

Estrazione del DNA dalle cellule del pomodoro

(o altro frutto a polpa molle)

Introduzione

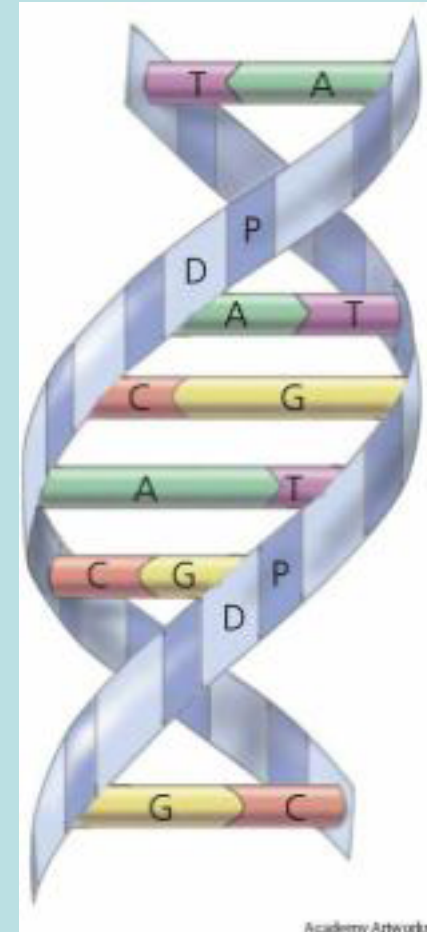
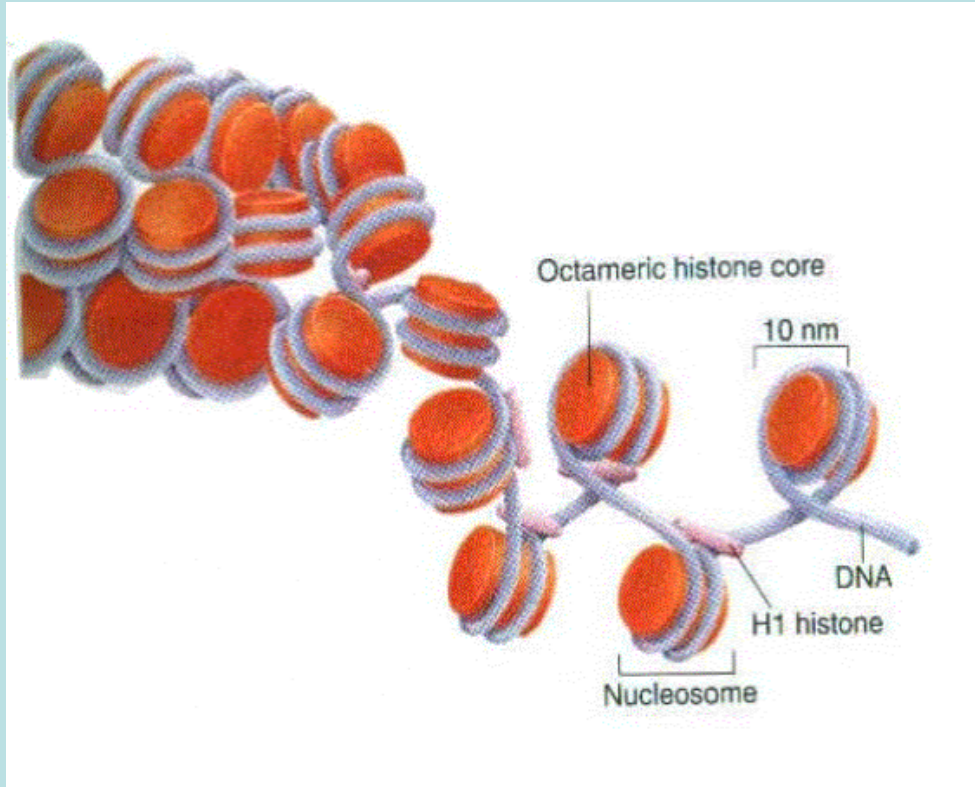
- L'obiettivo di questa esperienza è quello di osservare la molecola degli acidi nucleici, dopo averla separata dall'involucro nucleare e cellulare in cui è contenuta all'interno della cellula. Il campione biologico di partenza, da cui si estrarrà il DNA, potrebbe essere di vario tipo, noi sceglieremo il pomodoro o frutta a polpa molle tipo kiwi.

Fasi dell'esperimento

1. Demolizione della struttura cellulare e digestione delle proteine:

In questa prima fase dobbiamo trattare la polpa di pomodoro in modo da disgregare la struttura cellulare, cioè demolire pareti e membrane cellulari e permettere al DNA di uscire dalla cellula e di srotolarsi senza perdere la struttura ad elica. Dobbiamo anche allontanare le proteine attorno alle quali il filamento si avvolge e si ripiega ripetutamente su se stesso; queste proteine si chiamano istoni e devono essere denaturate cioè digerite.

Organizzazione del DNA attorno agli istoni



**Struttura a doppia
elica del DNA**

Fasi:

2. Filtrazione del miscuglio per ottenere l'estratto di DNA in soluzione :

- **in questa fase si deve filtrare il miscuglio cellulare per ottenere un estratto in cui il DNA è libero in soluzione.**

3. Precipitazione del DNA disidratato :

- **a questo punto il DNA libero sarà separato sfruttando la sua proprietà di precipitare in alcool etilico. L'alcool etilico disidrata il DNA e lo rende insolubile cio' si manifesta con precipitazione del DNA che si addensa come una gelatina trasparente o biancastra**

Materiale occorrente:

- 100g di pomodoro o frutta**
- Soluzione di estrazione: 3g NaCl + 10ml**
- detersivo liquido per stoviglie + 100ml H₂O**
- Solvente precipitante: alcool etilico 95% freddo.**
- Provette, becher alto, cilindro graduato, imbuto, cucchiaini, pipette contagocce, garze, frullatore**

Procedimento:

1. Demolizione struttura cellulare e digestione proteine:

- **Preparare la soluzione di estrazione:** pesare 3g di NaCl e sciogliere in 100 ml di H₂O. Aggiungere 10ml di detersivo liquido. (NaCl in soluzione denatura la struttura degli istoni a cui è legata la catena del DNA;il detersivo agisce rompendo le membrane cellulari e nucleari , le scioglie)
- Frullare circa 100g di polpa di pomodoro o frutta (si può anche schiacciare bene in un mortaio con pestello)
- Versare il frullato nella soluzione di estrazione e mescolare bene.

2. Filtrazione del miscuglio per ottenere l'estratto di DNA in soluzione:

- Allestire un cilindro con imbuto e garze per filtrare il preparato (togliere eventuale schiuma)

Rimozione delle proteine

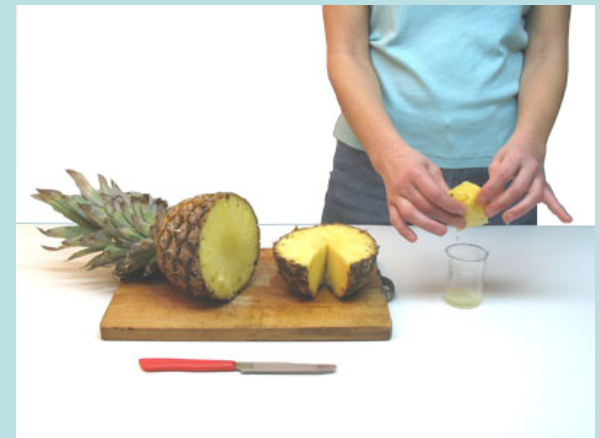
(opzionale)

Con questa operazione otteniamo un DNA più puro, ma ai fini dell'osservazione del DNA non è indispensabile. Il DNA è avvolto attorno a proteine chiamate *istoni*. Per allontanarle, si possono usare enzimi proteolitici quale per esempio la "Proteasi". Questa sostanza deve essere acquistata presso negozi che vendono prodotti di chimica. **E' possibile sostituirla efficacemente con una sostanza più facile da reperire. Si tratta del succo di ananas, il quale contiene la bromelina, una sostanza capace di demolire le proteine negli amminoacidi di cui sono composte e di facilitarne quindi l'eliminazione.**

Rimozione delle proteine

(materiali e metodo)

- **MATERIALI**
 - Enzima proteolitico (es: Proteasi oppure succo di ananas);
- **METODO**
 - Versate in una provetta 5 cc di soluzione filtrata;
 - aggiungete 1 cc di succo di ananas ed agitate;
 - aspettate 2 - 3 minuti per lasciare il tempo alla bromelina di agire.



3. Precipitazione del DNA disidratato :

- Prelevare 5 ml di filtrato con una pipetta contagocce e porlo in provetta
- Aggiungere 5 ml di alcool etilico 95% freddo (tenuto in frigo) facendolo colare lungo le pareti della provetta molto lentamente: l'alcool e il filtrato non si devono mescolare, l'alcool meno denso si stratifica sul filtrato e si noteranno due fasi , non scuotere ma agitare delicatamente
- Si formeranno bollicine di gas al contatto alcool freddo /filtrato poi si osserverà la formazione di una sostanza trasparente gelatinosa che man mano aumenta e assomiglia a una medusa.
- L'alcool disidrata il DNA e lo fa condensare in una sostanza gelatinosa e filamentosa che corrisponde alle catene a doppia elica.



4. Osservazione al microscopio ottico :

- · Si può osservare al microscopio il DNA estratto: si preleva, con lungo filo metallico terminante ad uncino, un po' di sostanza gelatinosa arrotolandola su se stessa, si deposita su un vetrino portaoggetti si mescola delicatamente in una goccia di acqua distillata
- · Poi si colora con una goccia di blu di metilene. Questo colorante è basico quindi si lega con i substrati acidi (DNA)
- · Si copre il preparato con un vetrino coprioggetto e si osserva fino a ingrandimento 100X
- · Non si riconoscerà la struttura a doppia elica del DNA, che non è visibile neanche al microscopio elettronico, ma si vedranno fiocchetti e filamenti colorati di blu che sono aggregati di catena di DNA.

CONCLUSIONE

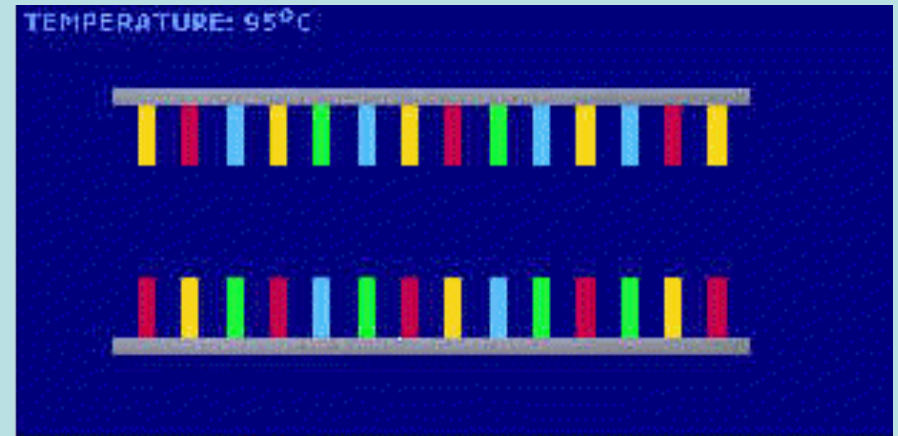
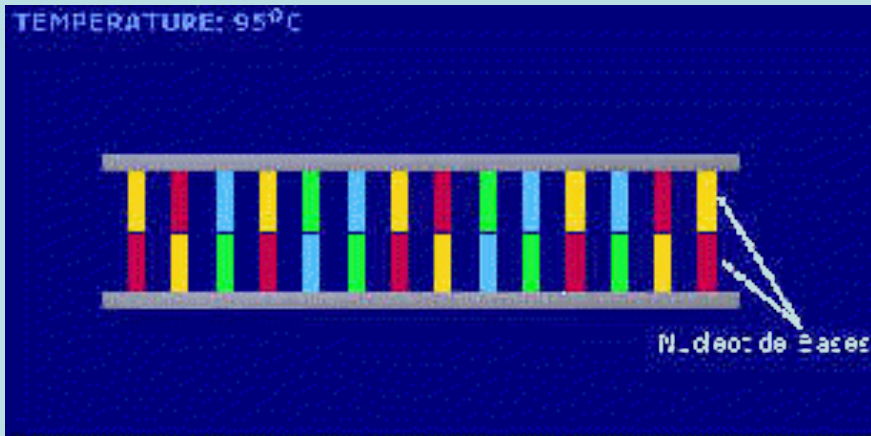
- Questo esperimento permette di avere una idea, per quanto piccola, dei procedimenti che vengono usati in biologia molecolare. Spesso sono operazioni semplici, come queste. In altri casi invece si tratta di procedure complesse. In tutti i casi è però indispensabile avere delle conoscenze di biologia e di chimica per capire quello che si sta facendo e per operare in modo corretto.

La PCR – Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)

- La reazione a catena della polimerasi permette che specifiche regioni di DNA provenienti da un piccolissimo campione possano essere esaminate velocemente. La PCR è entrata ormai nell'uso comune come procedura diagnostica nella genetica umana. Nella ricerca di base, la PCR permette invece il recupero di intere sequenze comprese tra ogni due estremità a sequenza nota.

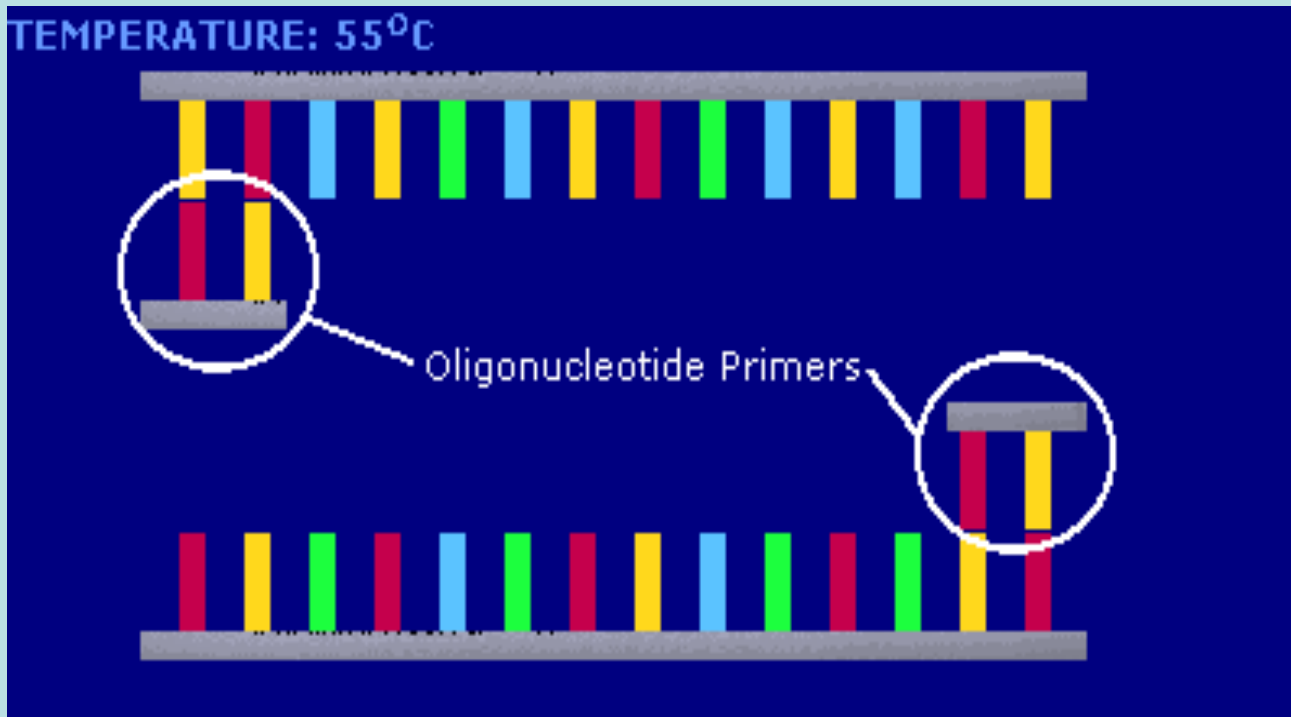
PCR: schema

Fase 1: il segmento di DNA viene riscaldato a 95°C, separando i due filamenti della doppia elica.



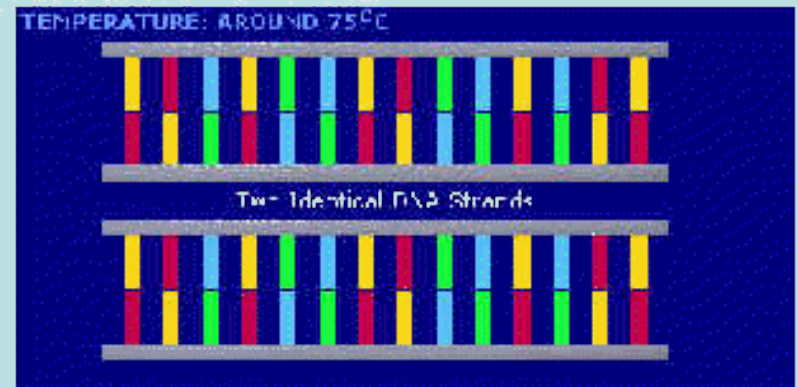
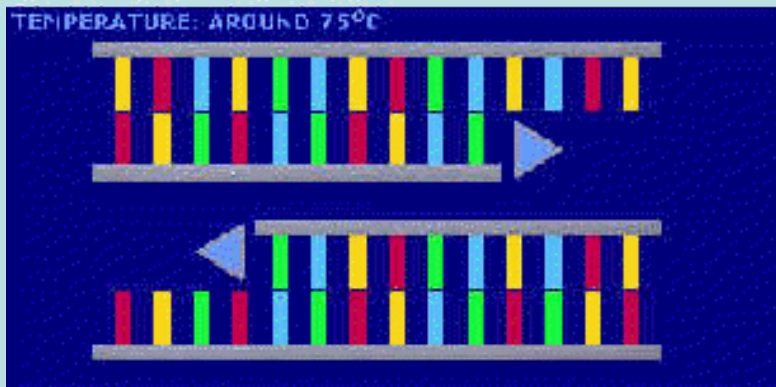
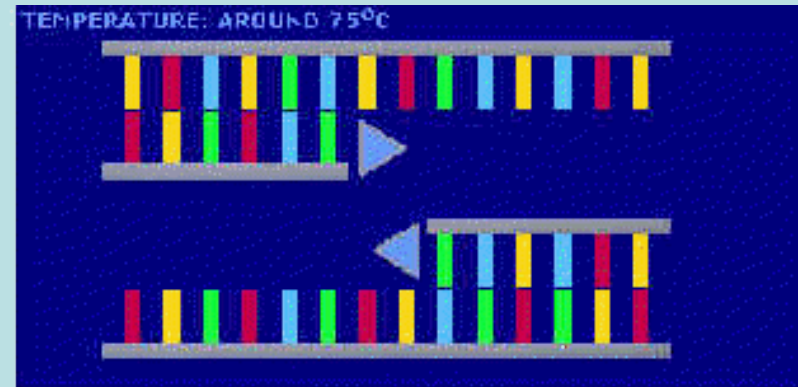
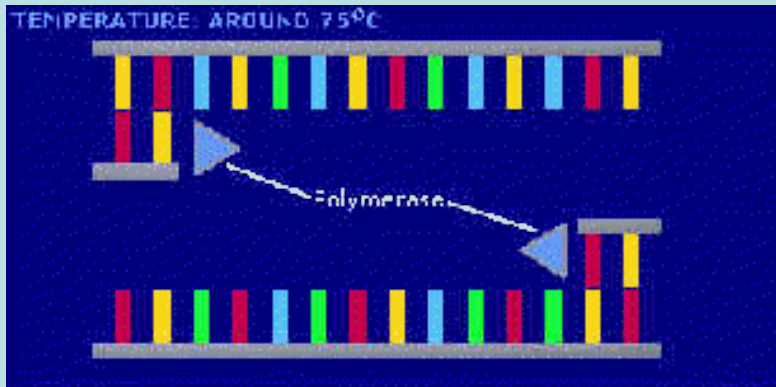
PCR: schema

Fase 2: la temperatura viene raffreddata a 55°C e vengono aggiunte le sonde (sequenze) oligonucleotidiche alla soluzione. Le sonde marcano i bordi del segmento di DNA da duplicare.



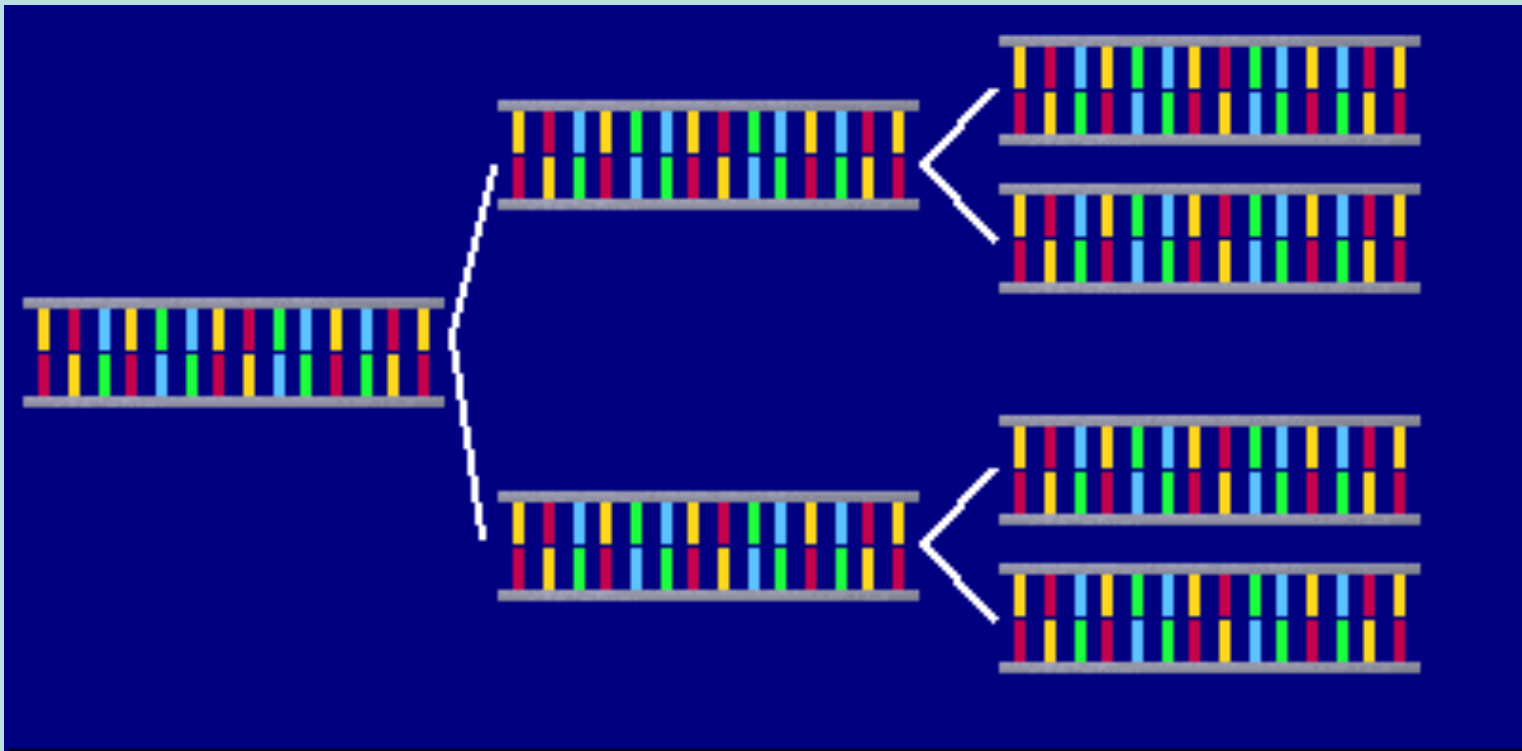
PCR: schema

Fase 3: viene aggiunta la polimerasi alla soluzione. La polimerasi agisce aggiungendo le basi speculari corrispondenti ai due filamenti di DNA, creando come risultato due segmenti identici di DNA



PCR: schema

Fase 4: il processo viene ripetuto, duplicando ogni volta il numero di segmenti di DNA nella soluzione. Dopo trenta ripetizioni, possono essere fatte oltre un milione di copie del segmento di DNA.



sequenze oligonucleotidiche

- Gli oligonucleotidi sono formati da una corta catena di basi nucleotidiche che si lega in modo specifico ad una sequenza complementare di nucleotidi presenti in un filamento di DNA o RNA.

[Torna a diap.16](#)