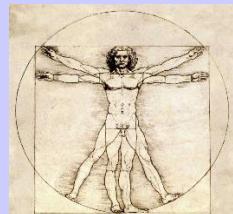


1° esercitazione: ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO e PLASMIDICO



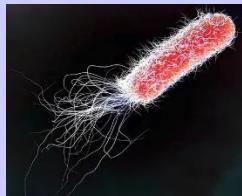
DNA: l' informazione genetica dentro la cellula

Genoma umano



circa 3 miliardi di bp (~ 1,5 m!!!)
grandezza cellula ~10-50 μ m

E. coli



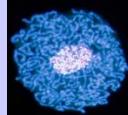
circa 4,5 milioni di bp (~1,5 mm!!)
grandezza cellula ~1 μ m

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



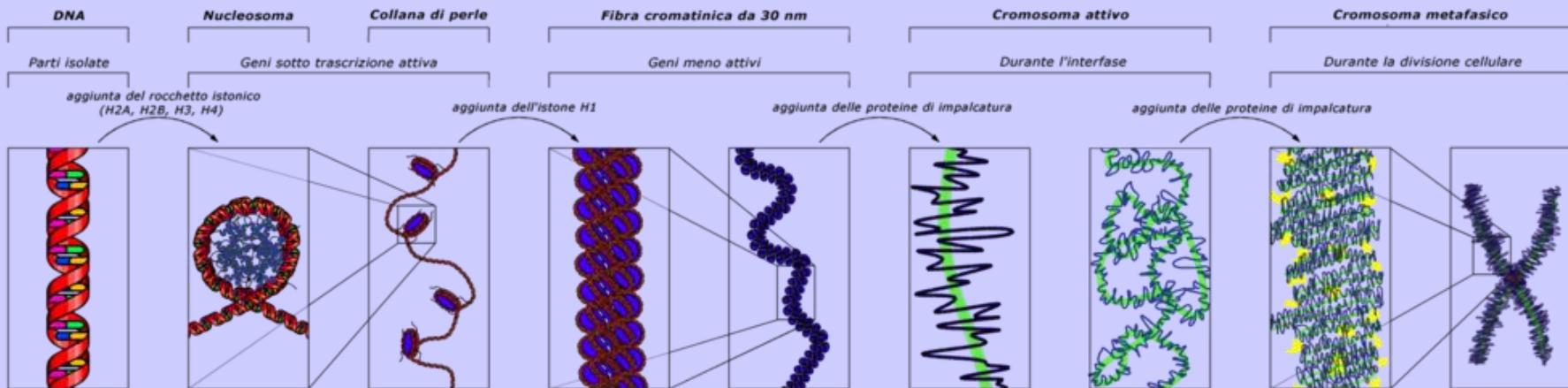
circa 160 miliardi di bp (~100m!!!)

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



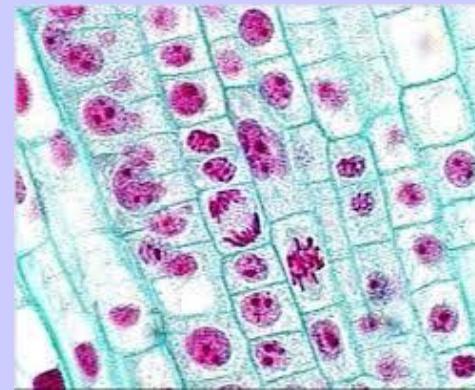
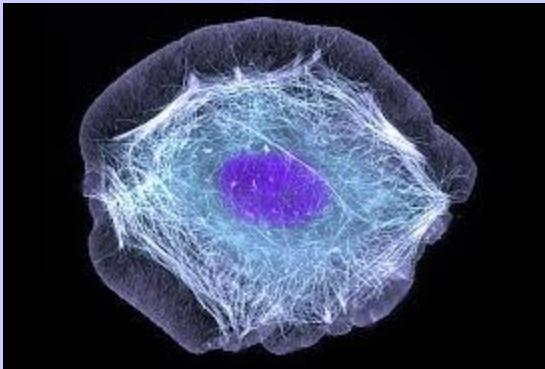
circa 160.000 bp

La compattazione del DNA nella cellula



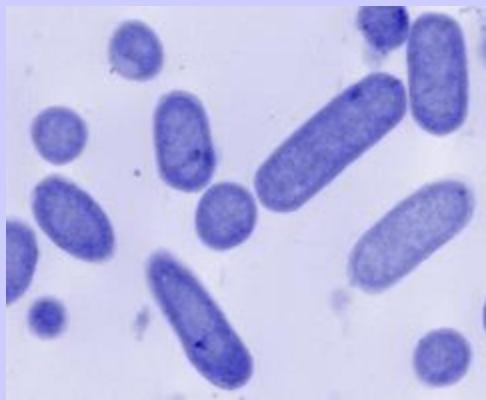
DNA da campioni biologici

Le cellule sono i “contenitori” del DNA



Ottimo punto di
partenza per
estrarre DNA!

Genomi accessori (dispensabili)



PLASMIDI

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

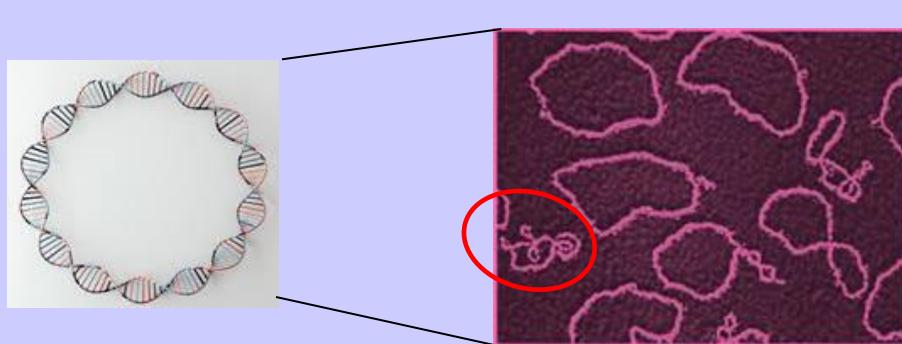


PLASMIDI

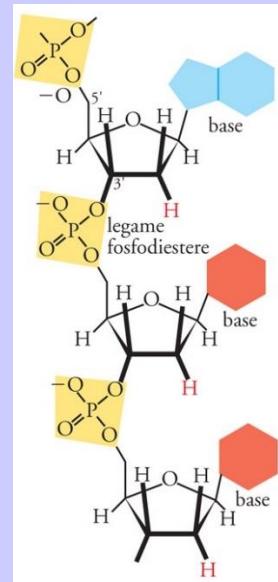
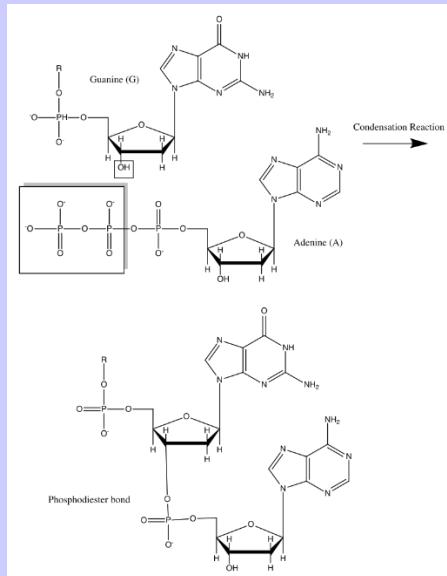
*DIMENSIONI: solitamente sotto le 10.000 bp
mediamente 2500-5000 bp*



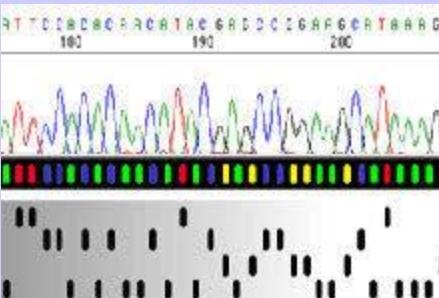
Essendo circolare, il superavvolgimento ne consente la compattazione



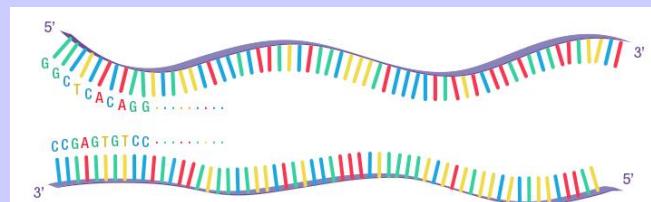
Caratteristiche del DNA



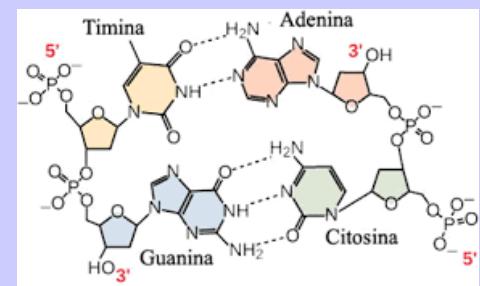
sequenza



Complementarietà delle basi
=
Struttura a doppia elica



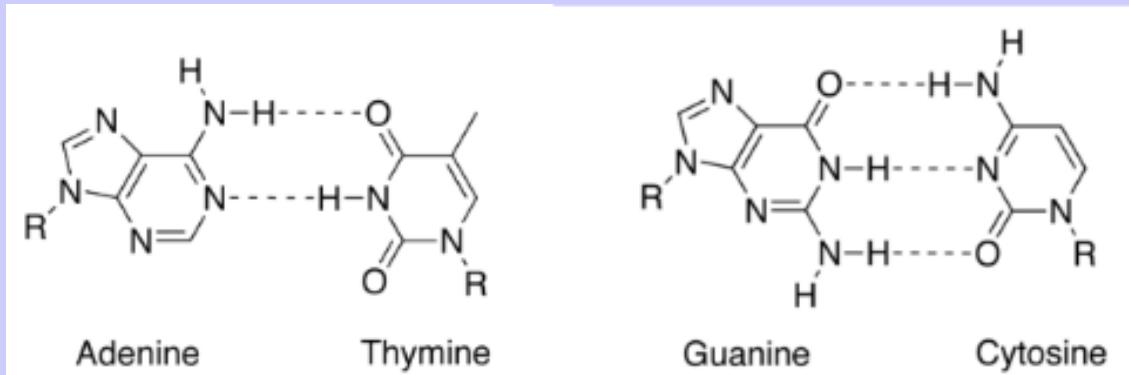
composizione



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

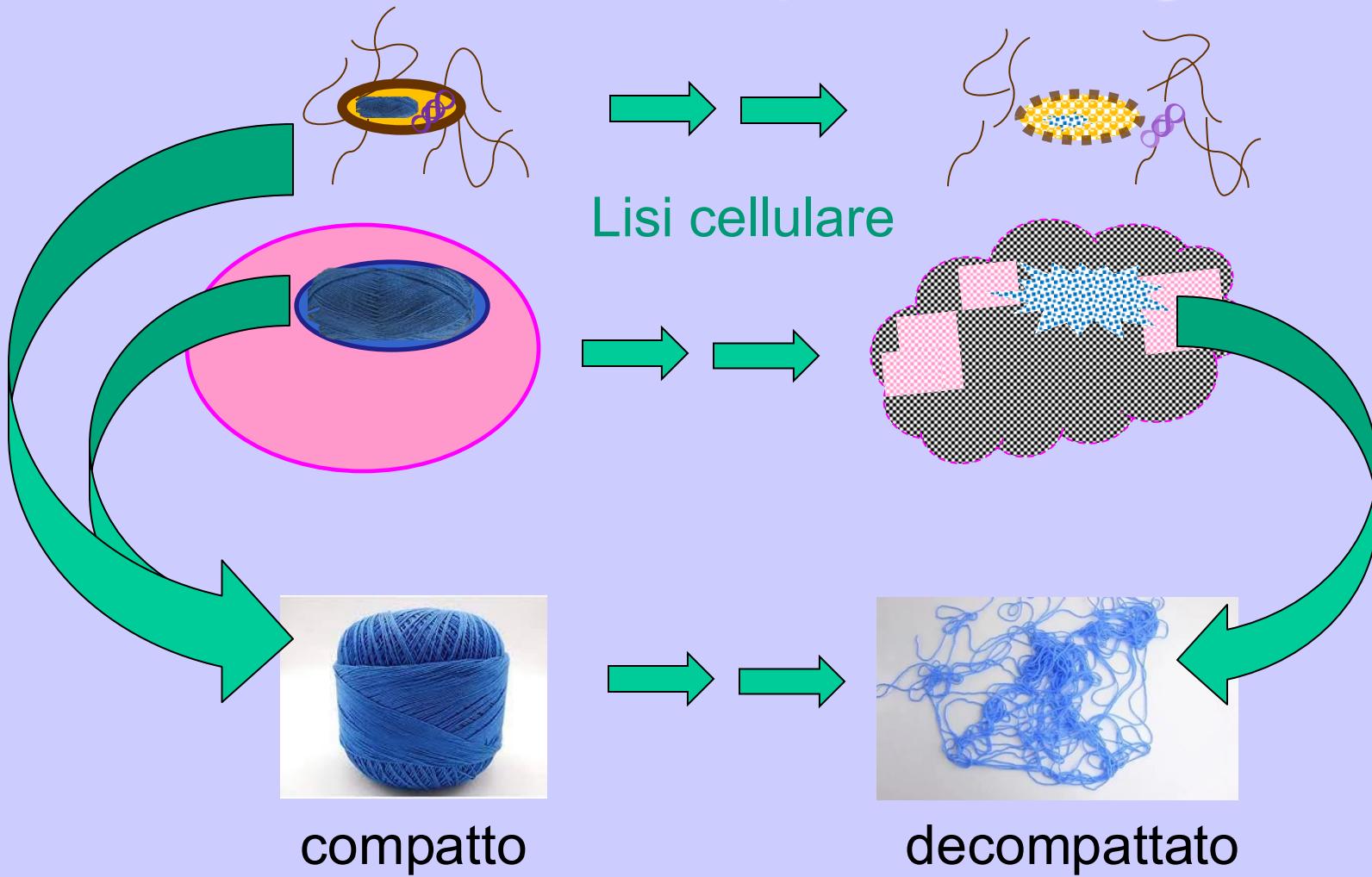
Aggiunta RNAsi proteinasi K
fenolo/cloroformio – cromatografia silice



VERIFICA della qualità e della quantità ottenuta
analisi spettrofotometrica analisi eletroforetica



DNA da campioni biologici



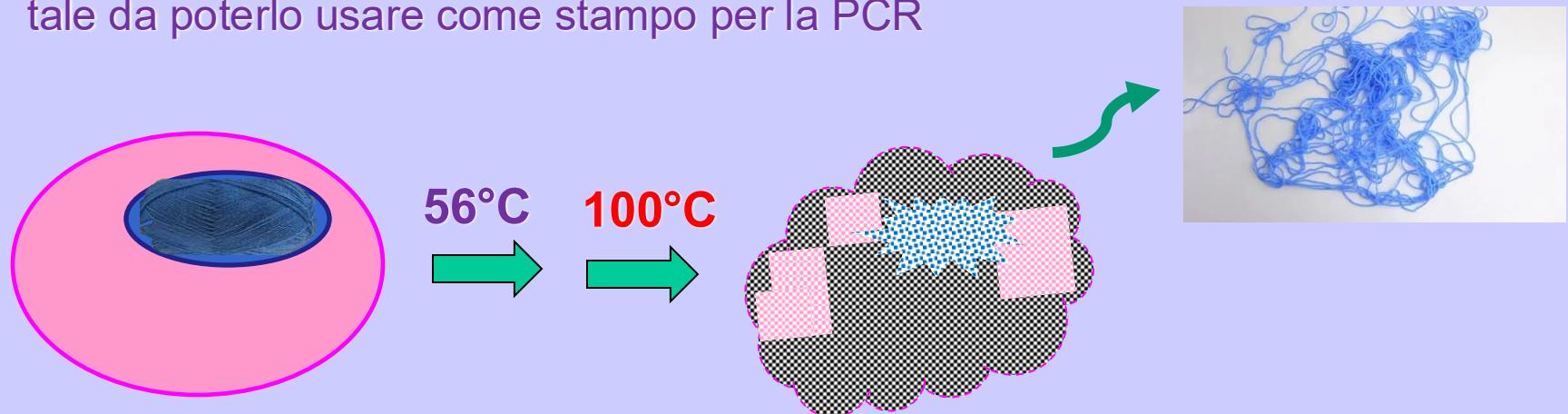
Estrazione DNA genomico per PCR

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

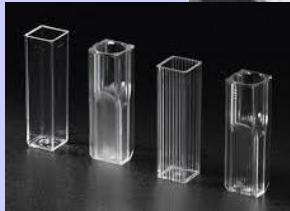
Si pre-riscalda il campione a 56°C per inattivare le DNAsi in presenza della MATRICE chelante gli ioni bivalenti, sempre per prevenire l'attività delle endonucleasi metallo-dipendenti affinchè il DNA NON venga degradato (lo stampo deve rimanere integro!)

I campioni vengono poi portati a 100°C per rompere le membrane cellulari per il rilascio del DNA genomico nel sopranatante in quantità tale da poterlo usare come stampo per la PCR

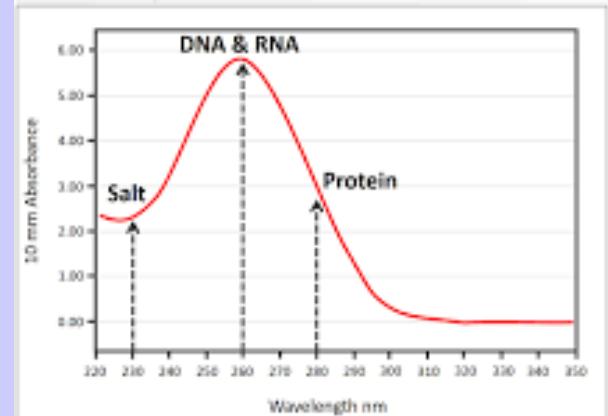


I campioni vengono conservati a 5°C piuttosto che congelati, sempre per minimizzare la frammentazione del DNA

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

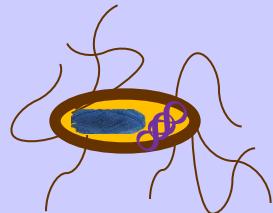
1 unità di A260 corrisponde a:

- ~ 50 µg / ml per di DNA a doppia elica
- ~ 40 µg / ml per/ml di DNA a singolo filamento o di RNA

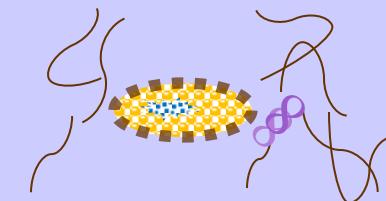
L'assorbimento a 280 nm (proteine) si utilizza per valutare il grado di purezza della preparazione

se il rapporto A260/A280 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



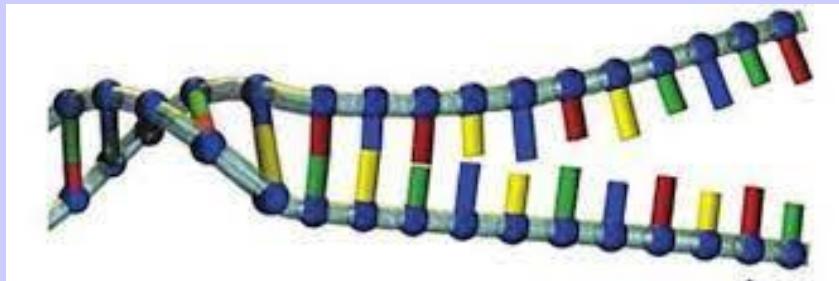
Lisi cellule batteriche



Sono molto più resistenti, presenza parete batterica

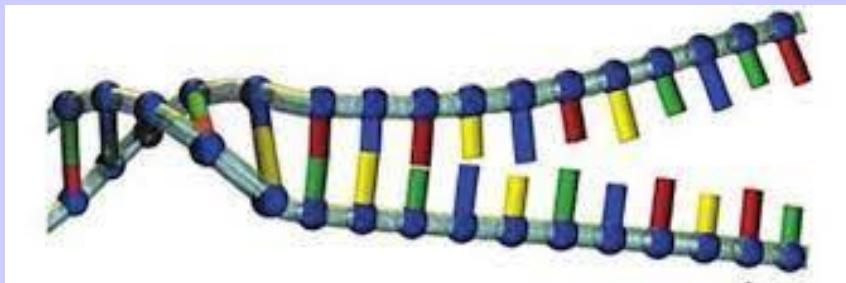
DNA plasmidico mediante *miniprep*

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.)