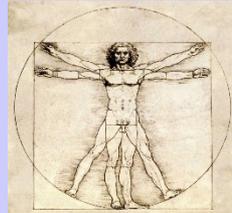


# 1° esercitazione: ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO e PLASMIDICO



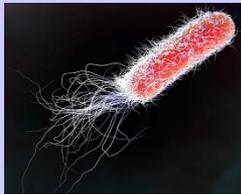
# DNA: l'informazione genetica dentro la cellula

Genoma umano



circa 3 miliardi di bp (~ 1,5 m!!!)  
grandezza cellula ~10-50  $\mu\text{m}$

*E. coli*



circa 4,5 milioni di bp (~1,5 mm!!)  
grandezza cellula ~1  $\mu\text{m}$

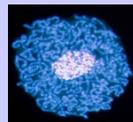
Ad ora, il genoma più grande è stato rilevato in una pianta

*Paris japonica*



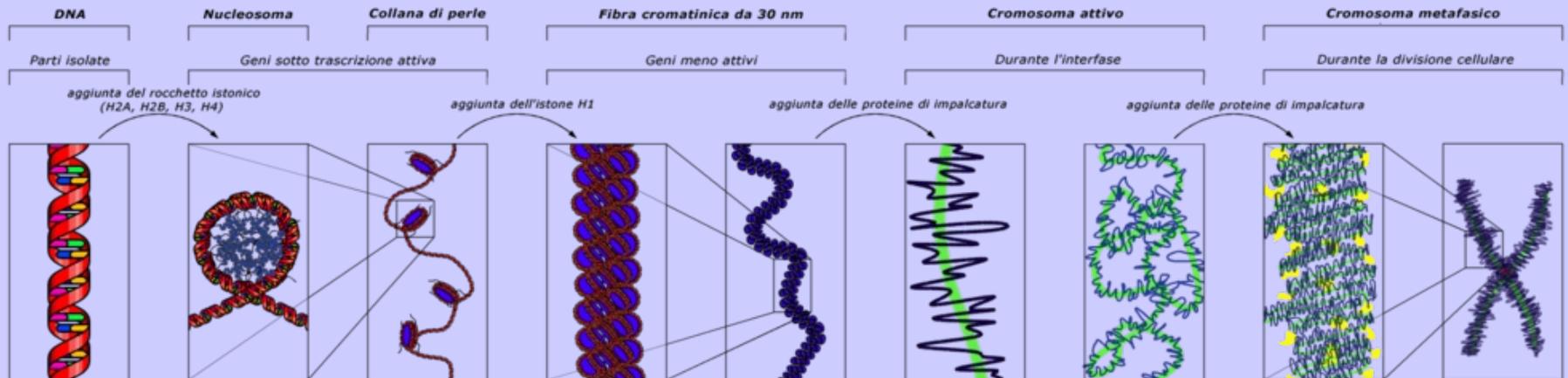
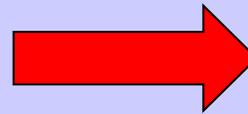
circa 150 miliardi di bp (~100m!!!)

Tra i più piccolo genomi noti è quello del batterio endosimbionte di insetti *Carsonella ruddii*



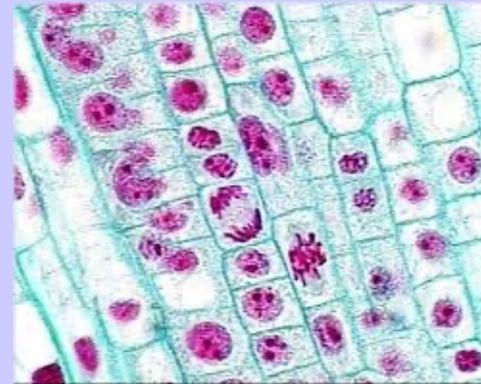
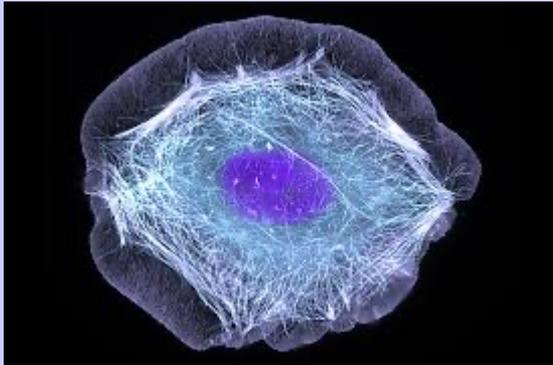
circa 160.000 bp

# La compattazione del DNA nella cellula



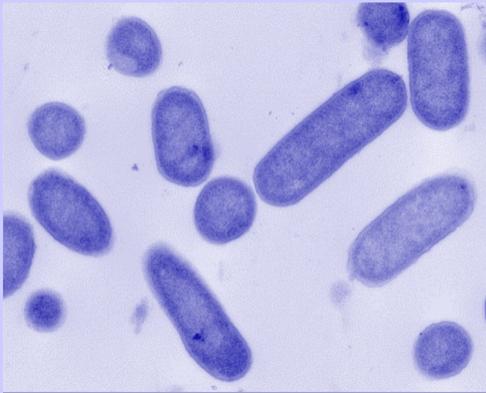
# DNA da campioni biologici

Le cellule sono i “contenitori” del DNA

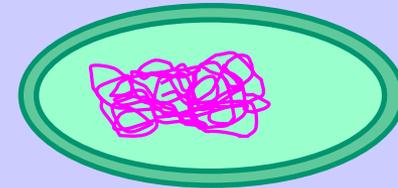


**Ottimo punto di  
partenza per  
estrarre DNA!**

# Genomi accessori (dispensabili)



*PLASMIDI*



**trasformazione**

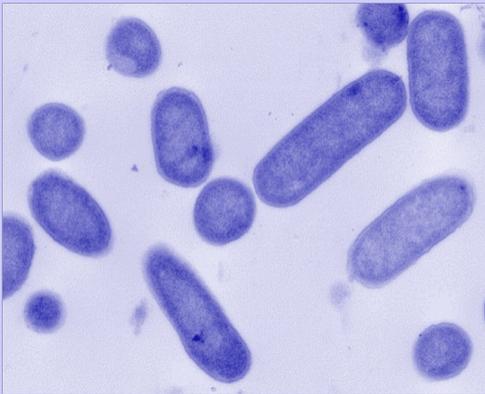


*Sono circoli di DNA a doppia elica extracromosomiale che si ritrovano in natura e si replicano indipendentemente conferendo un **VANTAGGIO SELETTIVO** all'ospite*

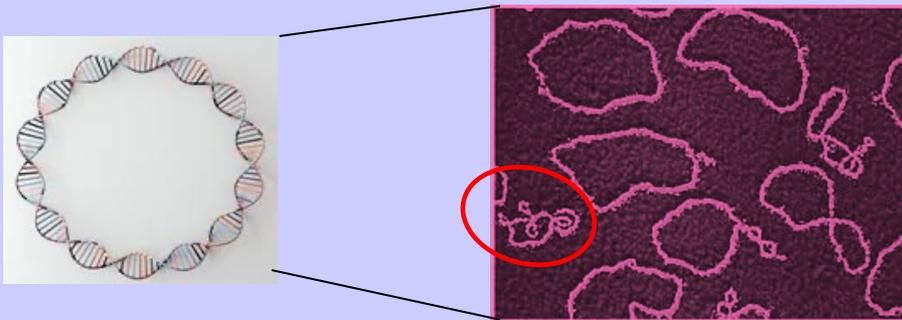
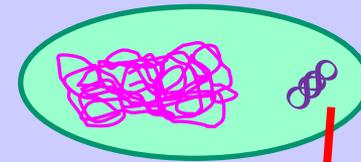


# PLASMIDI

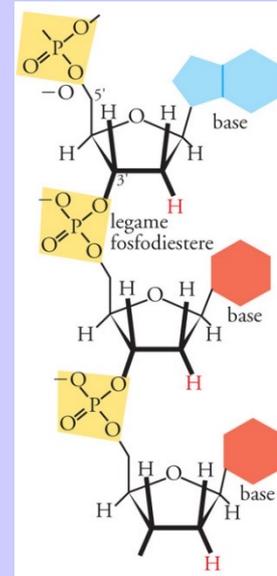
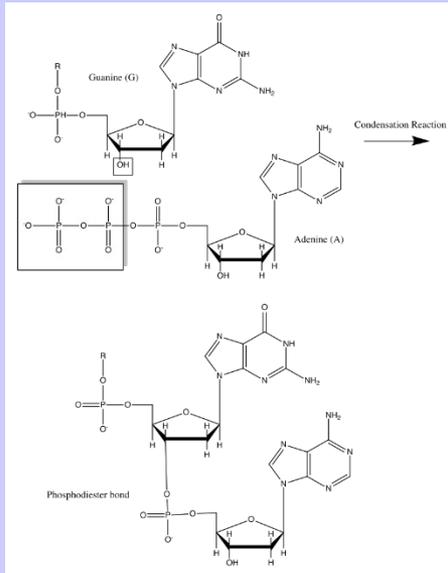
*DIMENSIONI: solitamente sotto le 10.000 bp  
mediamente 2500-5000 bp*



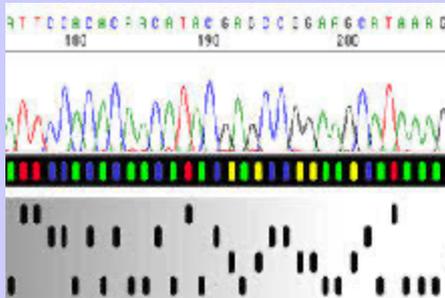
*Essendo circolare, il  
superavvolgimento ne  
consente la compattazione*



# Caratteristiche del DNA



sequenza



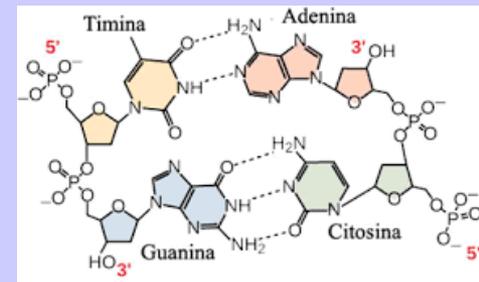
Complementarietà delle basi

=

Struttura a doppia elica



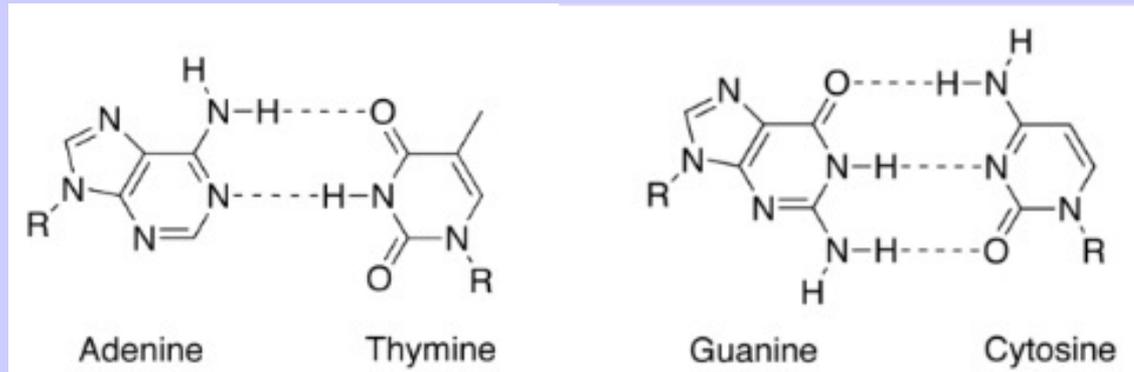
composizione



# DNA: parametri principali che influenzano la stabilità

temperatura

pH



lunghezza

composizione

# Estrazione e purificazione del DNA

**LISI DELLA CELLULA** per far fuoriuscire il contenuto =  
disgregazione della membrana cellulare ed eventuale altre  
strutture protettive (es. pareti, etc)

metodi chimici



metodi fisici



**PURIFICAZIONE del DNA** dalle altre macromolecole

Aggiunta RNAsi      proteinasi K  
fenolo/cloroformio – cromatografia silice



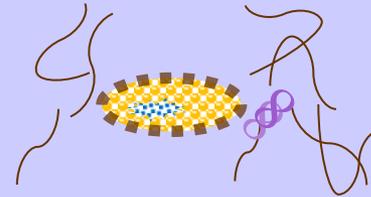
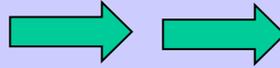
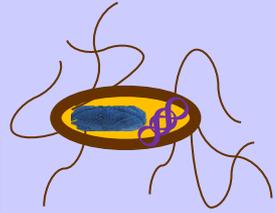
**VERIFICA** della qualità e della quantità ottenuta

analisi spettrofotometrica

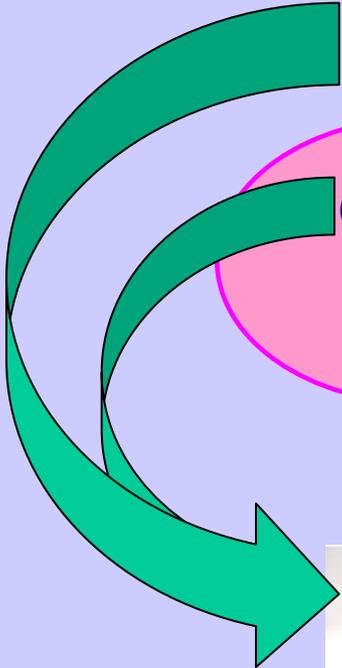
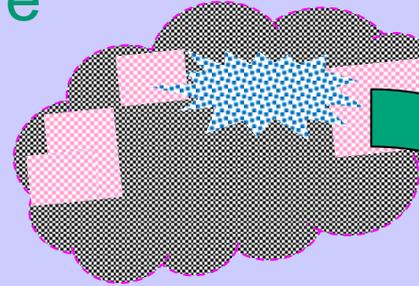
analisi elettroforetica



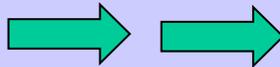
# DNA da campioni biologici



Lisi cellulare



compatto



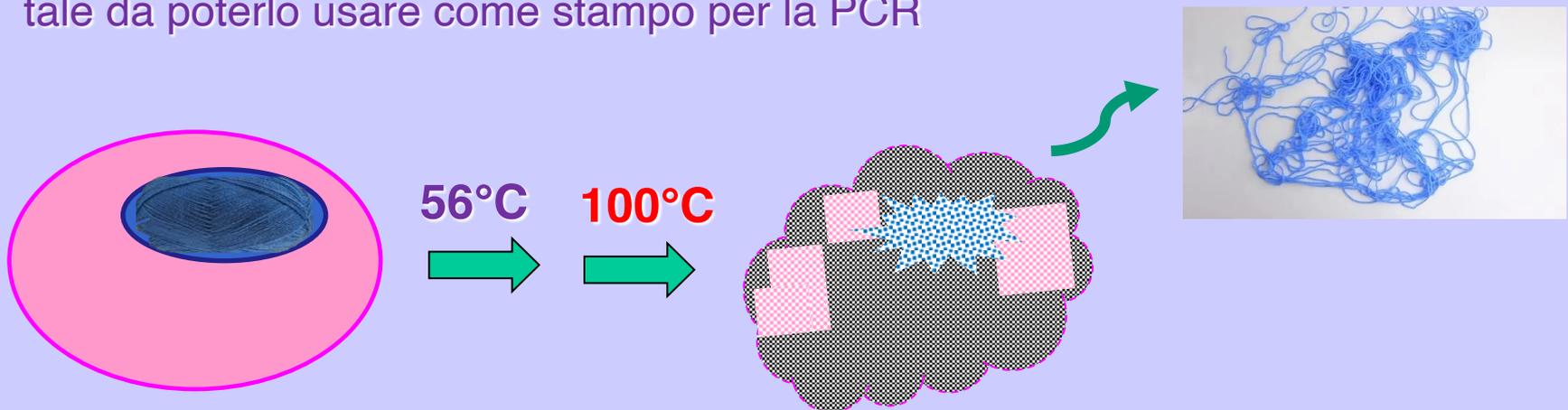
decompattato



# Estrazione DNA genomico per PCR

L'ESEMPIO dell'estrazione da cellule della mucosa buccale:

Le cellule vengono semplicemente lisate in modo da far fuoriuscire il DNA genomico evitandone più possibile la frammentazione  
Si pre-riscalda il campione a 56°C per inattivare le DNAsi in presenza della MATRICE chelante gli ioni bivalenti, sempre per prevenire l'attività delle endonucleasi metallo-dipendenti affinché il DNA NON venga degradato (lo stampo deve rimanere integro!)  
I campioni vengono poi portati a 100°C per rompere le membrane cellulari per il rilascio del DNA genomico nel soprannatante in quantità tale da poterlo usare come stampo per la PCR

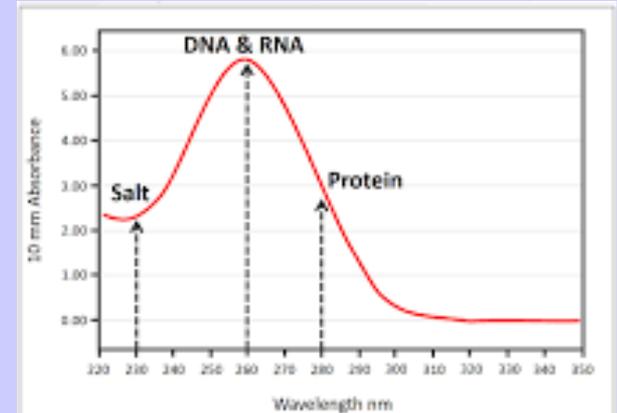
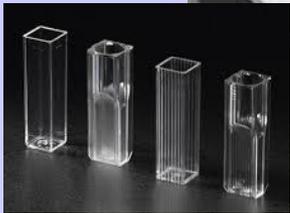


I campioni vengono conservati a 5°C piuttosto che congelati, sempre per minimizzare la frammentazione del DNA

# Stima della quantità del DNA genomico



Mediante  
spettrofotometria  
assorbimento in UV a  
260 nm



La ABS a 260 nm consente di calcolare la concentrazione di DNA

1 unità di  $A_{260}$  corrisponde a:

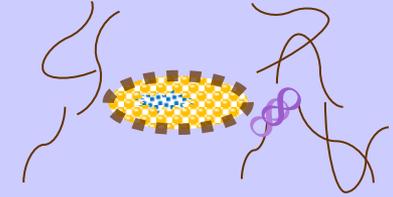
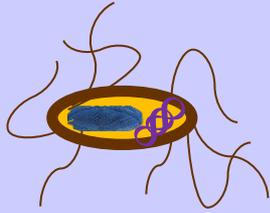
~ 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  per di DNA a doppia elica

~ 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  per/ml di DNA a singolo filamento o di RNA

L'assorbimento a 280 nm (proteine) si utilizza per valutare il grado di purezza della preparazione

se il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  è tra 1,7 e 1,9 per il DNA la preparazione si può considerare priva di contaminanti significativi Al di sotto di 1,6 nella preparazione è presente contaminazione proteica

# DNA da campioni biologici

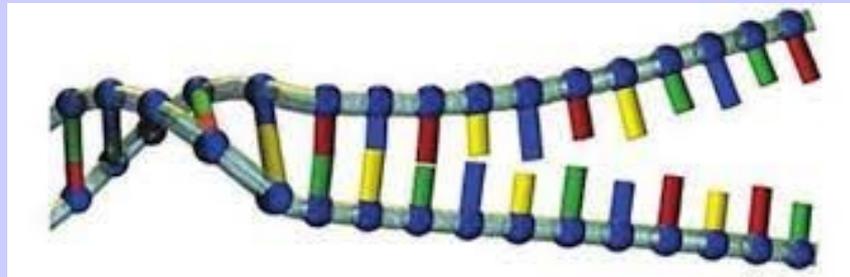


**Lisi cellule batteriche**

Sono molto più resistenti, presenza parete batterica

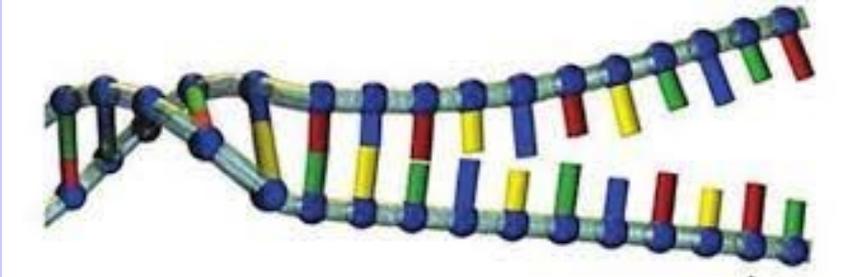
## **DNA plasmidico mediante *miniprep***

Pellet batterico → risospensione e lisi alcalina



Rinaturazione veloce → centrifugazione e  
passaggio su spin column → lavaggio ed eluizione

lisi alcalina = SDS + NaOH



Denaturazione del DNA!

Rinaturazione con aggiunta acido = in questa condizione la rinaturazione è possibile SOLO per il DNA plasmidico di minori dimensioni

Purificazione  
mediante  
*spin column*  
(silica)



Binding (alta F.I.)  
Lavaggio (EtOH)  
Eluizione (bassa F.I.)