

Corso di Laurea in Ottica e Optometria, Università di Padova
Insegnamento di Biologia
Prof. Stefania Bortoluzzi, Dr. Giulia Calabretto

Giorno	Estrazione DNA da line cellulari umane	Allestimento di colture batteriche
Primo	<ul style="list-style-type: none">• Estrazione DNA	<ul style="list-style-type: none">• Semina su piastre petri già preparate• Incubazione
Secondo	<ul style="list-style-type: none">• Preparazione gel di agoariosio• Elettroforesi• Verifica della qualità del DNA estratto	<ul style="list-style-type: none">• Osservazioni qualitative e quantitative sulle colonie cresciute



Estrazione di DNA



Estrazione di
DNA da osso di
Neandertal



Identificare
potenziali
sospettati,
scagionare
persone accusate,
identificare vittime



Stabilire la
paternità o altre
relazioni
familiari



Determinare il
pedigree di razze e
semi



Identificare specie protette e in
via di estinzione



Autenticare
alimenti



Ricerca di base



Diagnostica
molecolare

- **Sangue** (leucociti)
- **Tessuti** (biopsie, in paraffina, villi coriali)
- **Liquidi biologici:**
 - urina, feci
 - liquor
 - saliva
 - liquido amniotico
- **Bulbo di capello, unghie**

Estrazione di DNA

Il DNA può essere estratto da ogni tipo di cellula o tessuto.

L'estrazione e la purificazione di acidi nucleici da un materiale biologico richiedono:

- la lisi della membrana delle cellule,
- l'inattivazione delle nucleasi cellulari
- e la separazione dell'acido nucleico dai residui cellulari

Estrazione di DNA da saliva

Fasi

1. Lisi cellulare ed inattivazione delle nucleasi
2. Purificazione del DNA
3. Precipitazione del DNA
4. Valutazione qualitativa DNA estratto

1. Lisi cellulare

Scopo: liberare il DNA dai nuclei e dalle proteine istoniche e di inattivare le nucleasi

- **Disgregazione meccanica:**
 - omogenizzazione
- **Trattamento con agenti chimici:**
 - detergenti (SDS, Nonidet P40)
 - agenti caotropici (urea, ioduro di sodio, guanidina tiocianato)
- **Digestione enzimatica:**
 - proteinasi K

2. Purificazione DNA

Scopo: separare il DNA dalle componenti cellulari (proteine, lipidi, polisaccaridi) e da sostanze interferenti

- Metodo del salting out

Utilizza alte concentrazioni saline per rimuovere le proteine (NaCl saturo)

- Utilizzo di solventi organici

Cloroformio (solubilizza i lipidi)

3. Precipitazione DNA

Scopo: concentrare, desalificare e recuperare il DNA in forma solida permettendone il successivo ridiscioglimento nella soluzione desiderata

- Trattamento con alcoli

- etanolo: in presenza di alte concentrazioni di sali monovalenti (sodio acetato, ammonio acetato)
- isopropanolo: non richiede alte concentrazioni saline ma è meno facilmente eliminabile dell'etanolo

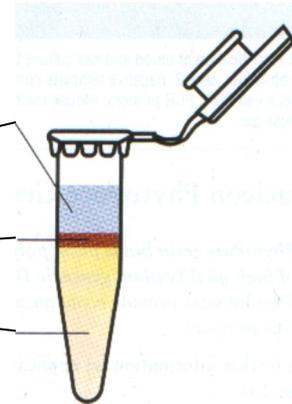
Protocollo da noi utilizzato

1. Lisi campione

- Tampone di lisi (SDS, EDTA)
- Proteinasi K
- incubazione a 55°C e inattivazione Proteinasi K a 100°C
- SDS

2. Purificazione DNA

- NaCl saturo per il salting-out
- Cloroformio
- Centrifugazione
- 3 fasi: -fase acquosa contenente DNA
 - interfaccia contenente proteine denaturate
 - fase organica contenente i lipidi
- Prelevare la fase acquosa superiore



3. Precipitazione DNA

- Isopropanolo: precipitazione DNA (formazione flocculo)
- Centrifugazione
- 2 lavaggi pellet con etanolo 70 %
- Evaporazione etanolo a provetta aperta
- Risospensione in H₂O milliQ

Precauzioni da usare per evitare la Frammentazione del DNA

- **Danneggiamento a causa sollecitazioni meccaniche**
 - maneggiare con delicatezza
 - no vortex a velocità elevata
 - no pipettamento eccessivo e vigoroso
- **Digestione da parte di nucleasi cellulari**
 - lavorare con i guanti
 - soluzioni e materiali sterili
 - soluzioni contenenti EDTA

4. Valutazione qualitativa

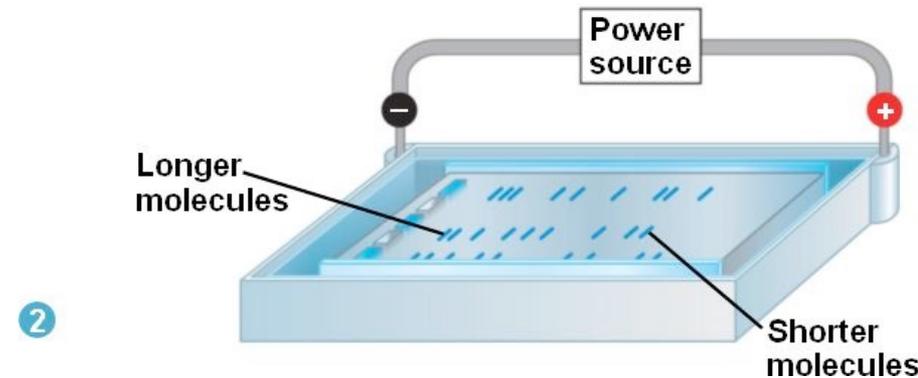
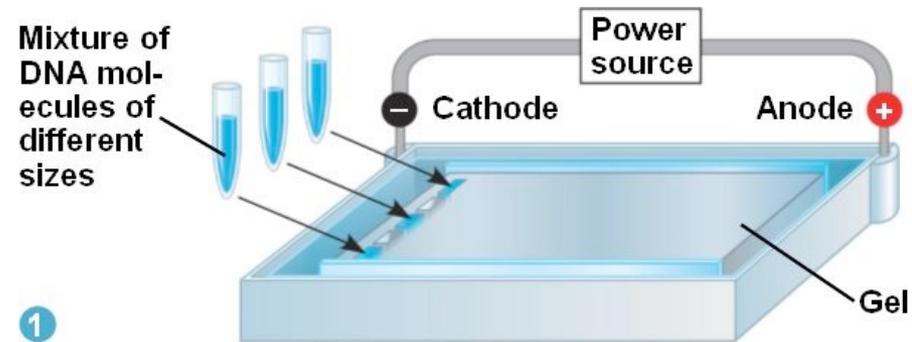
DNA estratto mediante gel elettroforesi

Per poter visualizzare il DNA su un gel, altrimenti invisibile, bisogna colorarlo con un agente intercalante che emette fluorescenza quando eccitato a lunghezze d'onda ultraviolette (EtidoBromuro sostituito dal GelRed)

- I gel più utilizzati sono quelli di agarosio con concentrazioni 0,7
- 2% p/v
- A basse concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari alti (es. DNA genomico)
- Ad alte concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari bassi (amplificati di PCR)

4. Valutazione qualitativa DNA estratto mediante gel elettroforesi

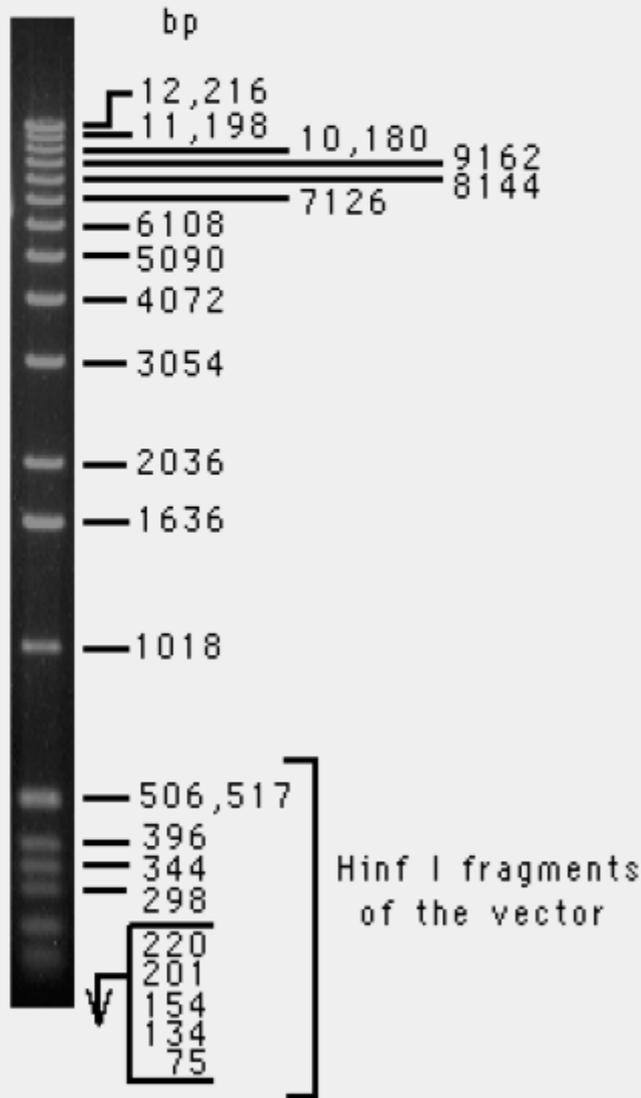
- E' possibile separare per taglia e visualizzare il DNA mediante elettroforesi in gel di agarosio.
- **Elettroforesi** → movimento di particelle cariche in un fluido per effetto di un campo elettrico.
- A pH 7 il DNA carico - migra verso il **polo +**
- Utilizzando come medium un fluido viscoso, le molecole migrano a **diversa velocità in base** non solo alla carica netta, ma anche ad altre caratteristiche quali la **dimensione** (velocità inversamente proporzionale e lunghezza).



4. Valutazione qualitativa

DNA estratto mediante gel elettroforesi

- Si miscela il DNA estratto con una soluzione di caricamento con diverse funzioni:
 - Sostanza pesante facilita il caricamento nei pozzetti della miscela.
 - Il DNA non e' visibile:
 - Per poter osservare l'andamento della corsa si usa una molecola colorata, visibile a occhio nudo, che migra come un frammento molto leggero
 - Per poter osservare il DNA si usano dei "coloranti", molecole intercalanti fluorescenti all'UV (GelRed). Si osserva quindi il gel dopo la corsa al transilluminatore UV.



1KB DNA mass ladder (Invitrogen)

Miscela di frammenti di DNA di lunghezza nota fornisce uno **Standard interno di dimensione** nella corsa

Caricare **10 µl** per lane.

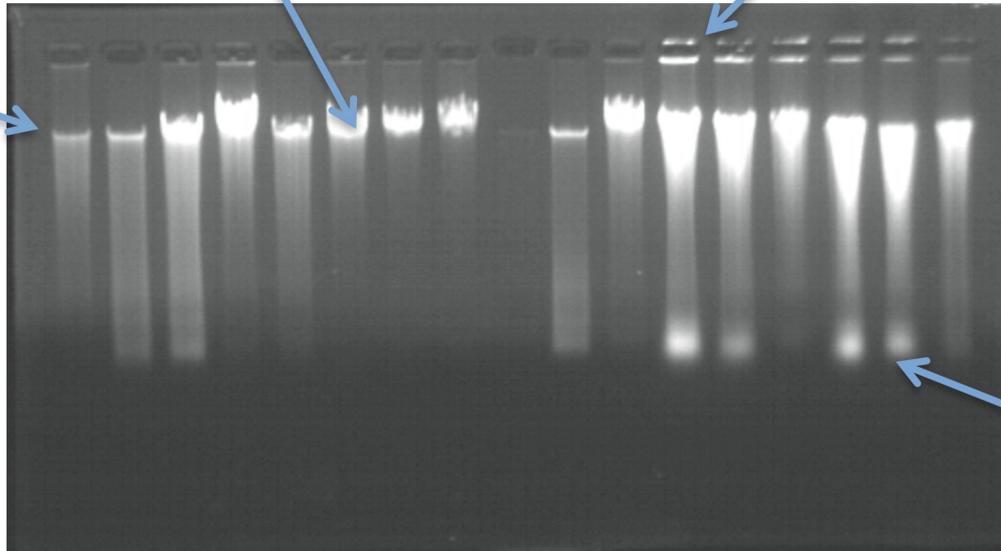
1 Kb DNA Ladder
0.5 µg/lane
0.9% agarose gel
stained with ethidium bromide

4. Valutazione qualitativa DNA estratto

Tight band with light smearing and have molecular weight more than 23kb.

DNA samples with impurities

Low band with light smearing and have molecular weight lower than 23kb.



RNA Contamination

Allestimento di colture batteriche



Scopi esercitazione

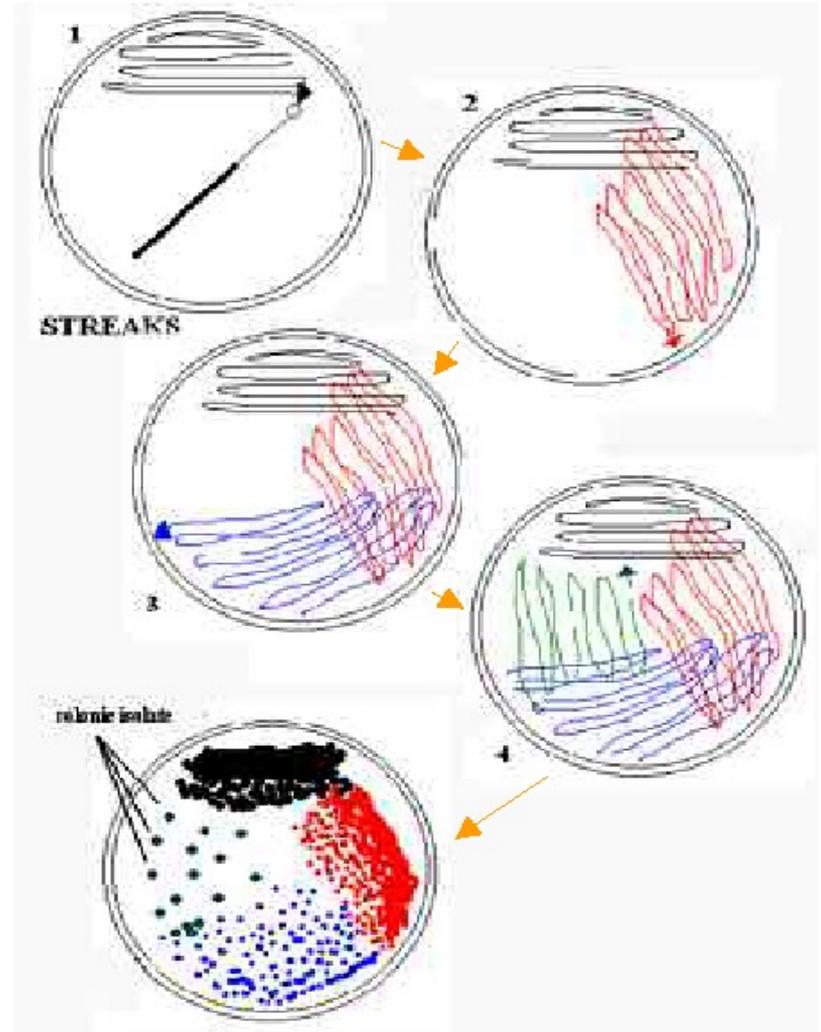
- Tecniche di semina
- Diluizioni progressive e semina per calcolo carica batterica di un campione (Escherichia coli, un comune batterio intestinale, ceppo di laboratorio).

Allestimento di colture batteriche

Come procedere

1. Semina con la tecnica di trasferimento per striscio su piastra (piastratura da terreno solido a terreno solido).

Scopo: isolamento di cloni da una patina di crescita batterica.



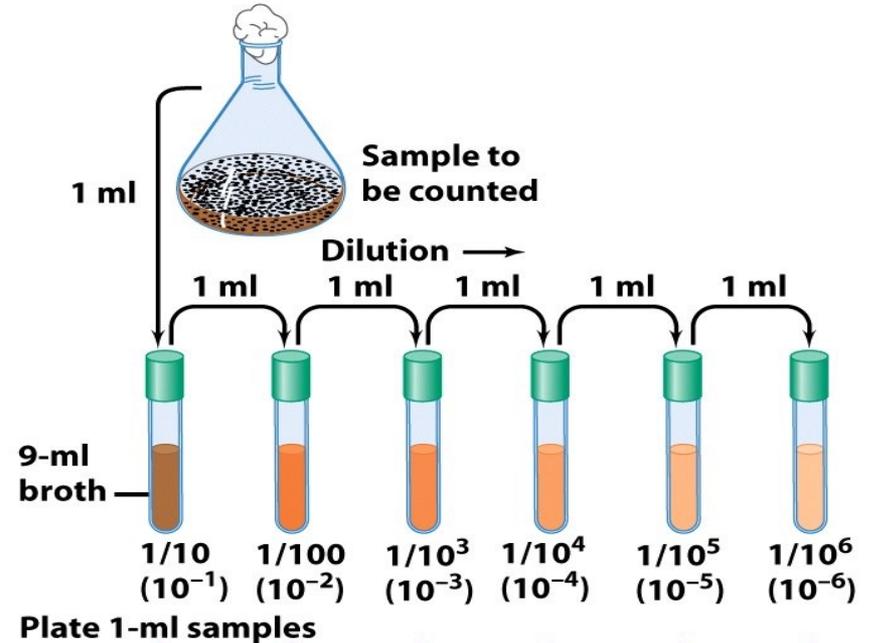
Allestimento di colture batteriche

Come procedere

2. Semina con tecniche di trasferimento da una sospensione di batteri a un terreno solido

2.1. EFFETTUARE

DILUIZIONI PROGRESSIVE



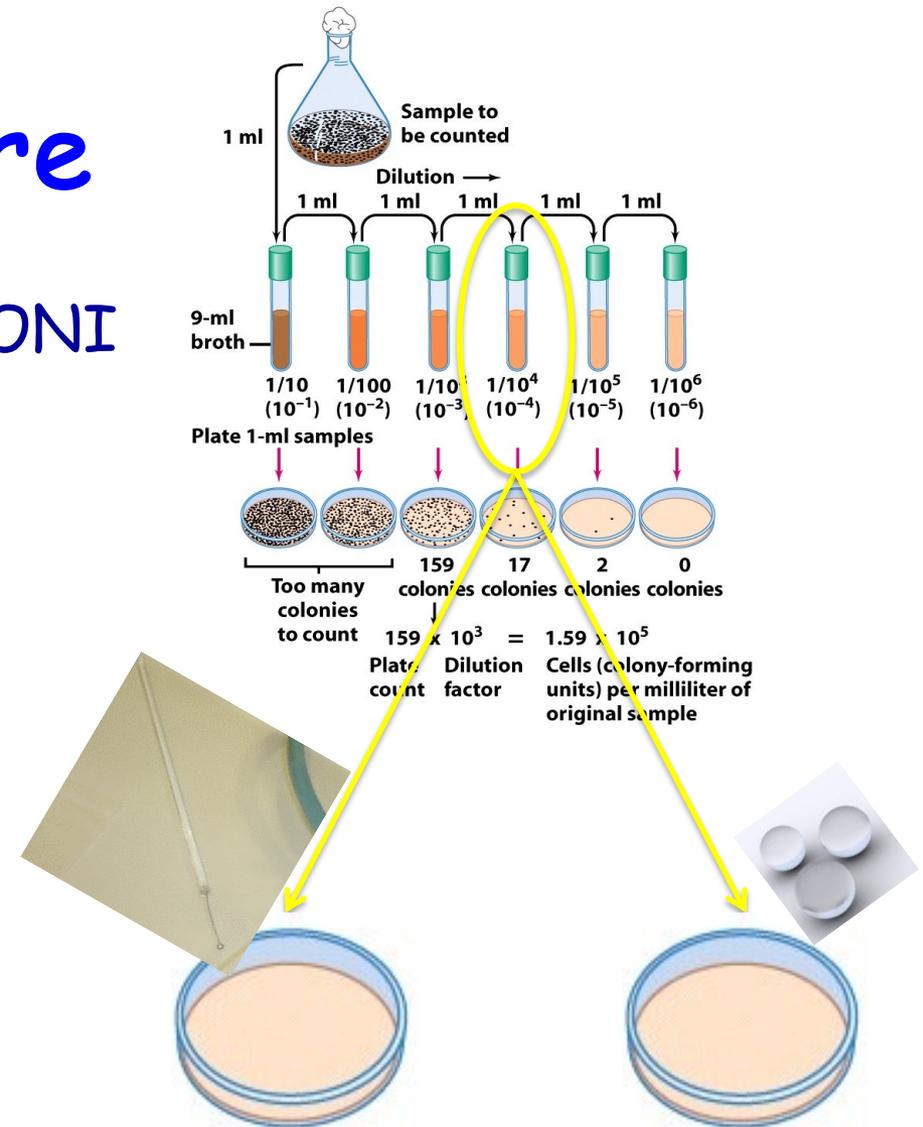
Allestimento di colture batteriche

Come procedere

2.4. SEMINARE LE DILUIZIONI

INDICATE USANDO

- LE ANSE IN VETRO
- LE PALLINE



Allestimento di colture batteriche

Come procedere

2.5. IN BASE A

- NUMERO DI COLONIE OSSERVATE,
 - DILUIZIONE UTILIZZATA,
- CALCOLARE LA CARICA BATTERICA DELLA SOLUZIONE MADRE in CFU/ml

