

# Estrazione di DNA dalla cipolla

---

Scheda didattica elaborata da:

Liceo Scientifico "Gregorio Ricci Curbastro" Lugo (RA)

Approfondimenti sul protocollo elaborati da Tiberio Di Corcia

Liceo Scientifico Niccolò Rodolico - Firenze

## Materiale:

- 1 cipolla in buono stato di conservazione (ancor meglio se Rossa di Tropea),
- soluzione al 4% di NaCl e al 10% di detersivo da piatti senza fosfati,
- 100 ml di acqua distillata,
- pepsina in HCl,
- alcool etilico 95%,
- ghiaccio,
- pipetta Pasteur,
- bagno con termostato,
- centrifuga,
- bacchetta di vetro,
- provette,
- pipette graduate.

## Metodologia

Prendere 10 gr di cipolla e pestarla nel mortaio per non più di 2-3 minuti (se si pesta troppo a lungo il DNA si rompe e i filamenti risulteranno corti) dopo aver aggiunto 10 cc di acqua.

Versare la parte liquida in una provetta apposita e centrifugare a 4000 giri per circa 5-10 minuti (in mancanza della centrifuga filtrare con garza la miscela ottenuta).

Prendere un po' del (filtrato) sovrinatante (circa 5/10 cc) e metterlo in un una provetta.

Versare un volume uguale della soluzione di NaCl e detersivo, **il detersivo rompe le membrane di ogni cellula e libera il DNA dal nucleo.**

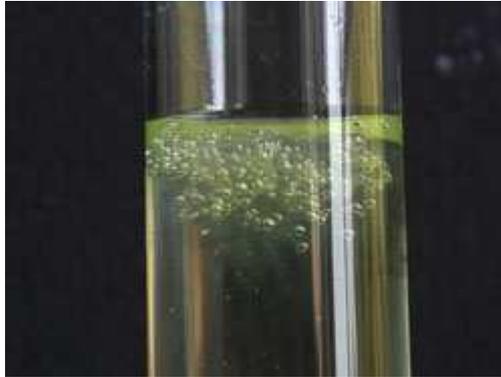
Mettere la provetta con tutto il contenuto in un bagnomaria a 60°C per 15 minuti e ogni tanto mescolare lentamente (per rompere le membrane di ogni cellula liberando dal nucleo il DNA.) . L'alta temperatura denatura la DNasi che potrebbe degradare il DNA.

Raffreddare per 6 minuti il composto immergendolo in un contenitore di ghiaccio mescolando ogni tanto (shock termico). Non lasciarlo troppo a lungo potrebbe frammentare il DNA. **Il ghiaccio serve per fermare il processo affinché non si frammenti il DNA con il calore.**

Aggiungere 3-4 gocce di Pepsina in soluzione acida e agitare delicatamente. La pepsina serve per digerire le proteine in soluzione e rende limpida la soluzione.

Versare circa 10 ml di alcool lungo la parete della provetta; dopo pochi secondi si formerà, sulla superficie del filtrato, uno strato filamentoso biancastro detto ad "effetto a medusa": il DNA.

**Il DNA non si scioglie in alcool ma solo in acqua.**



Per verificare se ciò che abbiamo ottenuto è veramente DNA possiamo raccogliere, filtrando con garza la miscela ottenuta o meglio con un'ansa (girandola con movimento rotatorio sempre nello stesso senso), il filamento e metterlo in una provetta, aggiungere acqua e agitare, si deve sciogliere.

Oppure si può osservare al microscopio con un po' di blu di metilene ma con i microscopi normali non è certo possibile vedere la caratteristica forma ad elica.



### **TEMPO RICHIESTO**

- 2 ore di lezione frontale
- 1-2 ore di attività sperimentali

## Approfondimenti sui passaggi dell'esperimento

La prima operazione comporta una prima **frantumazione meccanica** dei tessuti cellulari allo scopo di liberare il DNA dai nuclei.

La centrifugazione serve invece a **separare i residui** grossolani dovuti alla frantumazione dei tessuti dal liquido di estrazione, che contiene DNA in soluzione acquosa

La soluzione Cloruro di Sodio / Detersivo serve alla **demolizione della struttura cellulare** ed inattivazione degli **istoni**<sup>1</sup>.

Più precisamente Il cloruro di sodio ha una doppia azione:

1. esercita azione di **soluzione ipertonica** favorendo la fuoriuscita dell'acqua dalle cellule vegetali causandone l'implosione
2. inizia la **distruzione delle proteine**, gli istoni, la cui funzione è quella di compattare il DNA facendolo aderire al nucleo cellulare. L'azione di distruzione degli istoni avviene per denaturazione

Il detergente invece **discioglie le membrane cellulari** liberando il DNA dal nucleo: il detergente agisce sulle membrane cellulari: sulla membrana esterna della cellula, la membrana *plasmatica*, e la membrana *del nucleo*, all'interno del quale è contenuto il DNA

Lo **shok termico** a cui è stato sottoposto il campione contribuisce alla **frantumazione ulteriore dei tessuti e, in fase di riscaldamento l'alta temperatura facilita la rottura delle membrane e disattiva gli enzimi che attaccano il DNA**. In condizioni normali infatti, in caso di rottura della cellula, verrebbero immediatamente attivati questi enzimi che demolirebbero la molecola del DNA

L'aggiunta di pepsina in soluzione acida continua il processo di **demineralizzazione degli istoni**

Infine, l'aggiunta di alcol etilico consente di **visualizzare** il DNA.

---

<sup>1</sup> **Tratto da Wikipedia:** Gli **istoni** sono proteine cariche positivamente poiché posseggono un gran numero di amminoacidi con catena laterale basica (soprattutto lisina e arginina). Essi interagiscono con il DNA, che è carico negativamente per l'abbondanza di gruppi fosfato, per formare strutture dette nucleosomi. Il ruolo fondamentale degli istoni è quello di organizzare il DNA, compattandolo e facendo aderire meglio il DNA all'ottamero istonico, in modo tale da consentire alle cellule di conservarlo in un volume ristretto come quello del nucleo. Una seconda funzione è quella di compattare ulteriormente la cromatina nel suo secondo livello di organizzazione, la fibra da 30 nm di spessore