

LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

ESPERIENZA: ESTRAZIONE DEL DNA

Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
 - Il procedimento
 - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
 - Scheda per lo studente
- Commenti e proposte: Elettroforesi e determinazione per via spettrofotometrica
- Bibliografia/ sitografia

OBIETTIVO:

OTTENERE CAMPIONI QUANTO PIU' PURI DI DNA DA CELLULE ANIMALI E VEGETALI.
TESTARE PER VIA STRUMENTALE LA QUALITA' DEL RISULTATO RAGGIUNTO

INTRODUZIONE

L'estrazione del DNA dalla frutta (kiwi, banana, fragole) è una delle esperienze di laboratorio più frequenti nella programmazione didattica e la semplicità della procedura fa sì che sia eseguibile in laboratori persino improvvisati. Anche nella nostra scuola compivamo questo esperimento nell'ambito del programma di scienze di seconda.

La lettura di alcuni articoli, che mettevano in luce il fatto che lavorando con la frutta si estragga una enorme quantità di pectina, ci ha spinti a ricercare in rete altre procedure da testare in laboratorio

Il processo di estrazione del DNA eseguibile in un normale laboratorio scolastico prevede diverse fasi:

- l'utilizzo di una soluzione di estrazione, composta da NaCl e detergente, e il riscaldamento a 60°C.
- Il raffreddamento in un bagno di ghiaccio
- La filtrazione e l'aggiunta di succo di ananas (contenente la bromelina)
- L'estrazione con etanolo freddo

Questo trattamento è necessario per "liberare" il DNA presente all'interno delle cellule del campione utilizzato.

Il detergente infatti forma complessi con i fosfolipidi e le proteine di membrana, provocandone la precipitazione. Il catione Na⁺ inoltre schermano i gruppi fosfato presenti nel DNA, permettendo la loro associazione. Il riscaldamento a 60°C infine denatura parzialmente gli enzimi responsabili dell'idrolisi del DNA, impedendo quindi la frammentazione del materiale genetico da estrarre.

Il raffreddamento è importante, in quanto previene che il DNA subisca una frammentazione ad opera della temperatura.

Il campione viene in una seconda fase filtrato (e anche centrifugato) per separare le proteine solubili e il DNA dal resto.

Si aggiunge una piccola quantità di succo di ananas in modo da liberare il DNA dalle proteine a cui è ancora legato in questa fase.

Gli acidi nucleici sono insolubili in etanolo freddo: per questo motivo nell'ultimo passaggio viene aggiunto l'alcol etilico, che si stratifica sulla fase acquosa ed estrae il DNA, che si manifesta come un materiale filamentoso.

L'idea portante dell'esperimento

Ispirandoci a quanto letto in vari articoli, riportati nella sitografia, abbiamo deciso di variare la "fonte" di DNA rispetto a quanto sinora fatto negli anni passati. Abbiamo deciso di utilizzare piselli surgelati e fegato di pollo. Inoltre abbiamo utilizzato al posto del succo di ananas una soluzione ottenuta sciogliendo alcune pastiglie per la pulizia enzimatica delle lenti a contatto in poca acqua (le pastiglie contengono un mix di proteasi).


Nel Triennio, con la strumentazione adeguata, ci si può spingere a determinare la qualità del DNA estratto e la sua quantità.

Vengono per questo proposte due procedure, relative a una corsa elettroforetica su gel di agar agar (con reagenti adeguati al grado di sicurezza di un laboratorio didattico) e alla determinazione per via spettrofotometrica della quantità di DNA estratto e della sua purezza.

Per la lunghezza di alcune fasi della procedura strumentale, alcuni passaggi possono essere eseguiti dal tecnico di laboratorio prima che la classe entri in laboratorio.

LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

Reagenti/ materiale

- NaCl
- Detergente per piatti
- Pastiglie per la pulizia enzimatica delle lenti a contatto
- Piselli surgelati (50 g) oppure fegato di pollo (100 g)
- Etanolo  H 225, P 210 (tenuto in freezer per 24 h)

Strumenti e vetreria

- Bilancia tecnica
- Bagno maria
- Bagno di ghiaccio
- Becher da 200/400 mL
- Filtro da caffè americano
- Centrifuga
- Provette
- Pipetta graduata da 10 mL
- Pipette


Per le procedure sperimentali:

- Cella elettroforetica
- Spettrofotometro
- Micropipette
- Soluzione di caricamento x elettroforesi (vedere ricetta in scheda elettroforesi)
- 1XTBE (vedere ricetta in scheda elettroforesi)
- Blu di metilene 0,02%

SCHEDA PER LO STUDENTE

Estrazione DNA

MATERIALE

- NaCl
- Detergente per piatti
- Pastiglie per la pulizia enzimatica delle lenti a contatto
- Piselli surgelati (50 g) oppure fegato di pollo (100 g)
- Etanolo 96%  H 225, p 210 - tenuto in freezer per 24 h

STRUMENTAZIONE E VETRERIA

- Bilancia tecnica
- Bagno maria
- Bagno di ghiaccio
- Becher da 100/200/400 mL
- Filtro da caffè americano
- Centrifuga
- Provette
- Pipetta graduata da 10 mL
- Pipette
- Mortaio e pestello

PROCEDIMENTO

- Si prepara la soluzione di estrazione: in un becher da 200 mL unire 3 g di NaCl, 12 g di detergente per piatti e 85 g di acqua. Mescolare leggermente per sciogliere il sale, facendo attenzione a fare meno bolle possibili.
- Pesare circa 50 g di piselli o 100 g di fegatini di pollo.
- Frullare il campione e riporlo in un becher da 400
- Unire al becher con il campione la soluzione di estrazione e mescolare leggermente.
- Preparare la soluzione enzimatica: sciogliere, dopo averle prima tritate, una o due pastiglie di enzimi proteolitici in 50-75 mL di acqua. Mettere da parte il becher per l'ultima fase dell'esperimento – può essere solo un gruppo a eseguire questa fase, dato che poi servirà 1 mL soltanto di questa soluzione.
- Nel frattempo preparare il bagno maria e quando la T raggiunge i 60 °C immettere il becher con il preparato, scaldare per 15 minuti.
- Pochi minuti prima che termini il riscaldamento del preparato, allestire un bagno di ghiaccio, in cui immettere il becher alla fine dei 15 minuti di riscaldamento, mescolare in modo che il preparato si raffreddi in modo omogeneo. Il tempo di permanenza nel bagno di ghiaccio è di circa 5 minuti.

**SCHEDA PER LO
STUDENTE****Estrazione DNA****Procedimento**

- Predisporre la filtrazione del preparato, utilizzando il filtro da caffè (il preparato è infatti troppo consistente per essere filtrato in un normale imbuto con carta da filtro).
- Se il filtrato si dimostrasse ancora denso eseguire una centrifugazione, distribuendo il materiale in almeno 4 provette)
- Raccogliere con una pipetta la fase più liquida (o il surnatante in caso di centrifugazione) e riporlo in una provetta.
- Aggiungere 1 mL della soluzione enzimatica, attendere qualche minuto.
- Aggiungere nella provetta circa 6 mL di etanolo ghiacciato, facendolo scivolare lungo un lato della provetta, in modo tale che si stratifichi sull'estratto.

COMMENTI E PROPOSTE


Leggendo vari protocolli abbiamo visto che alcuni prevedevano la possibilità di fare una corsa elettroforetica con il DNA estratto. Potrebbe essere un complemento interessante della nostra esperienza, soprattutto per le classi del triennio. I protocolli da cui abbiamo preso spunto sono riportati in bibliografia.

Corsa elettroforetica DNA

Strumenti

- Cella elettroforetica
- Provette
- Micropipette

Materiale

- Etanolo  H 225, P 210
- Gel agar agar 1% in TBE 1X
- Soluzione di caricamento (Glicerolo/xilene cianolo/blu di bromofenolo/acqua distillata)
 - TBE 1X
 - Blu di metilene

Procedimento

Preparazione gel agar agar

- Pesare 1 g di agar agar in polvere e scioglierlo in 100 mL di TBE1X
- Scaldare sino a che la soluzione non diventa limpida
- Versare la soluzione nella cella elettroforetica, inserire il pettine e lasciar raffreddare in frigorifero sino a che il gel non si solidifichi.
- Aggiungere il buffer TBE1X in modo da ricoprire il gel

nel frattempo:

Preparazione del campione di DNA

- Recuperare il DNA estratto con uno stecchino, trasferirlo in una provetta pulita, lavarlo con etanolo al 70%.
- Recuperare ancora il DNA e riportarlo in soluzione con acqua per circa 1 h (con 0.5-1 mL di acqua) eventualmente scaldare a 55°C per una decina di minuti.

Quantificazione per via spettrofotometrica

- Trasferire circa 85µL del campione in una nuova provetta e aggiungere 15 µL della soluzione di caricamento

Corsa elettroforetica

- Caricare i pozzetti con il campione così preparato
- Far correre il DNA 85V per circa 1 h. Spegner l'apparecchiatura.

Colorazione con blu di metilene

- Trasferire il gel in una vaschetta vuota
- Versare una soluzione di blu di metilene allo 0,02% nella vaschetta in cui è stato trasferito il gel in modo tale da ricoprirlo completamente. Lasciar riposare per 30-60 min a T ambiente.
- Dopo aver recuperato il colorante risciacquare con delicatezza il gel sotto acqua corrente per almeno 2 volte.
- Lasciare il gel immerso in acqua sino alla comparsa di bande blu (il DNA).

Composizione delle soluzioni usate:

Soluzione di caricamento: 30% glicerolo in acqua, 0,25w/v xilene cianolo, 0,25% w/v blu di bromofenolo

1XTBE: 10,8 g di Tris-base e 5,5 g di acido borico in 900 mL H₂O, aggiungere 4 mL di 0,5M Na₂EDTA e portare a 1 L. Conservare a T ambiente.

Quantificazione per via spettrofotometrica

Disponendo di uno spettrofotometro si può procedere nel modo seguente:

- Diluire 50 μ L della soluzione preparata per l'elettroforesi in due provette contenenti 950 μ L di acqua distillata sterile. Mescolare bene
- Trasferire le aliquote in cuvette di quarzo
- Leggere il valore dell'assorbanza del campione alle lunghezze d'onda di 260nm (picco di assorbimento degli acidi nucleici) e a 280 nm (picco di assorbimento delle proteine)
- Considerare la concentrazione di DNA del campione, considerando che 50 μ g di DNA in 1 mL, con un percorso ottico di 1 cm, danno un valore OD₂₆₀ pari a 1
- Calcolare di conseguenza la quantità totale di DNA estratto e il suo grado di purezza OD₂₆₀/OD₂₈₀ – Buoni valori per il rapporto sono 1,7-1,8)

BIBLIOGRAFIA / LINK DI RIFERIMENTO

<http://www.scienceinschool.org/it/2006/issue1/discoveringdna>

<http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/extracting-dna-living-things>

<http://www2.fiu.edu/~bch3033/bch3033/pdf/DNALab1.pdf>

http://www.ncbe.reading.ac.uk/PRACTICALS/PDF/DNA_isolation.pdf

https://www.ifom.eu/media/PDF/conoscere-la-scienza/vivi-la-ricerca/provaci-tu!/Biologia-molecolare/web_soluzione_caricamentoys.pdf

https://www.ifom.eu/media/PDF/conoscere-la-scienza/vivi-la-ricerca/provaci-tu!/Biologia-molecolare/web_elettroforesi_dnays.pdf

https://www.ifom.eu/media/PDF/provaci-tu!/web_colorazione_gel_agarosioys.pdf

<http://www.bioteach.ubc.ca/TeachingResources/DoingScience/MacgyverProjShirazuEtalMaintext.pdf>