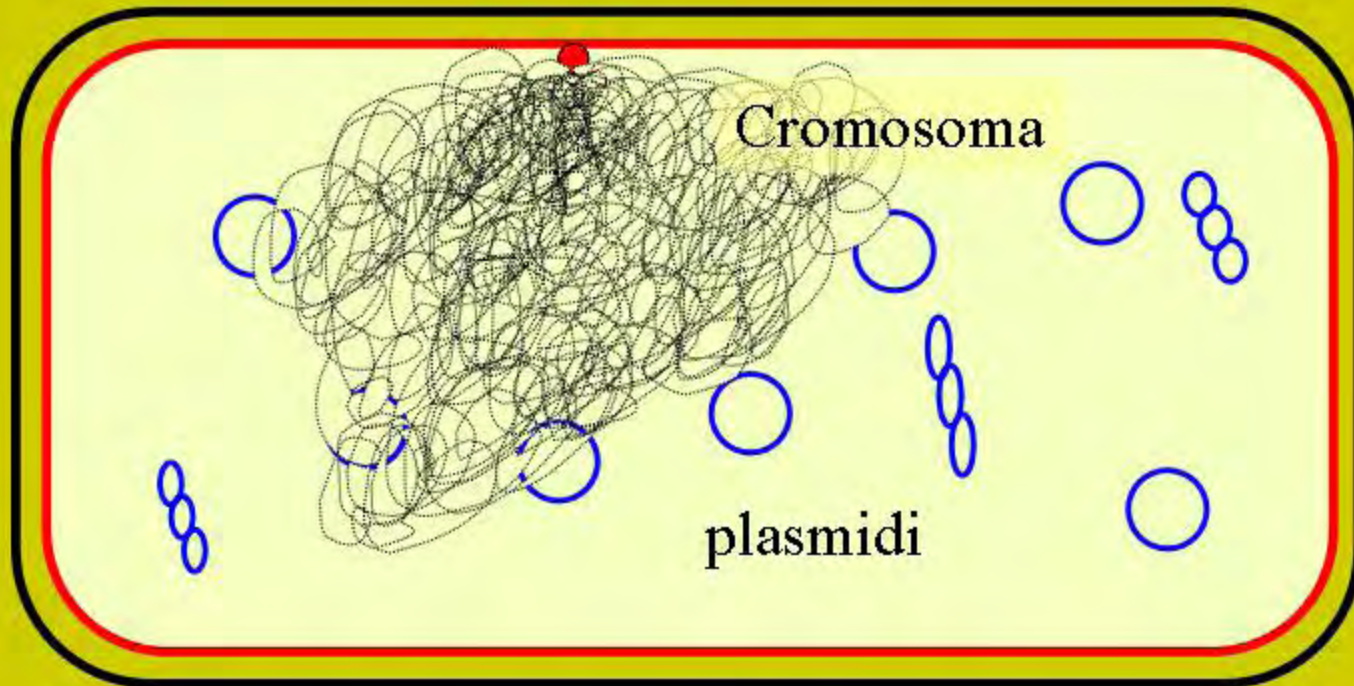


Estrazione di DNA plasmidiale da *Escherichia coli*: Lisi Alcalina



I plasmidi sono molecole di DNA episomale, cioè distinte dal cromosoma batterico. Sono liberi all'interno della cellula batterica e solitamente sono molto più piccoli del cromosoma. Codificano per geni solitamente non indispensabili al metabolismo di base della cellula, ma utili per sopravvivere in particolari condizioni ambientali. Possono essere presenti in copie multiple nella stessa cellula.

Estrazione di DNA plasmidiale da *Escherichia coli*: Lisi Alcalina



Partendo da una coltura liquida di cellule di *Escherichia coli* contenenti il plasmide, possiamo estrarre un gran numero di molecole plasmidiali. Ogni cellula contiene infatti numerose copie del plasmide ed in ogni millilitro di coltura ci sono miliardi di cellule batteriche.

1^A Fase : Rimozione del terreno colturale e risospensione delle cellule batteriche

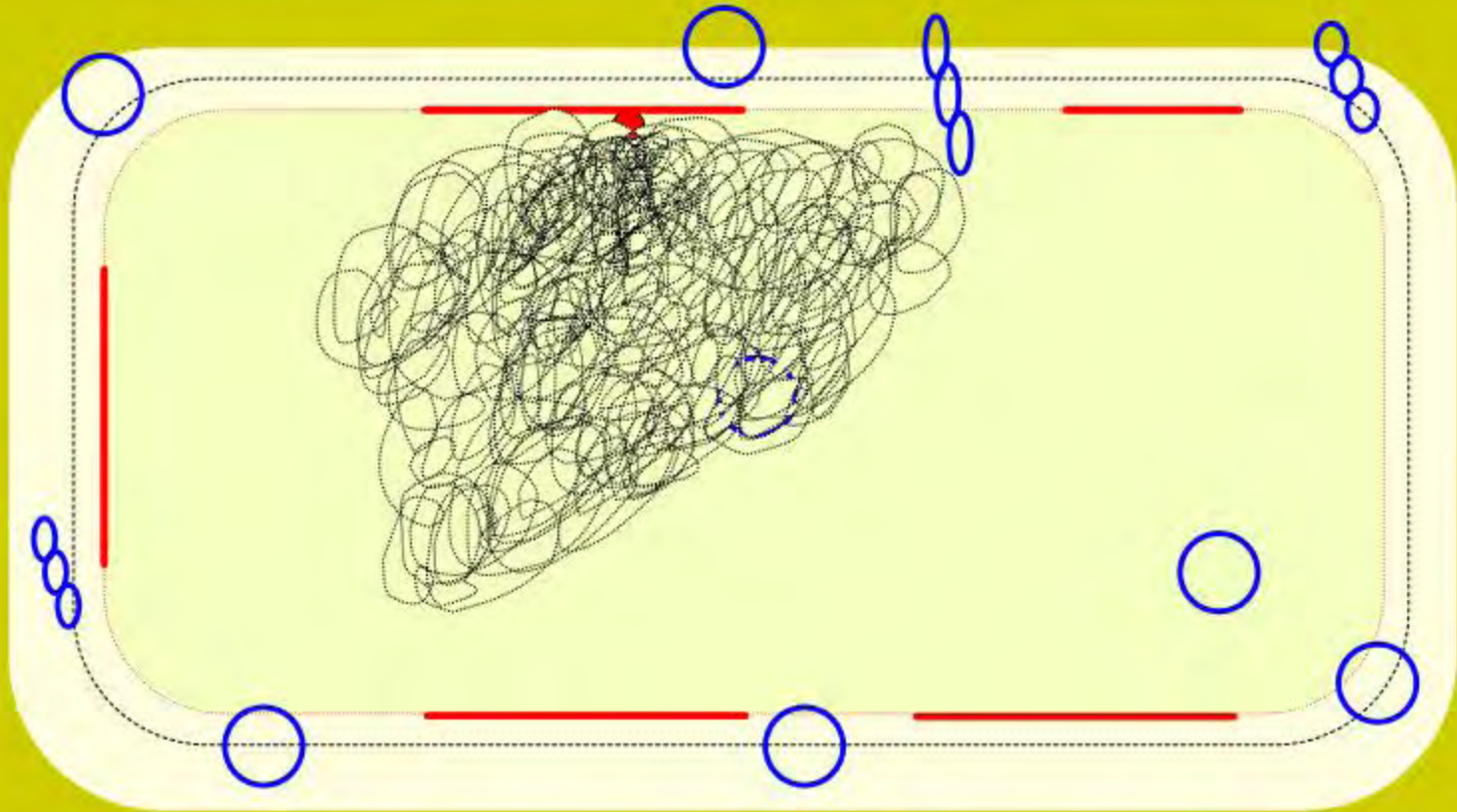
- **Introdurre 1 ml (1000µl) di coltura in una provetta contrassegnata e centrifugare per 5 minuti**
- **Rimuovere il liquido lasciando intatto l'ammasso di cellule sul fondo della provetta**
- **Risospendere le cellule in 300 µl di soluzione 1 (S1)**
- Le cellule sono ancora integre.

S1= EDTA sottrae alla soluzione il Magnesio, inibendo l'azione delle nucleasi che potrebbero degradare il DNA; RNAsi alla rottura della cellula, frammenterà l'RNA; TRIS pH8 Mantiene in soluzione il DNA

2^A Fase : Lisi in Tampone Alcalino

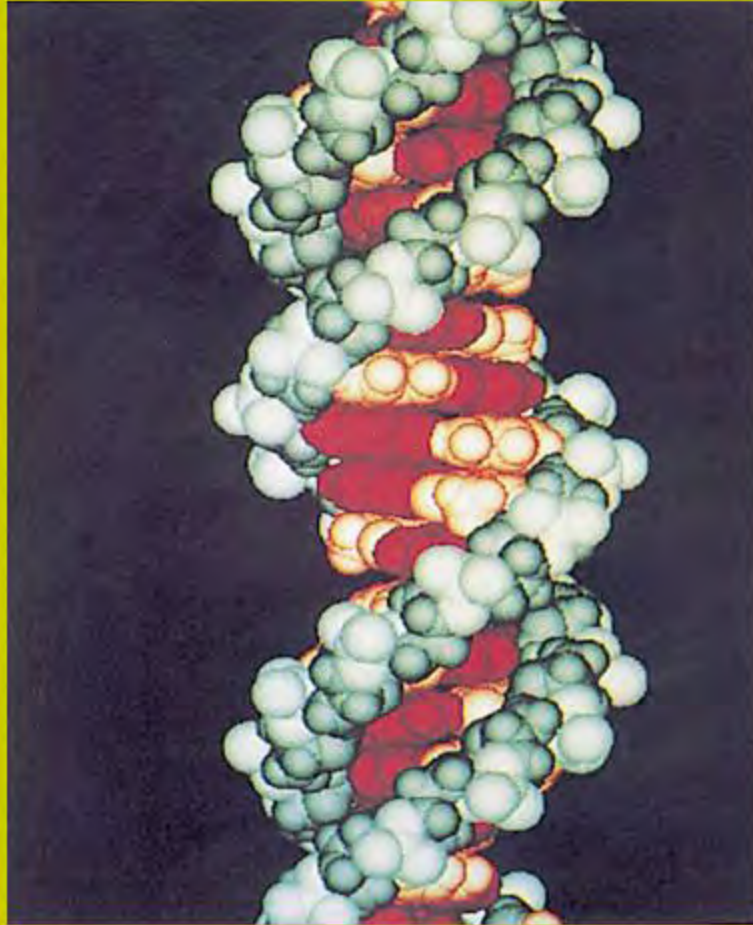
- **Aggiungere 300 µl di soluzione 2 (S2) e miscelare delicatamente invertendo il tubo per cinque volte.**
 - La soluzione deve diventare limpida e viscosa.
 - Le cellule si lisano per l'azione dell'SDS (detergente) sulle membrane
 - Il DNA si denatura a causa del pH alcalino determinato dall' NaOH
 - Il DNA plasmidico non riesce a denaturarsi completamente perchè tende a superavvolgersi
-
- **S2 = NaOH (soda Caustica), SDS (sodio dodecil solfato) detergente presente anche nei detersivi per uso domestico**

Estrazione di DNA plasmidiale da *Escherichia coli*: Lisi Alcalina



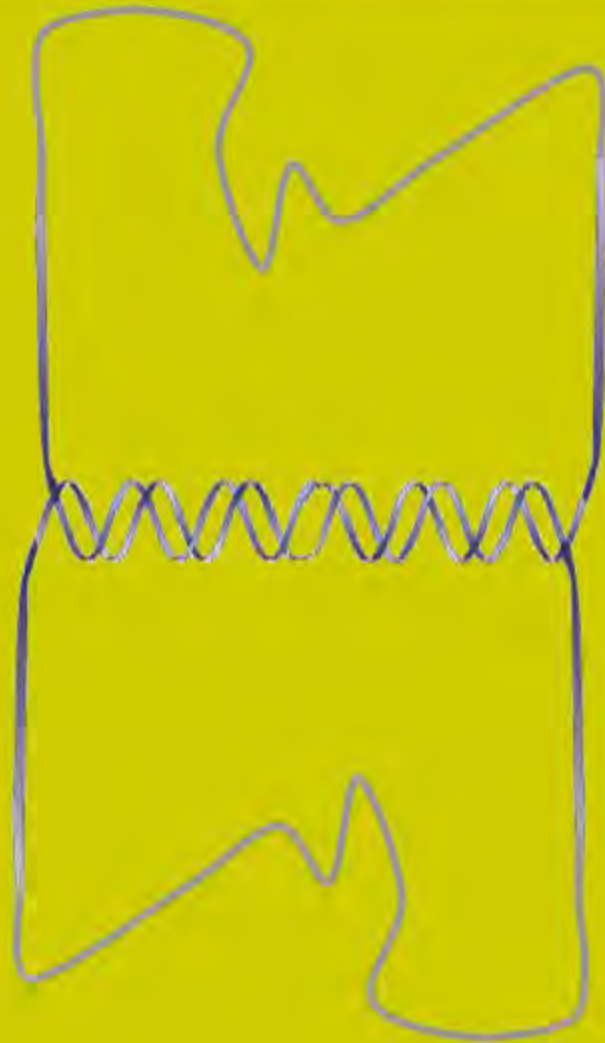
Rottura della membrana cellulare e liberazione del plasmide

In condizioni alcaline il DNA si denatura



Estrazione di DNA plasmidiale da *Escherichia coli*: Lisi Alcalina

- Un plasmide circolare non si può denaturare completamente ma anzi ma anzi, in alcune regioni, si superavvolge.
- Appena le condizioni lo consentono, ritorna molto rapidamente alla conformazione originale



3^A Fase : Neutralizzazione precipitazione dei detriti cellulari

- **Aggiungere 300 µl di soluzione 3 (S3) e mescolare delicatamente.**
- L'aggiunta di un sale acido concentrato provoca la neutralizzazione del pH e la tendenza del DNA a riacquistare la conformazione originale. Il DNA plasmidico la recupera molto rapidamente.
- L'elevata concentrazione salina provoca la precipitazione dell'SDS insieme alle proteine ed ai detriti cellulari. Il DNA cromosomale precipita anch'esso perché non ancora rinaturato e perché legato ai frammenti di membrana cellulare.
- Il DNA plasmidico rinaturato rimane in soluzione
- **Centrifugare per 5 minuti e trasferire il surnatante limpido in un nuovo tubo contrassegnato**
- **S3 = Potassio acetato a pH 5,1**

4^A Fase : Precipitazione del DNA Plasmidiale

- **Aggiungere 0,9 volumi di ISOPROPANOLO. Per 800µl di soluzione => 720µl di ISOPROPANOLO**
- L'alcole è fortemente idrofilo e sottrae le molecole di acqua al DNA. Il DNA, escluso dalla soluzione, si separa e precipita (ma le molecole sono troppo piccole per essere visibili ad occhio nudo)
- **Centrifugare per 5 minuti e rimuovere il surnatante senza disturbare il precipitato minuscolo in fondo alla provetta.**
- *Opzionale: Aggiungere 500 µl di Etanolo 70% centrifugare nuovamente e rimuovere il surnatante.*
- **Lasciare asciugare all'aria.**

5^A Fase : Risospensione del DNA Plasmidiale

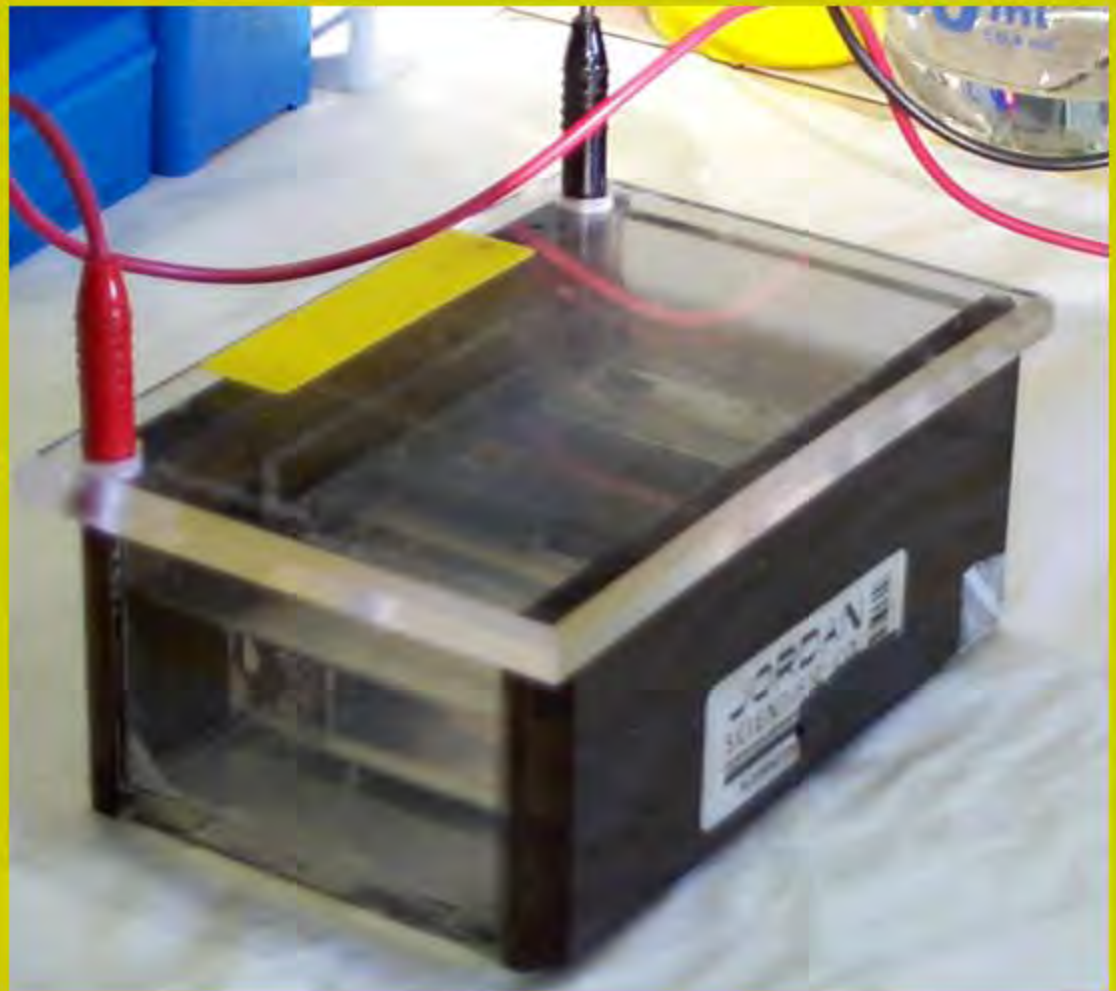
- **Aggiungere 20 µl di TE. Agitare accuratamente e centrifugare brevemente per riportare tutta la soluzione sul fondo**
 - Il DNA plasmidiale si dissolve nuovamente in condizioni neutre-leggermente alcaline
-
- **TE = TRIS pH 8 Mantiene stabile il pH, garantendo la solubilità del DNA; EDTA Preserva il DNA dal degrado enzimatico**

Preparazione dei campioni per l'elettroforesi e caricamento dei campioni

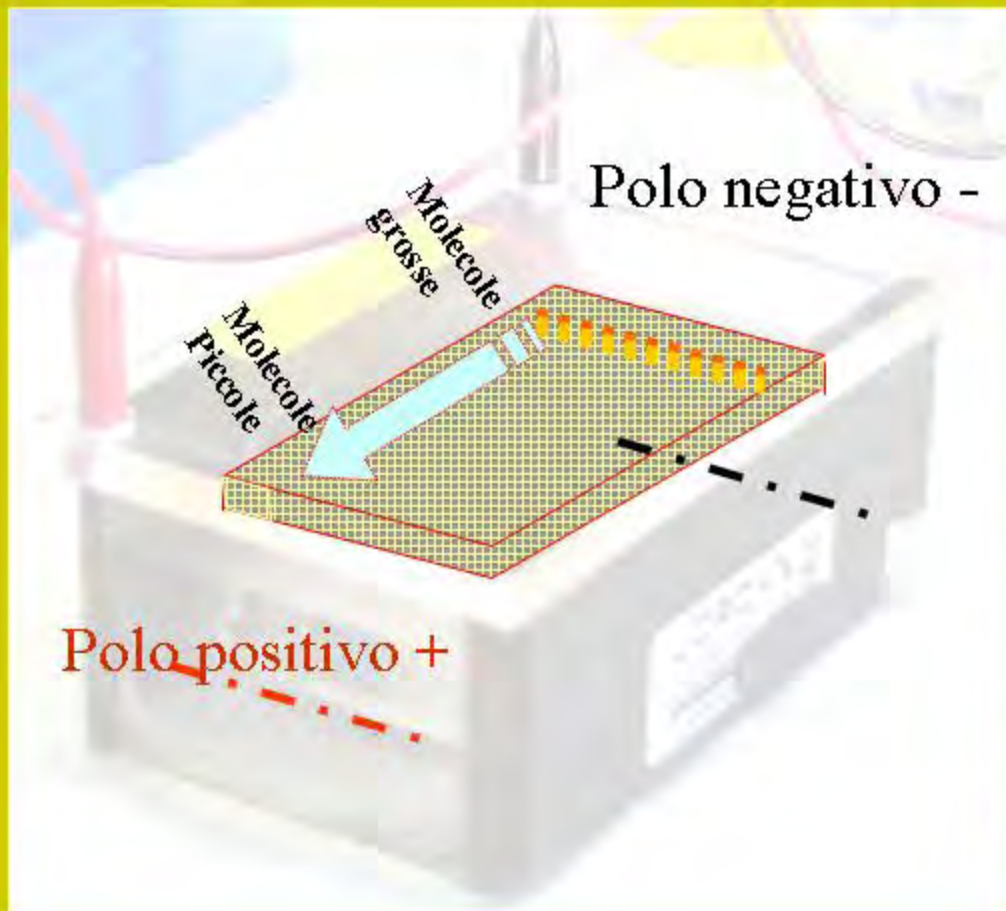
- Prelevare 2 μ l di soluzione di plasmide ed aggiungerla al tubo contenente il tampone di caricamento GLB.
 - Agitare e centrifugare brevemente.
 - Caricare la miscela in un pozzetto del gel di agarosio e trascrivere la posizione del proprio campione sull'apposito modulo.
-
- **GLB** = Ficoll - Polisaccaride inerte che addensa la soluzione permettendole di posizionarsi sul fondo del pozzetto.
 - Xilene cianolo e Blu di Bromofenolo - Coloranti dotati di carica elettrica, migrano nel gel rendendo direttamente visibile il procedere dell'elettroforesi.
 - EDTA = Preserva il DNA dal degrado enzimatico

Elettroforesi in gel di Agarosio

Le molecole di DNA possono essere separate in base alla loro dimensione, facendole migrare attraverso una matrice polimerica sotto l'attrazione di un campo elettrico



Elettroforesi in gel di Agarosio



Il DNA viene introdotto nei pozzetti del gel di agarosio. Nel tampone di elettroforesi a pH leggermente alcalino il DNA si dissocia ed assume carica negativa. Applicando una differenza di potenziale tra gli elettrodi si forma un campo elettrico che spinge il DNA attraverso le “maglie” del gel. Le molecole più piccole e compatte si muoveranno più velocemente. Si otterrà perciò una separazione legata alla dimensione ed alla forma delle molecole di DNA.

Le tecniche dell'ingegneria Genetica: I coloranti Intercalanti

•I coloranti intercalanti si legano tra le due eliche del DNA. Quando la molecola di DNA viene colpita dalle radiazioni UV, trasferisce l'energia al colorante che emette una radiazione luminosa a frequenza più bassa (fenomeno della Fluorescenza)



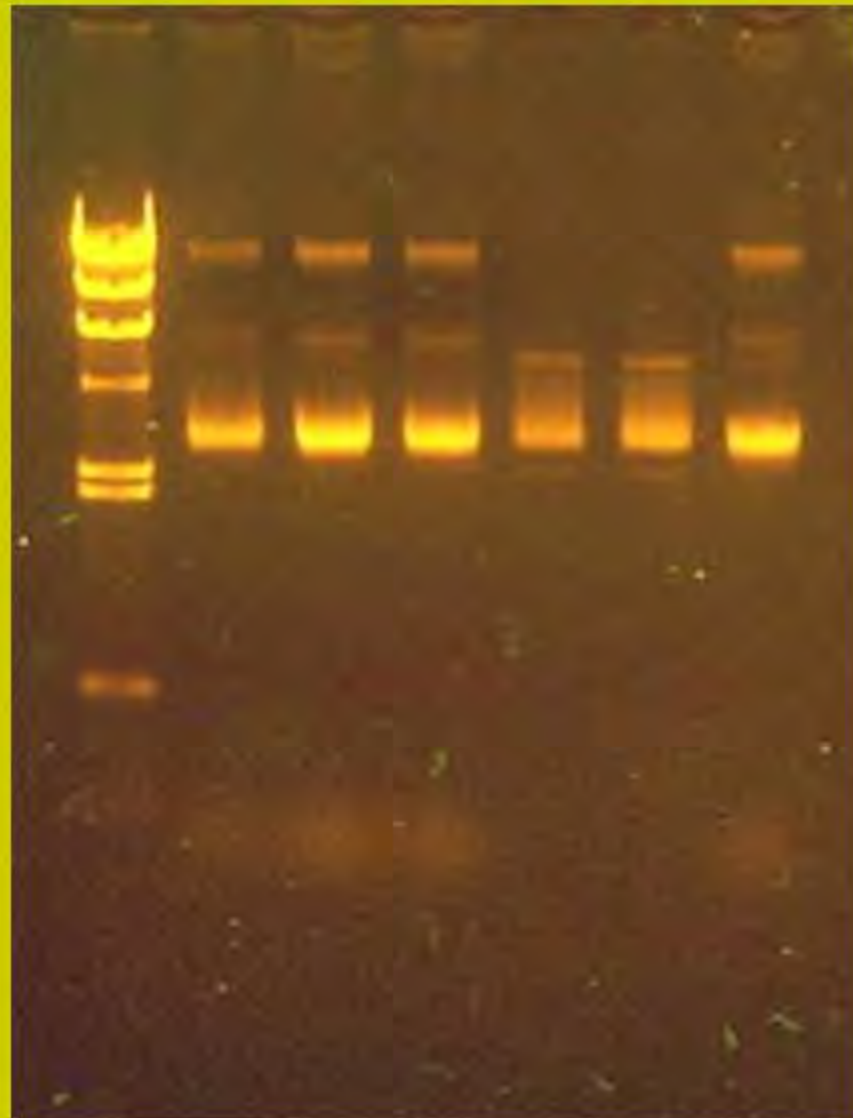
Le tecniche dell'ingegneria Genetica: I coloranti Intercalanti

*Gel di agarosio 0.7 %
Colorazione con Etidio
Bromuro*

Ordine di caricamento

Marker (Lambda HindIII)

1. Plasmide "A"
2. Plasmide "A"
3. Plasmide "A"
4. Plasmide "B"
5. Plasmide "B"
6. Plasmide "A"



*Distribuzione delle
bande di DNA nel
marcatore di peso
molecolare
Lambda/HindIII*

Le tecniche dell'ingegneria Genetica: I coloranti Intercalanti

Il plasmide, in forma nativa è una molecola circolare soggetta a superavvolgimento e pertanto presenta una forma molto compatta.

Per questo motivo la sua mobilità elettroforetica è superiore a quella di una molecola lineare della stessa dimensione.

Le altre bande rappresentano diverse conformazioni strutturali della stessa molecola, cioè concatamero e forme circolari non superavvolte.

Plasmide

Forma Concatamerica

Forma circolare

Forma superavvolta

Residuo di
RNA

