

# Estrazione del DNA dalle cellule di pomodoro

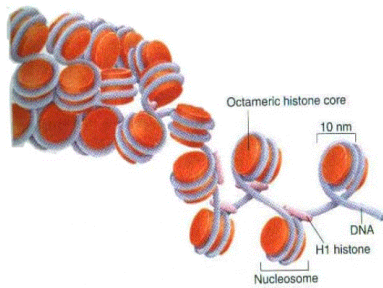
## Introduzione

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.

Questa esperienza si articola in tre fasi:

### 1. Demolizione struttura cellulare e digestione 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.



Struttura a doppia elica del DNA



Organizzazione del DNA attorno agli istoni

### 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 cioè 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 detergente liquido per stoviglie + 100ml H<sub>2</sub>O
- 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 pesando 3g di NaCl e sciogliere in 100 ml di H<sub>2</sub>O
- Aggiungere 10ml di detergente liquido. ( NaCl in soluzione denatura la struttura degli istoni a cui è legata la catena del DNA; il detergente 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)

### 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 un'ansa sottile 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.

### Questionario

- A cosa serve il detergente che abbiamo usato per la soluzione di estrazione
  1. a distruggere le membrane cellulari
  2. a digerire le fibre della polpa
  3. a far precipitare il DNA
- Metti in ordine le varie fasi dell'esperienza
  1. filtrazione del miscuglio
  2. precipitazione in etanolo
  3. demolizione struttura cellulare e digestione proteine
- Come si chiamano le proteine legate al DNA ?
  1. fosfolipidi
  2. istoni
  3. carboidrati
- Cosa passa attraverso il filtro di garza durante la fase di filtrazione del miscuglio? Cosa viene trattenuto? .....
- Qual è la funzione dell'alcool etilico freddo?  
.....
- Quali sono i componenti della soluzione usata per estrarre il DNA dalle cellule?  
.....  
.....