



## ISOLAMENTO DEL DNA DA TESSUTI

A cura di Piergiovanni Rossi e Rossana Baglioni

**Obiettivi:** Acquisire conoscenze relative alle proprietà fisiche del DNA isolandolo da tessuti viventi. Comprendere le finalità di ciascun passaggio della procedura di isolamento in relazione alle proprietà fisiche e biochimiche del materiale genetico.

Questa esercitazione si propone l'obiettivo di fornire una esperienza diretta di isolamento e successiva estrazione del DNA, da tessuti vegetali. Per esempio a partire dalle cipolle intere, si ottiene un preparato abbastanza puro di DNA, contenente miliardi di geni. Dopo l'isolamento, il DNA si può conservare in alcool o essiccato.

**Materiali:** Omogeneizzatori Potter, beker e beute di varie capacità, pipette graduate, bacchette di vetro, imbuti, garze, frutta a polpa morbida, cipolla o pomodoro.

**Soluzione omogeneizzante:** Per 2 l di soluzione mescolare 100 g di sodio lauril solfato + 17,54 g di NaCl + 8,82 g di sodio citrato + 0,584 g di EDTA. Portare a 2 l con acqua distillata. Conservare a T ambiente per evitare che la soluz. diventi opaca.

### Procedimento:

**Fase A : Omogeneizzazione.** Affinché si possa estrarre il DNA dai nuclei dei tessuti, si deve prima rompere le pareti cellulari, le membrane plasmatiche e nucleari. Questa operazione può essere eseguita omogeneizzando i tessuti; il DNA si separerà poi dalle proteine cromosomiche utilizzando la soluzione omogeneizzante.

**Fase B : Deproteinizzazione.** Le proteine cromosomiche separate dal DNA si devono denaturare, precipitano con cloroformio per essere poi allontanate dall'omogeneizzato. Il cloroformio non si miscchia con l'omogeneizzato acquoso e perciò forma una fase (strato) separata, al di sotto; dell'omogeneizzato. Le proteine si raccolgono tra le due fasi, mentre il DNA rimane nell'omogeneizzato.

**Fase C : Precipitazione del DNA.** L'omogeneizzato dovrebbe contenere solo DNA, il quale è insolubile in etanolo ghiacciato, perciò aggiungendolo alla miscela, restano in soluzione tutte le sostanze tranne il DNA. Se le operazioni sono state effettuate correttamente, la sostanza genetica dovrebbe formare un precipitato spesso, bianco e nastriforme che si può raggomitolare avvolgendolo su di una bacchetta di vetro. Diversamente il DNA danneggiato si presenta come un precipitato bianco spezzettato.

### Fase A)

- 1) Tagliare in cubetti il frutto o il vegetale. Pesarne 50 g e trasferirli in un beker da 250 ml.
- 2) Aggiungere 100 ml di soluz. omogeneizzante e lasciare il preparato in bagnomaria a 60° C per 15 minuti esatti. (Questo trattamento termico ammorbidisce i tessuti e consente alla soluz. omogeneizzante di penetrarvi. Inoltre denatura molti enzimi che potrebbero disturbare l'isolamento del DNA).
- 3) Raffreddare rapidamente fino a 15-20° C immergendo il beker in acqua e ghiaccio. (Questo passaggio impedisce la denaturazione del DNA).
- 4) Versare il preparato in un omogeneizzatore e omogeneizzare per 45 secondi lentamente, poi altri 30 secondi più velocemente. (Questa operazione apre le cellule e ne fa uscire il contenuto: grassi, proteine, acidi nucleici).
- 5) Travasare tutto in un beker da 1000 ml e mantenere l'omogeneizzato immerso in acqua e ghiaccio per 15-20 minuti.
- 6) Filtrare l'omogeneizzato attraverso 4 strati di garza in un beker da 500 ml. Fare attenzione a non lasciar passare la schiuma.

(a) A questo punto dove si trova il DNA ? .....

### Fase B)

- 7) Versare 80 ml di etanolo al 95% in una beuta da 250 ml che immergerete completamente nel ghiaccio.

8) Prendere solo 50 ml dell'omogeneizzato filtrato e metterlo in una beuta da 250 ml, con una pipetta da 5 ml aggiungete lentamente lungo le pareti della beuta, 2 ml di cloroformio.

9) Fate ruotare delicatamente il contenuto della beuta. (Questo movimento fa aumentare il contatto tra lo strato di cloroformio e l'omogeneizzato, ma è necessario non farli mescolare).

(b) *Che cos'è il materiale bianco che si trova nello strato tra l'omogeneizzato e il cloroformio?*  
.....

10) Versare l'omogeneizzato in un'altra beuta da 250 ml lasciando indietro il cloroformio e lo strato di proteine. Sciacquare la beuta e ripetere l'operazione (i passaggi dall' 8 al 10) altre 4 volte. Alla quinta ripetizione si separerà la quantità molto più piccola di proteine. E' importante che non rimanga cloroformio nell'omogeneizzato, quindi può essere necessario sacrificare una piccola quantità nell'ultima operazione. (Se in qualsiasi momento dovesse formarsi un'emulsione seguite le istruzioni della scheda per il trattamento dell' emulsione.)

11) Dopo il quinto trattamento versare delicatamente l'omogeneizzato in un beker da 250 ml.

### **Fase C)**

12) Immergere il beker contenente l'omogeneizzato deproteinizzato in un bagno di acqua e ghiaccio, finché non abbia raggiunto i 10-15°C.

13) Aggiungere lentamente l'etanolo molto freddo (mantenuto in freezer) facendolo colare lungo la parete del beker, finché non appaia il precipitato bianco e filamentoso del DNA.

14) Raccogliere i fili di DNA con una bacchetta di vetro, che farete ruotare in un solo senso dentro il beker. Continuate la rotazione e muovete la bacchetta in larghi cerchi attraverso tutto il contenuto del becker.

(c) *Perché è importante ruotare la bacchetta sempre nello stesso senso?*.....

15) Se volete conservare il DNA preparato, liberatelo delicatamente dall'estremità della bacchetta mettendolo in una bottiglietta con tappo smeriglio contenente etanolo al 50%.

### **Trattamento delle emulsioni:**

Se avete ruotato troppo forte la beuta formando un'emulsione, dovete centrifugare il preparato.

- a) Versate l'emulsione in una provetta da centrifuga e centrifugate per 5 minuti, prima lentamente poi aumentando la velocità gradualmente fino a raggiungere la velocità massima.
- b) Travasate attentamente l'omogeneizzato dalla provetta in una beuta da 250 ml, lasciando sul fondo il cloroformio e lo strato di proteine.
- c) Ripetete i passaggi dall'8 al 10 per il numero di volte che ancora restava.

### **ATTENZIONE:**

Il cloroformio è nocivo per inalazione, ingestione. Lavorare sotto cappa.

Gli altri prodotti impiegati non presentano particolare pericolosità.

### **SMALTIMENTO DEI RIFIUTI:**

Versare nel contenitore di raccolta liquidi.