

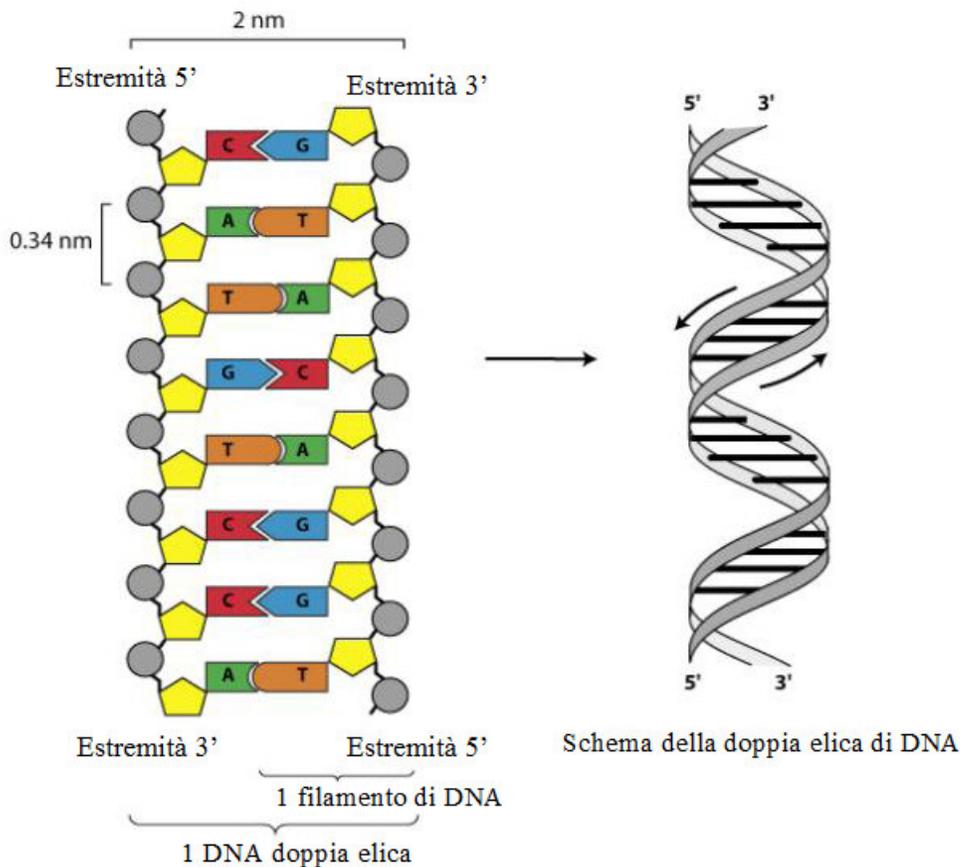
Esperienza 9: estrazione del DNA

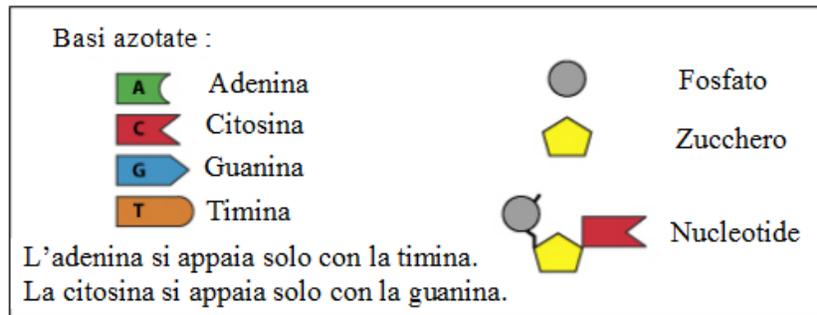
Il DNA è la molecola essenziale di tutti gli organismi viventi. Essa contiene l'informazione genetica che fa di un organismo o di una cellula ciò che è.

Soggetti: purificazione del DNA, estrazione, dimensione e struttura del DNA.

La struttura del DNA (acido desossiribonucleico) è composta di gruppi fosfati legati a uno zucchero (deossiribosio) che è fissato a una delle 4 base azotate: A (adenina), C (citosina), G (guanina), T (timina). Un gruppo "fosfato-zucchero-base azotata" costituisce un nucleotide. I nucleotidi sono legati gli uni agli altri per formare una catena di DNA. Il DNA è dunque un polimero che forma una molecola di DNA bicatenario. Questa molecola è simile a una scala a pioli nella quale i gruppi fosfato-zucchero costituiscono i pioli e le basi azotate i supporti laterali. Le due catene del DNA in questa scala a pioli sono in orientazioni opposte (antiparallele). Questa scala è ritorta, dando la famosa forma a doppia elica del DNA bicatenario.

La distanza tra 2 residui è di 0,34 nm ($0,34 \times 10^{-9}$ m). Un giro dell'elica contiene 10 paia di basi (3,4 nm). Il diametro dell'elica del DNA è di 2 nm. La taglia del genoma umano è di 3,2 miliardi di paia di basi per genoma aploide, dunque 6,4 miliardi di paia di basi ripartite sulle 23 paia di cromosomi! Per impacchettare tutto questo DNA nel nucleo, il DNA è molto piegato e compresso grazie all'aiuto delle proteine, per formare la cromatina. L'impacchettamento estremo del DNA forma i cromosomi mitotici.





Storicamente, è il biologo svizzero Friedrich Miescher che rilevò gli acidi nucleici (allora denominati nucleine) nel 1869. Phoebus Levene scopre, negli anni 1920, che gli acidi nucleici sono costituiti da nucleotidi e Oswald Avery mostra, nel 1944, che il DNA è il supporto dell'informazione genetica. La struttura della doppia elica fu scoperta nel 1953 da Francis Crick e James Watson che riceveranno il premio Nobel nel 1962.

L'esperienza

Esistono numerosi protocolli per estrarre semplicemente il DNA da diversi organismi viventi. Noi ve ne presentiamo due, uno a partire dalle banane, l'altro a partire da cellule dell'epitelio boccale. Queste esperienze non hanno bisogno di nessun apparecchio particolare e possono essere eseguite grazie a prodotti acquistati nei grandi magazzini. Da notare che il DNA ottenuto non è di eccellente qualità. Esso non permetterebbe di eseguire delle esperienze precise di biologia molecolare. Il DNA così purificato è, in effetti, ancora contaminato da altre molecole (come le proteine) ed è probabilmente parzialmente degradato dalle nucleasi. Tuttavia, questo protocollo permette di visualizzare facilmente il proprio DNA e di apprezzarne l'aspetto filamentoso.

A) Estrazione del DNA delle banane



Protocollo

1) Purea di banane

- Togliere la buccia a una banana.
- Tagliare la banana in due.
- Schiacciare la metà della banana in un becher con una forchetta.

Questa tappa permette di disgregare i tessuti e di rendere fragili le pareti cellulari.

2) Lisi delle cellule

- Aggiungere 50 ml d'acqua, 2 cucchiaini da caffè di sale da cucina e un cucchiaino di detersivo per lavare i piatti.
- Mescolare delicatamente con una forchetta per ottenere una miscela omogenea.

Il detersivo permette la lisi delle cellule dissolvendo le membrane cellulari. Il DNA è così liberato. Il detersivo permette anche di sbarazzarsi di una parte delle proteine legate al DNA. Il sale permette di neutralizzare le cariche negative (portate dai gruppi fosfati) del DNA eliminando le molecole di acqua che circondano la doppia elica. Ciò permette la sua precipitazione nell'alcool.

3) Eliminazione dei residui

- Passare il miscuglio attraverso un filtro per il caffè. Il miscuglio è molto viscoso. Per facilitare la filtrazione, è utile pressare il filtro per far passare la soluzione. Recuperare il filtrato.
- Rifiltrare una seconda volta attraverso un nuovo filtro per caffè, come in precedenza. Recuperare il filtrato.

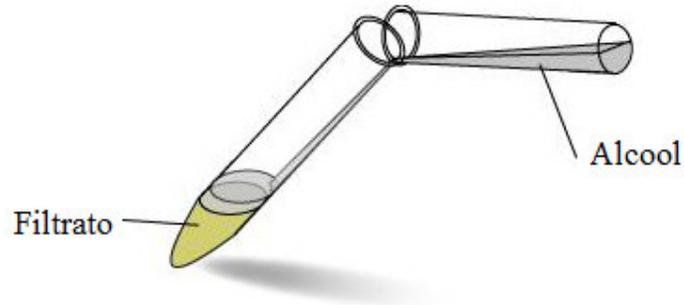
La filtrazione permette di togliere i residui cellulari e i pezzi di tessuto non disgregati.



4) Precipitazione del DNA

- Prelevare 3 ml del filtrato e trasferirlo nel tubo da 12 o 15 ml.

- Inclinando il tubo, aggiungere delicatamente 8 ml di spirito da ardere (alcool).

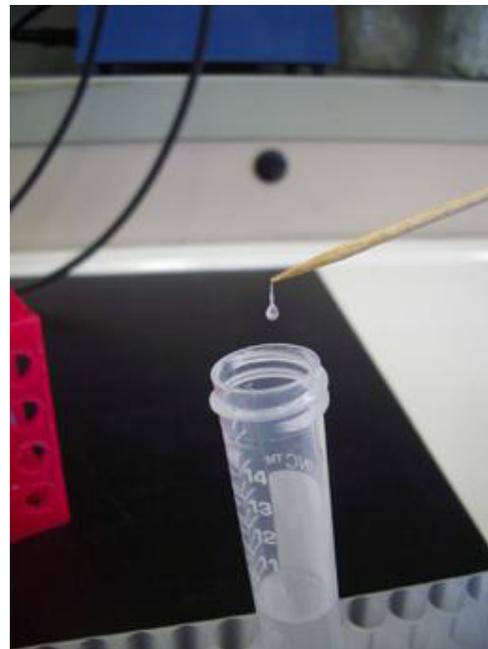
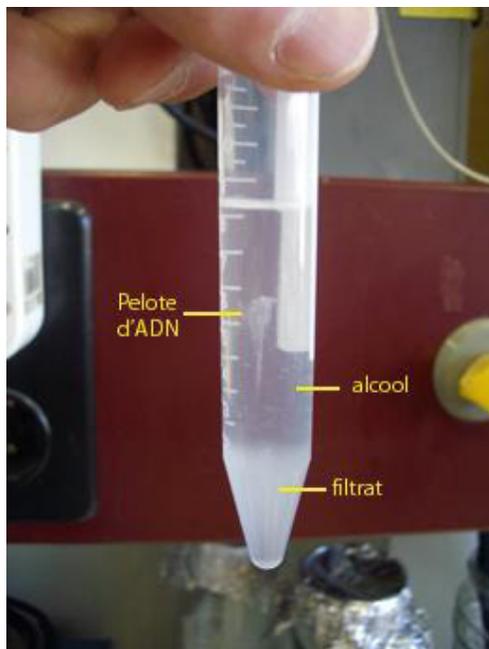


- L'alcool resta sopra il filtrato. Non scuotere il tubo.

5) Visualizzazione del DNA

- Il DNA precipita formando una "palla" che risale lentamente in superficie.
- Con l'aiuto di uno stuzzicadenti, è possibile prelevare la "palla" e rendersi conto dell'aspetto viscoso dei filamenti di DNA.

L'alcool ha una densità più leggera dell'acqua, per questo motivo resta sopra. Il DNA, insolubile nell'alcool, precipita, formando un ammasso biancastro di filamenti che scappa dalla fase inferiore. Girare o inclinare delicatamente il tubo se il DNA non riesce a uscire da questa fase. Nel tubo troviamo milioni di filamenti di DNA provenienti da numerose cellule.



B) Estrazione del proprio DNA

Protocollo

1) Ottenimento di cellule dell'epitelio boccale

- Strofinare l'interno delle guance contro i denti, mordere le guance per 1 minuto. Non ingoiare.
- Prendere circa 5 ml di acqua (del rubinetto) e fare dei gargarismi per 1 minuto passando la lingua sulle guance e il palato.
- Sputare il liquido nel recipiente.

2) Lisi delle cellule

- Aggiungere un cucchiaino da caffè di sale da cucina (NaCl) e la metà di un cucchiaino di detersivo per lavare i piatti.
- Mescolare delicatamente con un cucchiaino (o girando il recipiente) per dissolvere il sale e rendere la soluzione omogenea. È possibile che resti del sale non disciolto sul fondo del recipiente. Ciò non cambia il risultato dell'esperienza.

3) Precipitazione e visualizzazione del DNA

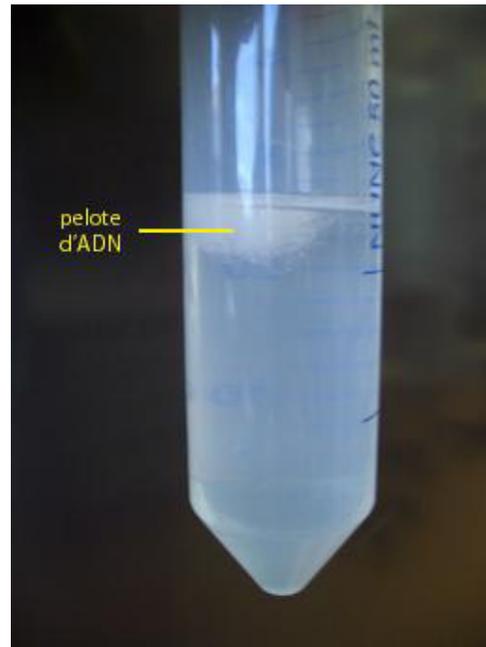
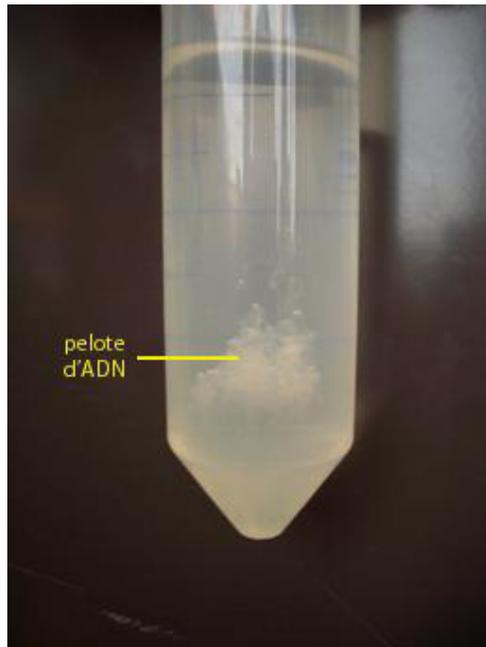
- Prelevare 3 ml della soluzione e trasferirli in un tubo da 14 ml.
- Aggiungere delicatamente 8 ml lo spirito da ardere come descritto sopra.
- Il DNA precipita.
- Si può recuperare il DNA con uno stuzzicadenti o una micropipetta e trasferirlo in un tubo contenente dell'alcool per conservarlo.



C) Osservazioni

L'estrazione può essere eseguita con altri frutti o legumi (pomodoro, kiwi, arancia schiacciata, ecc.) seguendo lo stesso protocollo.

I volumi possono essere aumentati se la “palla” di DNA non è visibile. Ciò può dare i risultati seguenti:



Materiale

- Spirito da ardere (alcool)
- Detersivo per lavare i piatti
- Sale da cucina
- Filtro per il caffè
- Acqua
- Banane (o altro)
- Recipienti (becher, tubi, ecc.)