	A. S. 2009/ 2010	RELAZIONE N° .....	
<u>GRUPPO: n°</u>	<u>DATA:</u>	<u>CLASSE:</u>	
	<b>Estrazione del DNA umano</b>		
<p><b>MATERIALE OCCORRENTE:</b></p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p><b>Materiale contenuto nel Kit 119</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Buffer di lisi</li> <li>• Soluzione di NaCl</li> <li>• Proteasi</li> <li>• Soluzione Blu di metilene</li> </ul> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p><b>Materiale aggiuntivo da preparare</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcool isopropilico (o etanolo) a bassa temperatura (freezer)</li> <li>• Portaprovette</li> <li>• Guanti da laboratorio usa e getta</li> <li>• Becher da 20 ml</li> <li>• Provette (13 x 100 mm)</li> <li>• Acqua naturale</li> <li>• Carta da filtro</li> </ul> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
<b>N°</b>	<b>DENOMINAZIONE STRUMENTI</b>	<b>SENSIBILITA'</b>	<b>PORTATA</b>
1	Bagno di incubazione (56 °C)	0,5°C	Da Temperatura ambiente a 75°C

### **PROCEDURA DI SICUREZZA**

#### **NORME DI SICUREZZA DI LABORATORIO**

1. Guanti e occhiali di protezione devono essere sempre indossati per una buona pratica di laboratorio
2. Esercitate la massima cautela quando state lavorando con materiale che è utilizzato insieme a reagenti riscaldati e/o fondenti.
3. NON PIPETTATE CON LA BOCCA, USATE IL PIPETTATORE.
4. Dovete aver cautela quando in laboratorio usate del materiale elettrico
5. Lavatevi sempre le mani con acqua e sapone dopo aver toccato reagenti o materiale biologico in laboratorio.

N.B. i materiali utilizzati per questa esperienza possono essere smaltiti nel lavandino perché non contengono rifiuti speciali.

### **PROCEDURA DI ESECUZIONE DELL'ESPERIENZA:**

- 1) Prendete due provette vuote e segnate il vostro nome.
- 2) Riempitela la prima con 1 ml di tampone di lisi
- 3) Riempite la seconda con 5 ml di acqua naturale.
- 3) Masticate delicatamente per alcuni secondi le guance.
- 4) Sciacquate la bocca con l'acqua contenuta nella provetta numero due.
- 5) versate con attenzione l'acqua di risciacquo nella provetta numero 2. (nota: se il materiale prelevato è stato rilasciato in soluzione questa apparirà torbida)
- 6) Usando la pipetta aggiungete alla provetta il tampone di lisi, chiudete la provetta ed invertitela un paio di volte.
- 7) aggiungete due gocce di proteasi Chiudete la provetta ed invertitela un paio di volte
- 8) Incubate la provetta a 56 °C nel bagnetto per 15 minuti
- 9) Aggiungete 4 gocce di NaCl in soluzione alla provetta
- 10) Chiudete e mischiate invertendo più volte
- 11) Incubate a temperatura ambiente per 4 minuti.

12) Usando pipette di precisione aggiungete 3 ml di isopropanolo nella provetta, l'operazione va compiuta inclinando leggermente la provetta a 45 ° lasciando scorrere molto delicatamente l'alcool ungo la parete in maniera che le due fasi acqua e alcol non si mescolino.

13) Lasciate il tutto 5 min. a temperatura ambiente.

14) A questo punto se la quantità di DNA estratto è sufficiente, mettendo la provetta in controluce, sarà possibile vedere DNA nell'interfaccia tra le due fasi.

15) Mettendo la provetta in controluce, provate a visualizzare il DNA che dovrebbe comparire come una piccola matassa bianca.

16) Con la micropipetta aggiungete una piccola goccia di soluzione blu di metilene alla provetta. (la piccola matassa bianca di DNA si colorerà immediatamente di blu mentre il resto della soluzione nella provetta assumerà una colorazione blu meno intensa rispetto al DNA)

17) Trasferite con l'aiuto di una pipetta una piccola quantità di DNA sulla carta da filtro

### **Conservazione del DNA**

1) Preparare una provetta per la conservazione del DNA inserendovi alcuni ml di alcolo etilico o isopropanolo. Pipettate il fiocco di DNA colorato chiudete la provetta e segnate sulla provetta data, contenuto e nome.

2) Mettete il DNA nel frigorifero per osservazioni successive.

**ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI RACCOLTI**

Inserire foto dell'esperimento con didascalia che descrive i vari passaggi

## RELAZIONE CONCLUSIVA DELL'ESPERIENZA E PRESENTAZIONE DEI RISULTATI FINALI

Dal 1800 è noto che tutti gli organismi viventi sono costituiti da cellule. Organismi come i batteri sono unicellulari, altri organismi come l'uomo, sono pluricellulari e quindi complessi perchè sono composti da miliardi di cellule differenti. Nel 1868, un biologo svizzero, Friedrich Meischer, scoprì che all'interno dei nuclei cellulari era contenuta una molecola, che chiamò acido nucleico, la cui funzione era sconosciuta. Solo molto dopo, nel 1940, che l'acido nucleico, l'acido deossiribonucleico (DNA) fu riconosciuto come la macromolecola che portava l'informazione genetica.

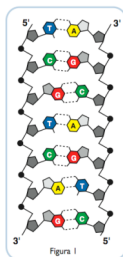
Il DNA gioca un importante ruolo in due processi: nella replicazione e nella traduzione.

Nella replicazione, procura l'informazione per copiare se stesso, l'informazione genetica può passare così da generazioni a generazioni di cellule.

Nel secondo, la traduzione, è in grado di fornire informazioni per ordinare correttamente gli aminoacidi richiesti per la formazione delle proteine.

La struttura della molecola di DNA è stata determinata da James Watson e Francis Crick nel 1953.

Stabilirono che il DNA era una doppia elica costituita da due filamenti.



Il modello di Watson e Crick è spesso descritto come una scala a spirale, nel quale i due filamenti sono lo scheletro della scala costituito da gruppo fosfato e zucchero.

Lo scheletro di zucchero agisce come supporto per i pioli della scala che sono composti da basi chimiche: Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Le prime lettere di queste basi A, G, C, e T sono usate dai ricercatori per designare l'ordine delle basi all'interno dei filamenti di DNA.

Le basi sono sempre disposte a coppie. Quando A si trova su un filamento, T si trova sul filamento opposto. In modo analogo G e C si trovano su filamenti opposti del DNA. Le basi restano unite da legami deboli.

Il DNA può essere estratto dal nucleo delle cellule aggiungendo alle cellule una soluzione di estrazione. Le cellule sono lisate chimicamente (rotte) e il DNA è liberato dal nucleo e dall'impalcatura proteica dei cromosomi. La rottura della membrana cellulare e nucleare è nota come lisi cellulare. Il DNA è solubile in acqua quindi, quando è disciolto in acqua non è possibile vederlo, è invece insolubile in alcool. Le procedure di purificazione degli acidi nucleici solitamente includono precipitazione con alcool in presenza di sali. L'alcool isopropilico ha una densità minore rispetto all'acqua, se si aggiunge ad una soluzione acquosa contenente DNA non si mescolerà all'acqua, ma formerà un secondo strato al di sopra della soluzione.

### **Lisi cellulare e disgregazione del doppio strato fosfolipidico delle membrane**

L'enzima di lisi scioglie le molecole lipidiche, e le membrane cellulari e nucleari sono principalmente costituite da lipidi. Una volta che le membrane si sono dissolte, il DNA viene rilasciato in soluzione ma ci sono molti altri tipi di molecole cellulari

### **Utilizzo della proteasi per degradare le proteine cellulari**

Come avrai già indovinato, le molecole che possono interferire principalmente con la precipitazione del DNA

puro sono le proteine. Possiamo facilmente liberarci delle proteine senza danneggiare il DNA utilizzando un

enzima specifico che digerisce le proteine, chiamato proteasi.

La proteasi rompe i ponti peptidici tra gli

aminoacidi delle proteine. Distruggendo tutte le proteine verranno eliminate anche le DNasi, enzimi che digeriscono il DNA (in quanto enzimi, sono proteine).

