

Estrazione del DNA

Scopo:

Osservare la molecola degli acidi nucleici, dopo averla separata dall'involucro nucleare e cellulare in cui è contenuta.

Il campione biologico di partenza, da cui si estrarrà il DNA, potrebbe essere un pomodoro o frutta a polpa molle tipo kiwi.

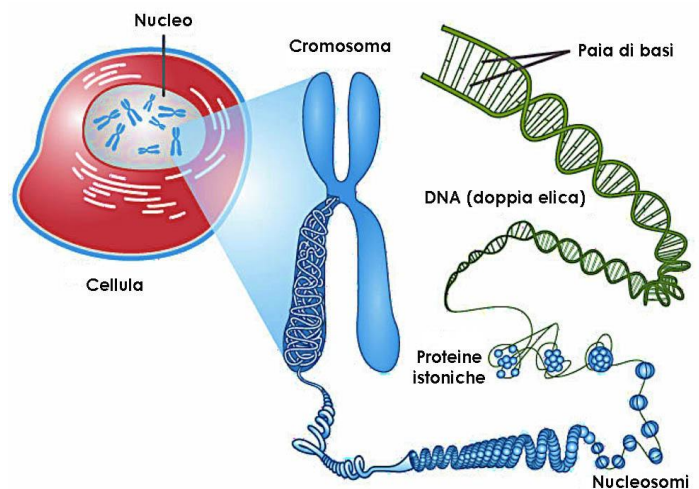
Introduzione:

L'operazione si articola in quattro fasi:

1. Demolizione struttura cellulare e digestione proteine:

Trattare la polpa di pomodoro in modo da disgregare la struttura cellulare, cioè demolire la parete e la membrana cellulare per permettere al DNA di uscire dalla cellula e di srotolarsi senza perdere la struttura ad elica. Allontanare le proteine (ISTONI) attorno alle quali il filamento si avvolge e si ripiega ripetutamente su se stesso per permettere al DNA di srotolarsi senza perdere la struttura ad elica.

Questa operazione si ottiene trattando la polpa del frutto frullata con una miscela formata da detersivo liquido (sciogliere le membrane cellulari e nucleari) e una soluzione di NaCl al 3% m/vv (denatura gli ISTONI).



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

Filtrare il miscuglio cellulare per ottenere un estratto in cui il DNA è libero in soluzione.

3. Precipitazione del DNA disidratato:

Far precipitare il DNA stratificando sul filtrato dell'alcool etilico freddo. L'alcool etilico disidrata il DNA e lo rende insolubile facendolo addensare e precipitare sotto forma di gelatina trasparente o biancastra.

4. Osservazione microscopica:

Preparare un vetrino per microscopia ed osservare al microscopio variando gli ingrandimenti. Colorare il preparato con del blu di metilene e ripetere l'osservazione. Il blu di metilene si legherà con i substrati acidi del DNA. 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.

Metodica


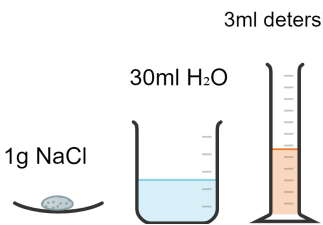
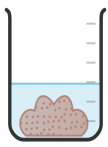
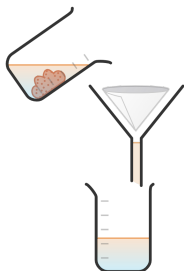
Reagenti:

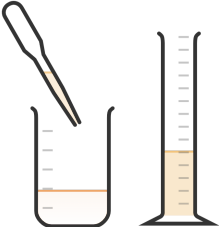
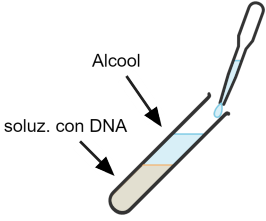
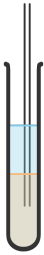
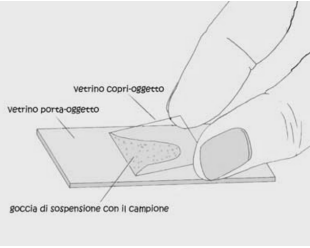
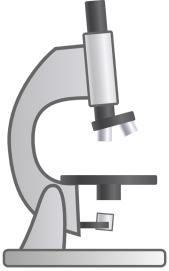
- NaCl
- Alcool etilico
- Sapone liquido
- Blu di metilene

Strumenti:

- mortaio e pestello
- coltello
- becher da 250 ml
- spruzzetta con acqua distillata
- Bilancia
- Contagocce
- cilindro graduato da 10 ml
- imbuto e carta da filtro
- provette
- bacchetta agitatore
- spatola
- vetrino portaoggetti e coprioggetti
- microscopio ottico

Procedimento:

1 ^a FASE	1		Tagliare a pezzetti un pomodoro, metterlo all'interno di un mortaio e schiacciarlo bene con il pestello.
	2	 <p>3ml detersivo 30ml H₂O 1g NaCl</p>	Il un becher preparare la soluzione di estrazione pesando 1 g di NaCl, 30 ml di H ₂ O e 3 ml di detersivo liquido.
	3		Versare i pomodori schiacciati nella soluzione estraente ed agitare bene.
2 ^a FASE	4		Filtrare il preparato in modo da separare la polpa dalla soluzione contenente il DNA

3 ^a FASE	5		Utilizzare un cilindro graduato per prelevare 5 ml della soluzione ed inserirli in una provetta.
	6		Inclinare la provetta di 45° e molto lentamente versarvi all'interno 5 ml di alcool etilico in modo tale che non si mescoli con la soluzione ma, essendo meno denso, si stratifica in superficie.
	7		Utilizzare una bacchetta di vetro ed agitare delicatamente fino ad osservare la formazione di una sostanza gelatinosa tra le due fasi.
4 ^a FASE	8		Utilizzare una spatolina per prelevare una piccola parte della sostanze gelatinosa e preparare un vetrino a fresco.
	9		Osservare al microscopio ottico il preparato e successivamente colorarlo con blu di metilene e ripetere l'osservazione.