

Estrazione ed analisi del DNA genomico



Lunedì 19 febbraio la classe 3°G si è recata al Polo Scientifico Rizzi per studiare l'analisi del DNA



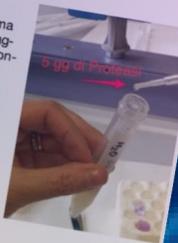
Per eseguire l'esperimento ci siamo divisi in gruppi e ci è stato assegnato un tutor



Sotto la guida del tutor e del protocollo abbiamo iniziato l'esperimento

Inattivazione degli enzimi proteici.

7. Prendere l'Eppendorf contenente l'enzima proteasi (Prot.), provetta lilla in ghiaccio, e aggiungere 5 gocce di questa alla soluzione contenente il campione.



5 gg di Proteasi



Proteasi



★

La proteasi inattiva (degrada) gli enzimi di natura proteica (es ptialina) presenti nella saliva e che potrebbero interferire con i reagenti o degradare il DNA.

8. Chiudere con il tappo e invertire gentilmente alcune volte. Incubare la provetta a 50°C per 10' (water bath).



Invertire dolcemente alcune volte



Mettere la provetta a bagno a 50° per 10'

PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE ED ANALISI DEL DNA GENOMICO

Raccolta delle cellule dalla mucosa boccale.

1. Prendere il tubo da 15ml e marcarlo con le proprie iniziali.
2. Masticare gentilmente l'interno delle guance per 30 secondi.
3. Prendere l'acqua dalla provetta, metterla in bocca e sciacquare vigorosamente la bocca per 30 secondi.
4. Facendo attenzione, versare nuovamente l'acqua dalla bocca nella provetta da 15 ml.

SORRY

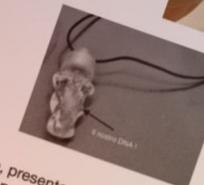


Campione cellulare

12. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire tutto il DNA in una provetta Eppendorf. Prelevare una parte del DNA e riportarlo nella provetta a forma di doppia elica, fornita dal kit..... ecco il vostro ciנדolo personalizzato 😊!



Con una pipetta prelevare il DNA e metterlo in una Eppendorf



Il DNA rimanente, presente nella Eppendorf, può essere conservato per successivi esperimenti, anche per mesi, purché mantenuto a 4 °C.



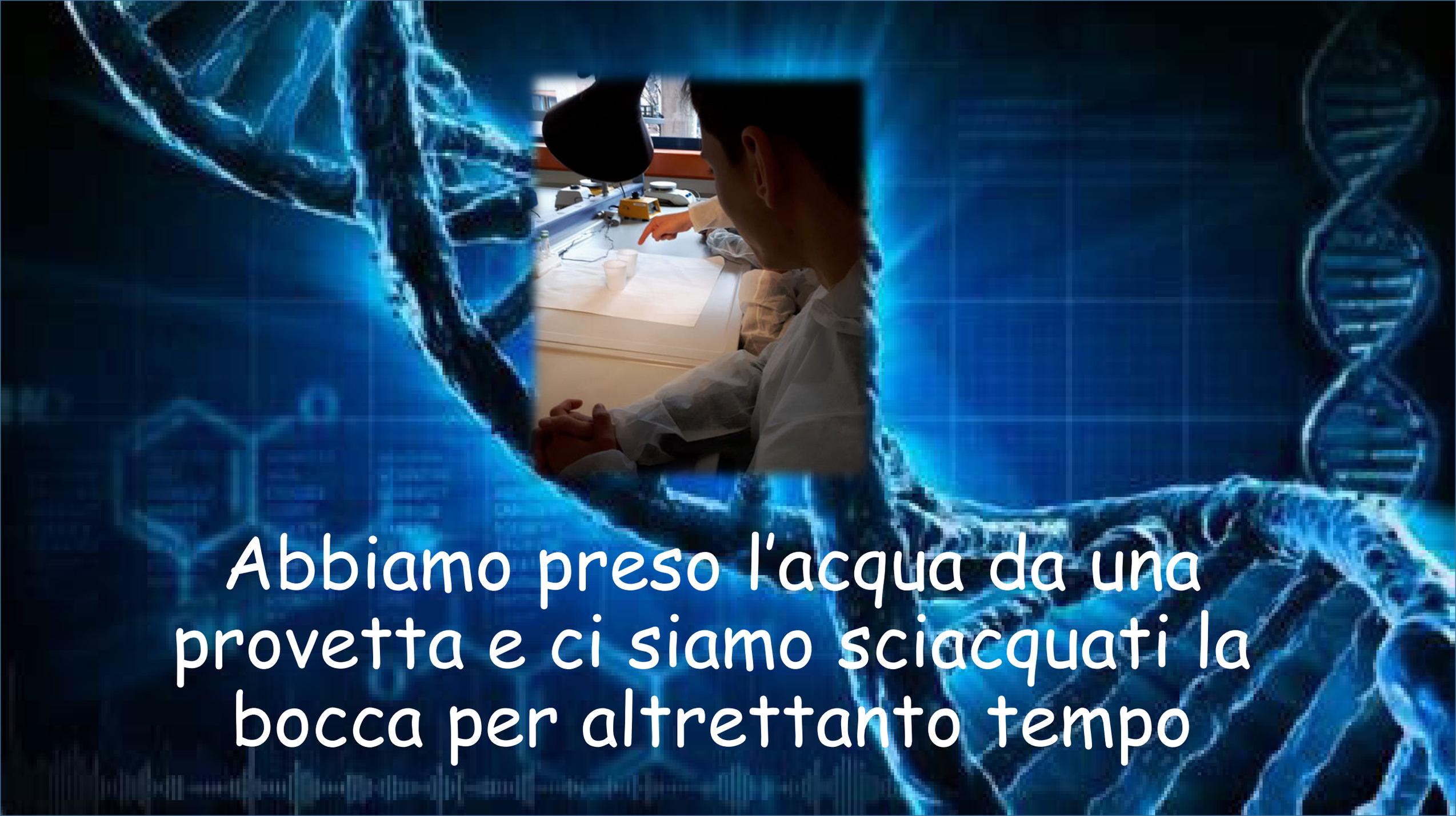
DNA + etanolo



**1) Raccolta delle
cellule dalla mucosa
boccale**



Per prima cosa abbiamo masticato
dolcemente l'interno delle nostre
guance per 30 secondi

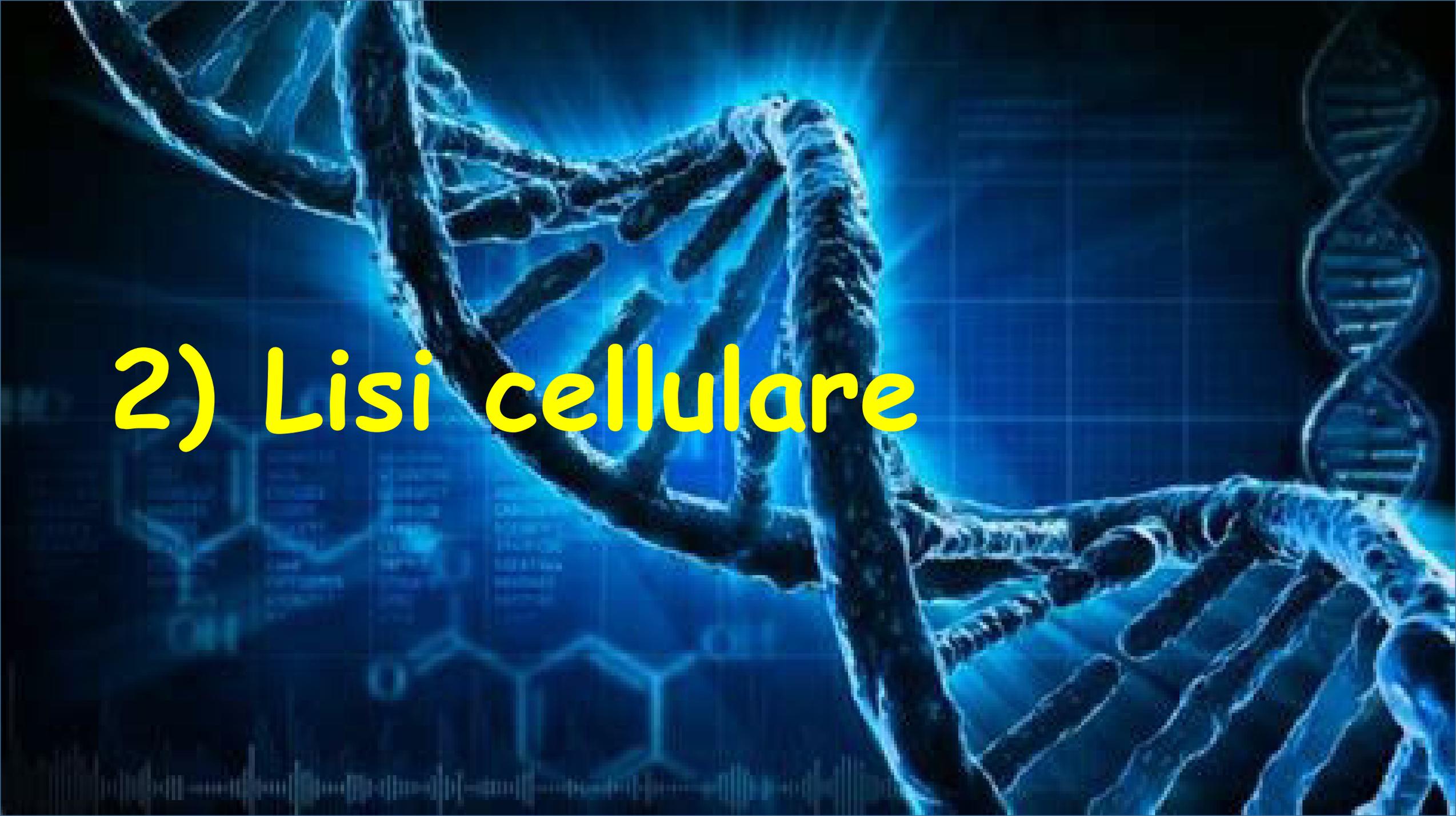


Abbiamo preso l'acqua da una
provetta e ci siamo sciacquati la
bocca per altrettanto tempo

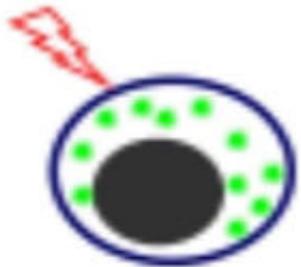
Con molta attenzione abbiamo
versato l'acqua dalla bocca nella
provetta da 15 ml



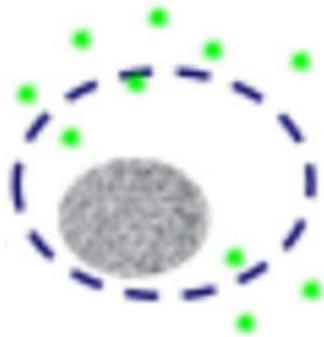
2) Lisi cellulare



PRIMA

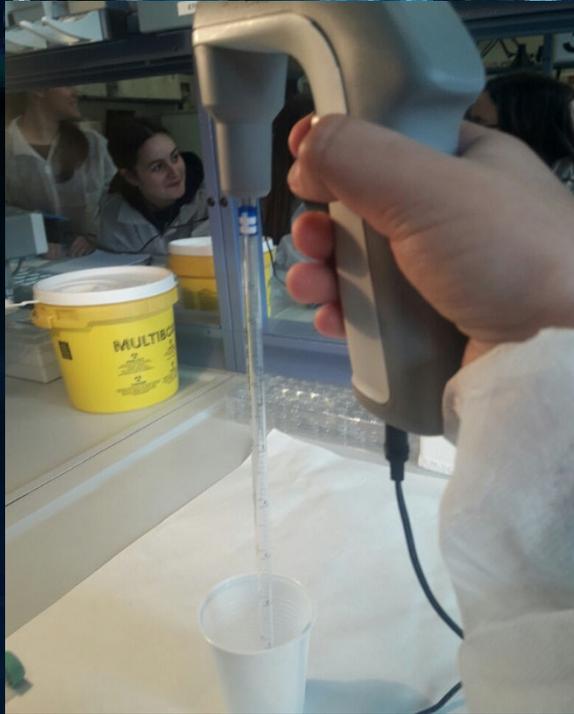


DOPO



DEFINIZIONE :

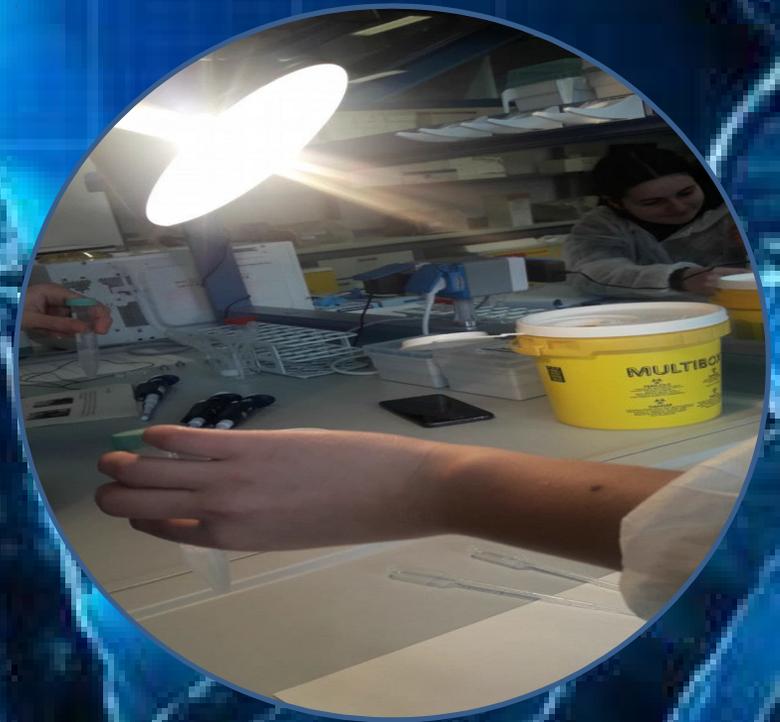
La Lysis è la demolizione e dissoluzione di una cellula per mezzo del detergente SDS causata dalla rottura della membrana cellulare.



Per effettuare questa
reazione chimica abbiamo
messo 2 ml di soluzione
Lisi nella provetta con la
saliva



Poi l'abbiamo chiusa col
tappo ed invertita
delicatamente per 5
volte per permettere
alla Lisi di agire





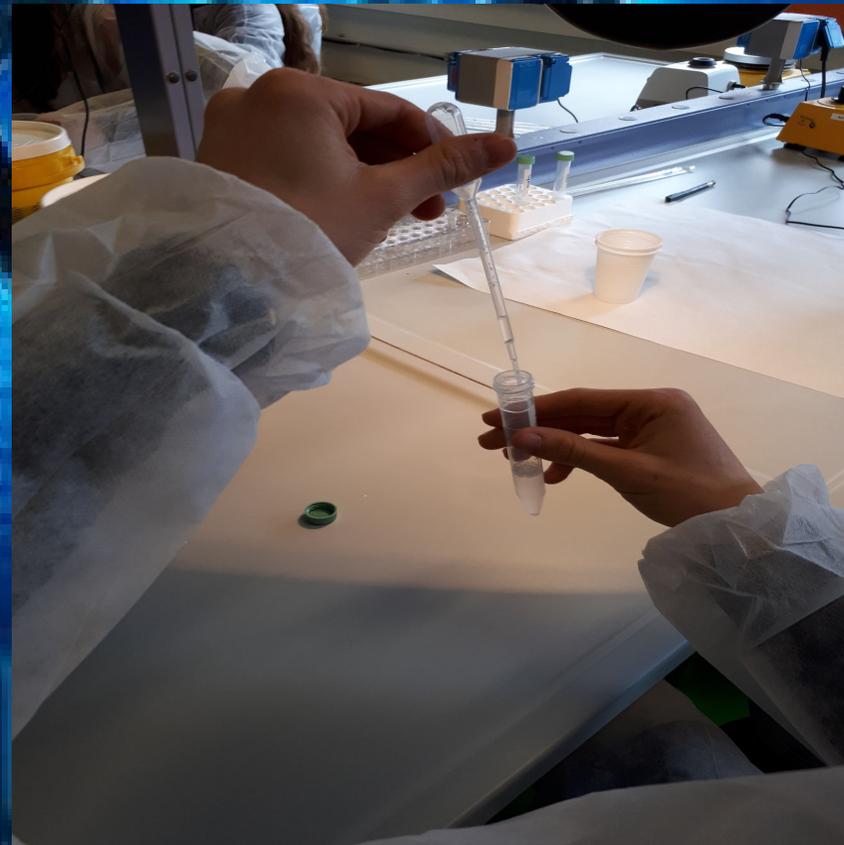
**3) Inattivazione degli
enzimi proteici con
proteasi**



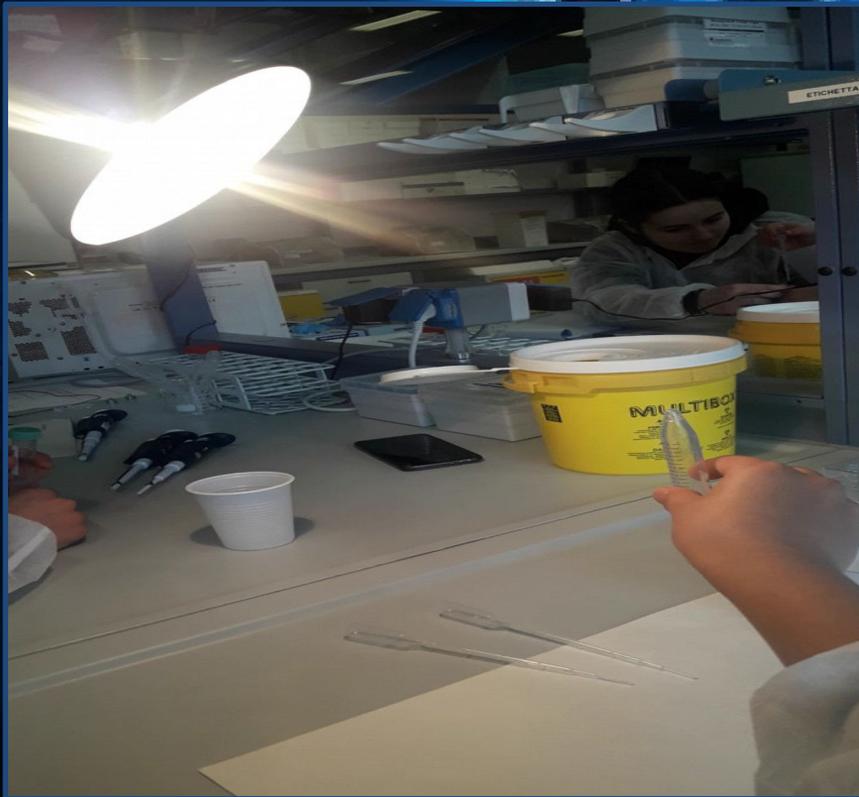
DEFINIZIONE :

La proteasi è un enzima in grado di inattivare gli enzimi di natura proteica presenti nella saliva che potrebbero interferire con i reagenti.

Abbiamo preso un Eppendorf contenente l'enzima proteasi e abbiamo aggiunto 5 gocce alla soluzione contenente il DNA



Successivamente
abbiamo tappato la
provetta invertita
dolcemente alcune
volte



In seguito abbiamo incubato la soluzione in provetta a 50°C per 10 min. a bagno maria



E ora ... 10 minuti di pausa!!





4) Isolamento del DNA e preparazione del precipitato



Poi abbiamo aggiunto, con una pipetta Pasteur, 10 ml di Etanolo* freddo, facendolo scorrere lungo la parete della provetta

DEFINIZIONE :
L'Etanolo a -20°C
(95%) farà
precipitare l'acido
desossiribonucleico
sul fondo della
provetta.





Dopo aver lasciato riposare la provetta
per 5 min., l'abbiamo invertita
dolcemente per favorire la precipitazione
del DNA

In seguito abbiamo trasferito il campione in una provetta Eppendorf e, una parte riposta nella provetta a forma di doppia elica



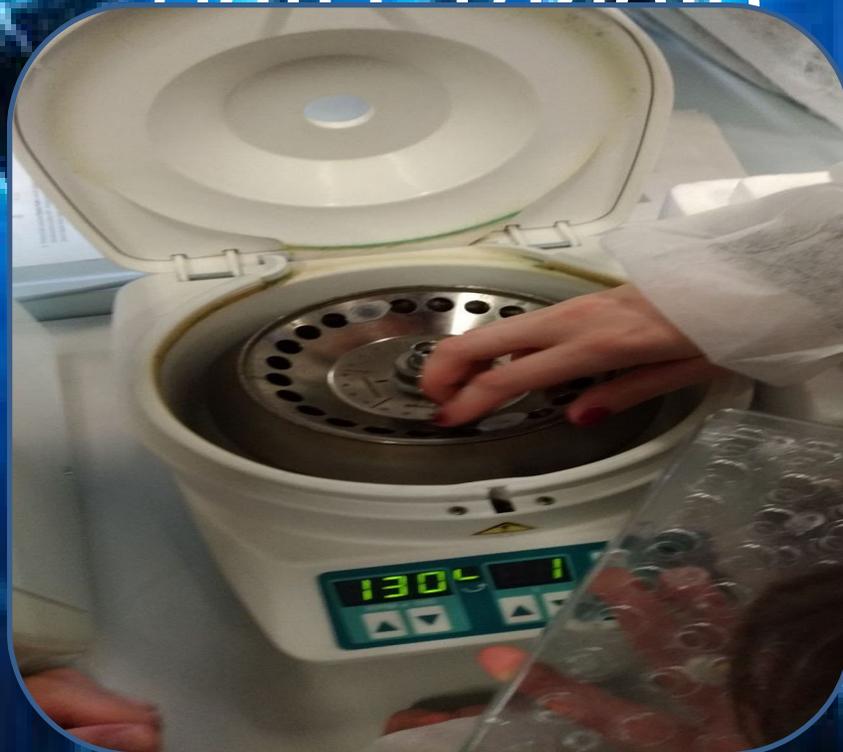


Il DNA rimanente, se mantenuto a 4°C , può essere conservato anche per mesi prima di degradarsi



5) Corsa elettroforetica

La soluzione con Etanolo è stata centrifugata per 1 min. a 13 mila giri per far sedimentare il DNA separandolo dall'Etanolo



A questo punto
abbiamo dovuto
prelevare l'
Etanolo prima con
una micropipetta
e poi facendolo
evaporare



Dopo abbiamo risospeso il precipitato (era troppo compatto) con circa 350 μl di acqua e disgregato, pipettando più volte



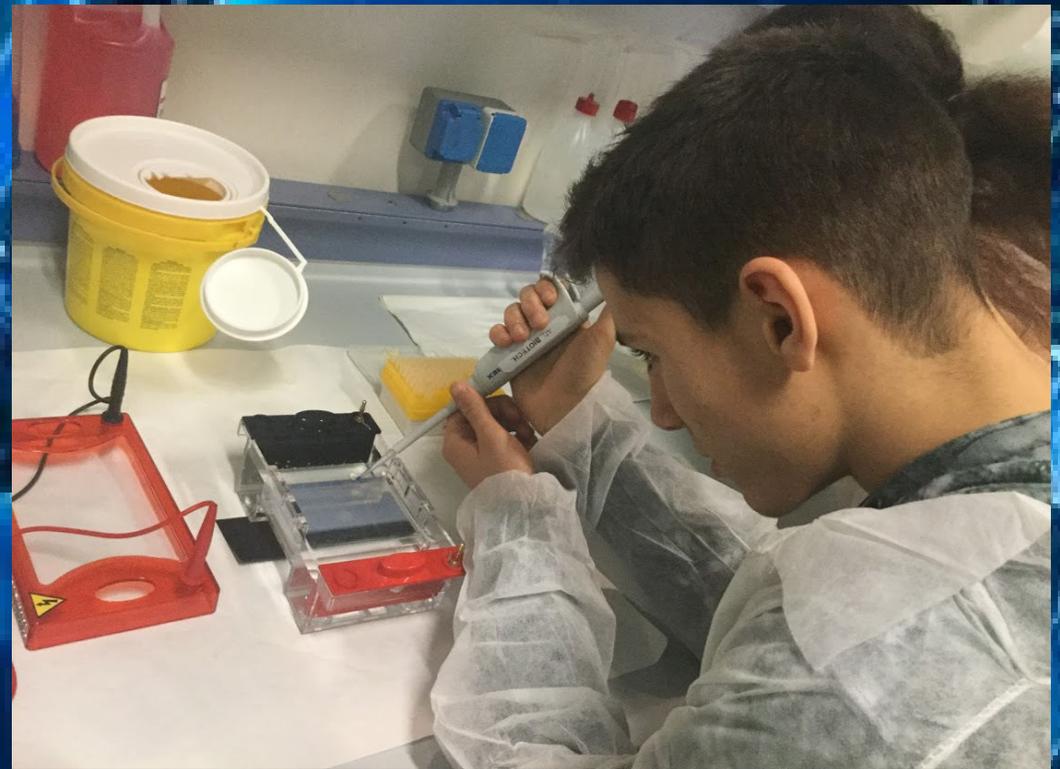
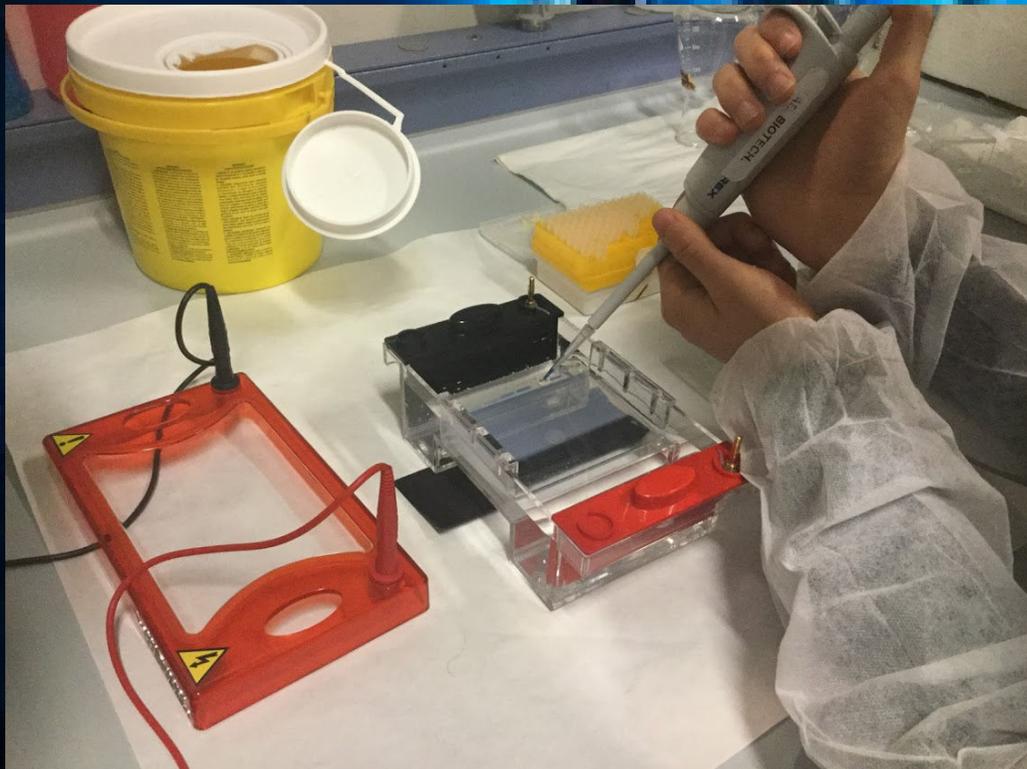
Successivamente, con una pipetta P20,
abbiamo prelevato 9 μ l del DNA e
l'abbiamo trasferito in una provetta pulita





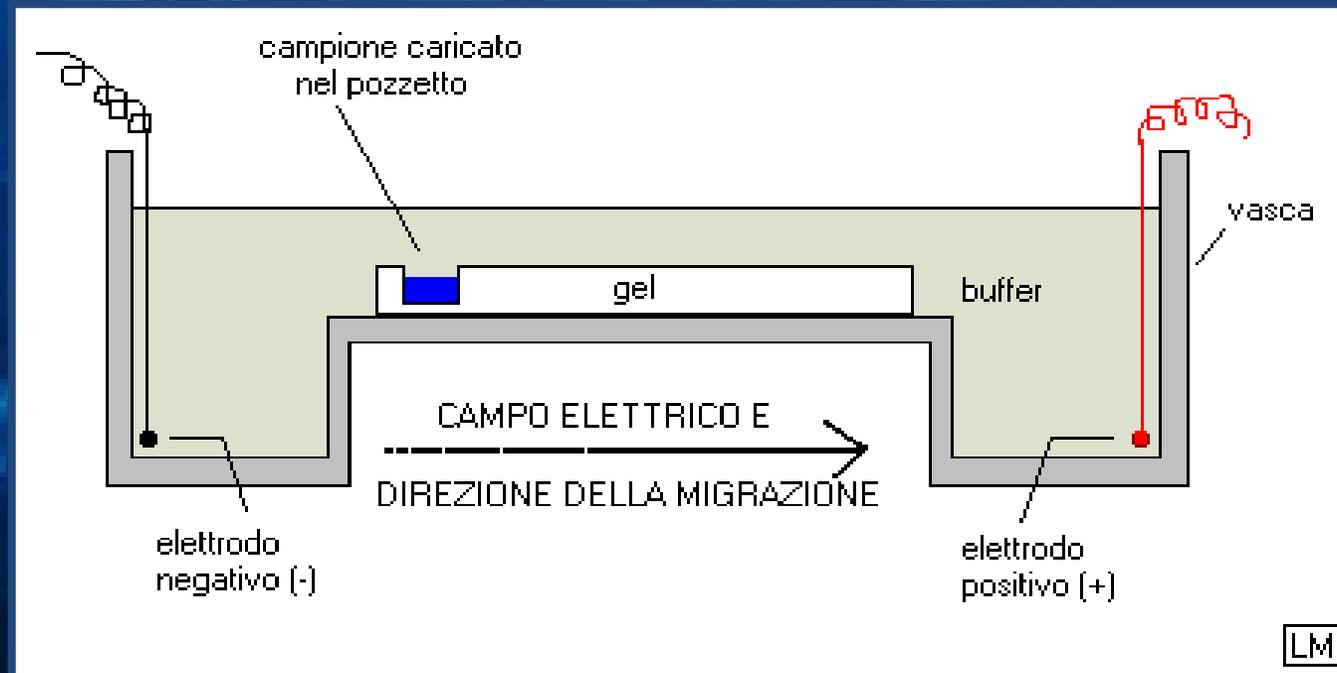
Per identificare il DNA abbiamo aggiunto
3 μ l di colorante e, per mescolarlo,
l'abbiamo centrifugato 10 sec.

Poi abbiamo colorato un campione di 12 μ l in un pozzetto di agarosio al 10%. Altri 3 pozzetti sono stati caricati con:



- 
- marcatore peso molecolare 1 KB;
 - DNA plasmidico;
 - DNA plasmidico digerito con 2 enzimi di restrizione;

Infine abbiamo applicato un campo elettrico per 15 min. Il DNA carico negativamente è stato attratto al polo positivo.





Dal momento che, più è leggero più velocemente correrà nel gel, le distanze dal punto di partenza sono inversamente proporzionali al peso dei frammenti di DNA

Ecco qui i tracciati, indispensabili per l'analisi del DNA genomico!!



PowerPoint realizzato da:

- ❖ **Alberto Blessano**
- ❖ **Riccardo Ceschiutti**
- ❖ **Matteo Coceancigh**
- ❖ **Matteo Ciprian**





