

INTRODUZIONE

Acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono una famiglia eterogenea di macromolecole distribuite all'interno di tutte le cellule degli organismi viventi:

Il DNA che può essere **Nucleare** (contenuto DNA/cellula mammifero: 6 pg) e degli **Organuli**: mitocondri e cloroplasti (contenuto mtDNA/cellula eucariotica: <0.1% di tutto il DNA cellulare).

L'RNA Citoplasmatico (contenuto medio RNA/cellula: 20-25 pg) -rRNA (75% dell'RNA cellulare) -mRNA -tRNA

I protocolli sperimentali di isolamento e purificazione degli acidi nucleici variano a seconda

- tipo di acido nucleico (ssDNA, dsDNA, RNA totale, mRNA, etc.)
- fonte (tessuti animali o vegetali, eucarioti, procarioti, virus)
- materiale di partenza (organo intero, tessuto, coltura cellulare, sangue, etc.)
- risultato desiderato (quantità, purezza, tempo richiesto)
- applicazione prevista post-estrazione (PCR, cloning, marcatura, restrizione enzimatica, southern blotting, RT-PCR, sintesi di cDNA).

In tutti i casi è necessario:

1. Rompere la parete e/o la membrana cellulari
2. Separare gli acidi nucleici dagli altri componenti cellulari

● Lisi delle cellule, affinché queste rilascino i loro componenti cellulari.

In funzione dei diversi tipi cellulari, vengono utilizzati metodi diversi:

per le **cellule vegetali e i funghi**, che possiedono una parete cellulare più resistente rispetto ai batteri, è necessario rompere la parete con :

metodi fisici (cicli ripetuti di congelamento-scongelo, biglie di vetro, sonicazione, utilizzo di mortaio e pestello, ecc.)

oppure con

metodi enzimatici capaci di digerire la parete cellulare.

Successivamente una centrifugazione permette di eliminare i detriti cellulari dal contenuto cellulare rilasciato nel mezzo, che è costituito da varie componenti cellulari come DNA, RNA, lipidi, mono e polisaccaridi, proteine e sali.

● Deproteinizzare la soluzione .

La rimozione delle proteine dal lisato cellulare è particolarmente importante sia perché tra le proteine sono presenti enzimi capaci di degradare gli acidi nucleici (DNAsi e RNAsi), sia per la presenza di proteine capaci di legarsi agli acidi nucleici impedendone la funzione e/o la purificazione. Le proteine sono rimosse dalla preparazione mediante varie tecniche da usare in combinazione, o l'una in alternativa all'altra.

Uso di enzimi proteolitici.

La Proteinasi K, così detta per il suo potere di idrolizzare la cheratina, è una endopeptidasi di origine fungina. La digestione enzimatica è condotta in presenza di EDTA, necessario per inattivare le DNAsi. La rimozione degli ioni Ca^{++} ad opera dell'EDTA determina la perdita dell'80% della sua

attività enzimatica, ma l'attività residua è comunque sufficiente a degradare le proteine che contaminano gli acidi nucleici.

Estrazione “salting out”

La precipitazione delle proteine mediante “salting out” è uno dei metodi più utilizzati e sfrutta il principio secondo il quale la solubilità delle proteine in soluzione dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione salina o forza ionica. A basse concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine aumenta lentamente (salting in), mentre ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente (salting out) causando la precipitazione delle stesse.

Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi classico e il trattamento con la Proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali. Infine mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA.

ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO DA CELLULE VEGETALI.

Materiale:

Cellule vegetali (da banana, mela)
soluzione di lisi (soluzione al 4% di NaCl e al 10% di detersivo da piatti senza fosfati)
100 ml di acqua distillata,
pepsina in HCl (o in alternativa proteinasi K stabilizzata in EDTA),
alcool etilico 95%,
ghiaccio,
pipetta Pasteur,
bagno con termostato,
centrifuga,
bacchetta di vetro,
provette,
pipette graduate.

Metodologia

Prendere 10 g di campione vegetale e pestarlo nel mortaio per circa 2-3 minuti dopo aver aggiunto 10 mL di acqua.

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

Prendere circa 5/10 mL del (filtrato) sovrnatante e metterlo in un'altra provetta.

Versare un volume uguale della soluzione di lisi.

Mettere la provetta con tutto il contenuto in un bagnomaria a 60°C per 15 minuti e ogni tanto mescolare lentamente .

Raffreddare per 6 minuti il contenuto immergendolo in un contenitore di ghiaccio mescolando ogni tanto (shock termico).

Aggiungere 3-4 gocce di pepsina in soluzione acida e o di Proteinasi K e agitare delicatamente.

Prelevare 5 mL del campione e aggiungere 1,4 mL di soluzione satura di NaCl (circa 6 molare).

Agitare il preparato (vortex) per qualche minuto.

Centrifugare a 2500 rpm per 15 minuti per separare la soluzione acquosa che contiene gli acidi nucleici dal precipitato (pellet).

Prelevare il sovrnatante, 6 mL e trasferirlo dividendolo in 2 parti da 3 mL ciascuna in 2 provette.

Aggiungere a ciascuna 3 mL di alcool etilico per consentire la precipitazione in soluzione alcolica del DNA

Osservare lo strato filamentoso biancastro detto ad "effetto medusa": il DNA.

DOSAGGIO DEGLI ACIDI NUCLEICI

E' possibile dosare gli acidi nucleici con:

- 1) **Metodo Spettrofotometrico** (spettroscopia nell'ultravioletto)
- 2) **Metodo Fluorimetrico**
- 3) **Metodo Colorimetrico** (spettroscopia nel visibile)

Metodo Spettrofotometrico

Il metodo spettrofotometrico sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di **260 nm**.

Tale assorbimento è determinato dalle basi azotate, per cui è caratteristico del DNA a doppio e singolo filamento e dell'RNA

Legge di Lambert-Beer

$$\text{Log } I_0/I = \epsilon c l$$

Dove:

I_0 è l'intensità della luce incidente

I è l'intensità della luce trasmessa

ϵ è il **coefficiente di estinzione molare** (indica l'assorbanza di una soluzione 1M della sostanza in esame quando viene letta in una cuvetta con percorso ottico uguale ad 1 cm, ad una determinata lunghezza d'onda, espressa in $M^{-1} cm^{-1}$)

c è la concentrazione della specie assorbente (moli/L)

l è il percorso ottico (cm)

L'espressione $\text{Log } I_0/I$ viene detta assorbanza (A) o densità ottica (OD).

Il coefficiente di estinzione molare degli acidi nucleici è la somma dei coefficienti di estinzione molare di ciascun nucleotide.

È impossibile calcolare questa somma per tutti i nucleotidi, quindi è usato un **coefficiente di estinzione molare medio** che è:

$50 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per il DNA a doppio filamento

$40 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per l' RNA

Quindi:

$$1A_{260} \text{ di DNA a doppio filamento} = 50 \mu\text{g/mL}$$

$$1A_{260} \text{ di RNA} = 40 \mu\text{g/mL}$$

Il rapporto A_{260}/A_{280} è usato per stimare la purezza della preparazione degli acidi nucleici, perché le proteine, che sono la principale fonte di contaminazione, assorbono a 280 nm.

Preparazioni pure di **DNA** hanno valori di A_{260}/A_{280} uguali a **1,8**

Preparazioni pure di **RNA** hanno valori di A_{260}/A_{280} uguali **2**

L'assorbanza a 230 nm, cioè ai margini dello spettro di assorbimento degli acidi nucleici, riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati o composti aromatici. Per

campioni puri il rapporto A260/A230 dovrebbe essere circa 2,2.