



Biotechnology Explorer™

Genes in a Bottle Kit

Modulo per l'estrazione del DNA

**Numero di catalogo
166-2000EDU**

**Il modulo per la preparazione della collana di DNA (166-2200EDU)
deve essere acquistato separatamente**

explorer.bio-rad.com

Vedere i componenti singoli per la temperatura di conservazione

Copia di qualsiasi parte di questo documento è consentito solo per l'utilizzo in classi scolastiche



Per contattare il Servizio Tecnico chiamare gli uffici di Bio-Rad Italia al numero verde 800-265434

Cattura la tua essenza!

Che sia clonato, sequenziato, mappato, geneticamente ingegnerizzato, o che sia stato fatto un fingerprint il DNA è diventato un argomento trattato giornalmente dai mezzi di comunicazione e a scuola. Introduci gli studenti nel campo molecolare della biologia — con la loro propria essenza! I tuoi studenti possono catturare, conservare, e preservare il proprio DNA.

Come possono i ricercatori separare il DNA puro dalle cellule composte principalmente da lipidi, proteine, carboidrati, e sali? Le membrane vengono prima disgregate con detergenti per rilasciare il DNA in soluzione; quindi le proteine e altre molecole organiche vengono digerite e separate mentre il DNA rimane intatto. Il DNA infine viene raccolto per precipitazione in una forma che può essere utilizzata per manipolazioni successive.

Con questa semplice attività di laboratorio, gli studenti ottengono la conoscenza pratica eseguendo una reale procedura di laboratorio che è utilizzata per estrarre il DNA da molti differenti organismi per una gran varietà di applicazioni. I tuoi studenti estrarranno DNA genomico dalle cellule della loro parete boccale e lo vedranno precipitare in soluzione sotto forma di bianchi filamenti. Utilizzando il modulo di estrazione del DNA (166-2200EDU), i filamenti di DNA sono facilmente visibili e possono essere trasferiti in una ampolla di vetro, e la provetta può essere modellata in forma di collana.

Questo kit è adatto a studenti dalla scuola media fino all'università e solo una minima conoscenza di base è richiesta. Questa attività di laboratorio può essere effettuata a qualsiasi livello durante un tipico corso di scienze o di biologia, dove sono discussi argomenti come le cellule, la struttura cellulare, la mitosi e la meiosi, la genetica, e la tecnologia del DNA.

Per gli studenti che affrontano i temi del campo della biologia molecolare per la prima volta il DNA è astratto ed intangibile. Questa procedura rende visibile l'invisibile — vedere il proprio DNA lo rende reale. Le illustrazioni del DNA ed aggiuntive attività di laboratorio sviluppano la comprensione della funzione del DNA come piano genetico di sviluppo della cellula, ed aiutano gli studenti a comprendere questa, in passato invisibile, sostanza della vita.

Questo kit fornisce opportunità di insegnamento a tutti i livelli di istruzione. L'attività è disegnata per qualsiasi ambiente scolastico e non richiede alcun equipaggiamento speciale o coloranti. Per la scuola secondaria superiore e l'università, le lezioni sulla struttura e funzione del DNA delle cellule e la funzione enzimatica possono essere introdotte o rinforzate da questa attività di laboratorio. Per gli studenti della scuola media, è una perfetta introduzione all'eccitante mondo della scienza del DNA.

Ogni commento e suggerimento è benvenuto. Divertitevi!

Biotechnology Team

Tabella dei Contenuti

Guida per l'insegnante

Composizione del kit e dotazioni	5
Visione d'insieme per l'insegnante	7
Perche' insegnare l'estrazione del DNA?	7
A chi e' rivolto	7
A che punto inserire il programma di laboratorio	8
Concetti di base raccomandati per gli studenti	8
I tempi di attivita'	8
Sicurezza	8
Le chiavi del successo	8
Misure volumetriche	8
Concetti di base e preliminari per gli studenti	
Introduzione al livello base	9
Introduzione al livello avanzato	11

Guida al laboratorio per l'insegnante

Svolgimento della lezione suggerito e tempi di esecuzione	13
Preparazione dell'insegnante	13
Controllo della postazione di lavoro	13
Guida rapida (Protocollo rapido di laboratorio)	16

Manuali dello studente

Manuale dello studente - Livello base	19
Introduzione e domande chiave	20
Controllo della postazione di lavoro	23
Istruzioni per l'estrazione e la precipitazione del DNA	23

Manuale dello studente - Livello avanzato	27
Introduzione e domande chiave	28
Controllo della postazione di lavoro	32
Istruzioni per l'estrazione e la precipitazione del DNA	32
Altre attività	
Dimostrazione simulata dell'estrazione del DNA	36
Osservazione al microscopio e colorazione del nucleo delle cellule	36
Risposte alle domande chiave	
Istruzioni di base	37
Istruzioni avanzate	38

Guida dell' insegnante

Composizione del modulo di estrazione del DNA ed attrezzatura

Questa sezione comprende la lista dei componenti forniti con il kit Genes in a Bottle. Fornisce anche una lista degli eventuali accessori necessari.

Ogni kit contiene reagenti sufficienti per 9 postazioni di lavoro da 4 studenti.

Utilizzare questa lista per verificare i componenti forniti prima di iniziare la sperimentazione.

<u>Componenti del Kit</u>	<u>Quantità</u>
Tampone di lisi	150 ml
Proteasi in polvere e sale	1.5 g
Provette coniche da 15ml	50
Microprovette trasparenti	60
Microprovette colorate	60
Pipette di plastica monouso	60
Porta-provette per microprovette	10

<u>Accessori richiesti (non inclusi in questo kit)</u>	<u>Quantita'</u>
Isopropanolo 91% (disponibile nei grandi magazzini specializzati) o etanolo 95%	circa 360 ml
Bagno d'acqua con termometro fissato a 50°C*	1
Pennarelli indelebili	1-9
Contenitore per ghiaccio	1
Bicchierini di plastica monouso o beaker per rifiuti	9
Beaker o portaprovette sufficiente per alloggiare le provette da 15 ml nel bagnetto d'acqua	1

Modulo per la collana di DNA facoltativo (non incluso in questo kit)**

Ogni modulo per la collana DNA contiene materiale sufficiente per preparare 18 collane. Due kits sono sufficienti per una classe di 36 studenti. **166-2200EDU contiene:

Ampolle di vetro	18
Tappi d'argento	18
Tappi di plastica	18
Cordicelle cerate	18
Super colla in gel	1 confezione

* Se non e' disponibile un bagno a temperatura controllata, utilizzare uno o più contenitori isolanti (Styrofoam e' il più indicato) grandi abbastanza da contenere i porta-microprovette e riempire con acqua scaldata a 50°C.

Ricariche Disponibili

Numero di catalogo	Descrizione
166-2300EDU	Genes in a Bottle Kit , contiene (1) Modulo di Estrazione del DNA e (2) Modulo per la collana di DNA. Il materiale è sufficiente per 36 studenti
166-2000EDU	Genes in a Bottle Modulo di Estrazione del DNA (sufficiente per 36 studenti)
166-2200EDU	Genes in a Bottle Modulo per la Collana di DNA (sufficiente per 18 studenti)
166-2001EDU	Genes in a Bottle Ricarica per il Modulo di Estrazione (include tampone di lisi e proteasi e sale in polvere)
166-2002EDU	Genes in a Bottle Tampone di Lisi , 150ml

Estrazione del DNA dalle cellule della parete boccale

Cattura la tua Essenza Genetica in una Bottiglia

Panoramica per l'insegnante

Perche' insegnare l'estrazione del DNA?

1) L'estrazione del DNA da' agli studenti l'opportunita' di vedere la loro essenza genetica.

I tuoi studenti saranno eccitati nel vedere che la vera sostanza che li rende unici diventa visibile ai loro occhi. Il DNA precipitato puo' essere trasferito in una ampolla di vetro e conservato per lunghissimo tempo.

2) L'estrazione del DNA aiuta gli studenti a comprendere le proprieta' del DNA.

Le molecole di DNA che costituiscono i nostri cromosomi sono incredibilmente lunghe e sottili. Chiedi ai tuoi studenti di immaginare come molecole cosi' lunghe possano stare all'interno di cellule cosi' microscopiche. Le fini fibre bianche che vedranno sotto forma di precipitati di DNA sono molte migliaia di molecole di DNA avvolte l'una all'altra come fibre in un filato.

3) L'estrazione di DNA e' il primo passaggio nella tecnologia del DNA.

L'estrazione del DNA e' un passaggio di routine in molte procedure biotecnologiche: i clonaggi genici, la mappatura genica, il sequenziamento del DNA, ed il DNA fingerprinting richiedono tutti che il DNA sia estratto ed isolato dalle sorgenti cellulari e tissutali. Con questa attivita', gli studenti possono farsi un'idea della semplicita' con cui il DNA possa essere isolato per essere utilizzato in ricerche che ne prevedono la manipolazione.

A chi e' rivolto

Questo laboratorio e' adatto a studenti dalle medie inferiori fino all'universita', come prima introduzione al DNA o come veloce, facile, e pratico accompagnamento ai corsi gia' esistenti sul DNA. Anche studenti che hanno precedentemente estratto il DNA da cipolle o fegato troveranno l'estrazione del loro DNA molto piu' interessante ed eccitante.

Il manuale di istruzioni include contenuti sia per istruzioni avanzate (scuola media superiore fino all'universita') che per istruzioni di base (scuola media inferiore). A seconda delle necessita' dei tuoi studenti, puoi scegliere attivita' aggiuntive o materiale introduttivo.

Un manuale dello studente completo viene fornito per entrambi i livelli di istruzione.

Inserimento del programma

L'attività di questo laboratorio può essere effettuata a qualsiasi punto di un corso di biologia durante l'anno, ma è particolarmente utile quando vengono discussi i seguenti argomenti:

- Biomolecole
- Struttura cellulare
- Mitosi e meiosi
- Genetica
- Tecnologia del DNA ricombinante

Conoscenze di base dello studente raccomandate

Gli studenti della scuola superiore dovrebbero avere una comprensione generale della struttura e funzione del DNA prima di iniziare questa attività. Nessuna conoscenza della struttura o funzione del DNA è attesa per gli studenti della scuola media.

Tempo delle attività

L'attività di questo laboratorio può essere effettuata facilmente in una lezione di circa 50 minuti ma può essere prolungata per includere attività aggiuntive.

Lezione 1 Introduzione e materiale di partenza

Lezione 2 Isolamento delle cellule della parete boccale, estrazione e precipitazione del DNA

Lezione 3 Preparazione della collana di DNA (opzionale)

Sicurezza

Mangiare, bere, fumare, ed applicare cosmetici non è consentito nell'area di lavoro. Indossare occhiali protettivi e guanti è fortemente raccomandato. Gli studenti dovrebbero lavare le mani con sapone prima e dopo questo esercizio. Se qualcuna delle soluzioni dovesse andare negli occhi di uno studente, sciacquare con acqua per 15 minuti.

La chiave del successo

La raccolta di un gran numero di cellule è critica per il successo. Per i migliori risultati, assicurarsi che gli studenti impieghino la quantità di tempo raccomandata per raccogliere e trasferire con cura le cellule della parete boccale.

Misura dei volumi

Questo kit è stato sviluppato per poter essere utilizzato nelle classi con il minimo equipaggiamento di laboratorio ed una limitata conoscenza di tecniche scientifiche. Micropipette non sono richieste ma possono essere utilizzate per il trasferimento delle soluzioni.

Concetti fondamentali e preliminari per il livello base

Cos'è il DNA e cosa fa?

L'acido desossiribonucleico (DNA) è una molecola presente in tutte le cose viventi, inclusi batteri, piante ed animali. Il DNA porta l'informazione genetica che viene ereditata, o trasmessa dai genitori alla prole. Talvolta descritto come "progetto" biologico in quanto responsabile di tutte le caratteristiche fisiche dell'individuo come i capelli gli occhi, il colore della pelle, l'altezza, i lineamenti del viso, il tipo di sangue, e moltissimi altri. Il tuo progetto del DNA è una combinazione del DNA materno (dal suo uovo) e di quello paterno (dal suo sperma) avvenuta durante il concepimento.

Il DNA contiene 4 unità chimiche, riportate con la prima lettera dei loro nomi: A (adenina), G (guanina), T (timina), e C (citosina). Queste 4 lettere costituiscono il codice per l'informazione genetica. Le lettere del codice del DNA funzionano come lettere del nostro alfabeto. Le 26 lettere nell'alfabeto inglese costituiscono le parole, che possono essere combinate in infiniti modi per creare messaggi ed informazioni. Allo stesso modo, le 4 lettere chimiche del DNA sono organizzate per creare messaggi che possono essere compresi dalle cellule, chiamati geni. Questi geni contengono l'informazione per costruire le proteine, che sono la base per quasi tutte le strutture e funzioni cellulari.

La sequenza del tuo DNA è il particolare arrangiamento delle lettere chimiche all'interno della raccolta completa del DNA, o genoma. I ricercatori hanno determinato che le sequenze del DNA umano sono identiche al 99.9%. È meno dello 0.1% di variazione di sequenza da individuo ad individuo a renderci unici.

Dove si trova il DNA?

Con soltanto poche eccezioni, il DNA si trova praticamente all'interno di ogni cellula di un organismo. Nelle nostre cellule, un compartimento cellulare chiamato nucleo contiene il DNA. Ogni volta che una cellula si divide (per crescere, ripararsi, o riprodursi) il DNA all'interno del nucleo cellulare viene copiato ed avvolto strettamente nei cromosomi. Il progetto genetico umano è organizzato in 46 cromosomi, i quali contengono approssimativamente 40000 geni che forniscono le istruzioni per la costruzione del corpo umano.

A cosa somiglia il DNA?

A livello molecolare, il DNA assomiglia ad una scala a forma di spirale. La scala contiene due filamenti di DNA, con appaiate le lettere chimiche A, G, T, e C a formare i pioli. Questa struttura è chiamata doppia elica del DNA perché la spirale, o forma ad elica è costituita dai due filamenti di DNA. Ogni filamento di DNA è molto lungo e sottile ed è avvolto molto strettamente per permettere al DNA di alloggiare all'interno del nucleo. Se tutti i 46 cromosomi di una cellula umana fossero svolti e disposti testa-coda, il DNA sarebbe lungo 2 metri — ma spesso solo 2 nanometri (2 miliardesimi di metro).

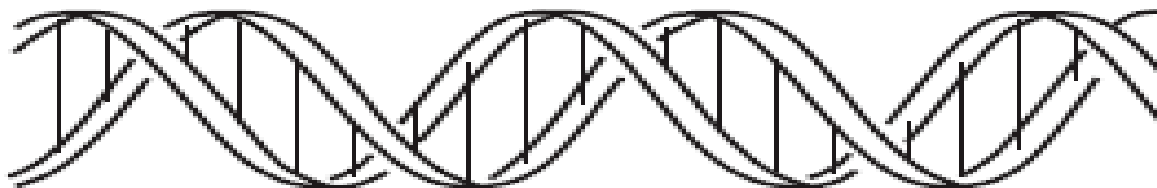


Fig. 2. Una rappresentazione schematica del DNA (acido desossiribonucleico). Il DNA è come una lunga molecola a catena che conserva l'informazione genetica.

Come è possibile rendere visibile il DNA?

Possiamo vedere il nostro DNA raccogliendo le cellule, rompendole e concentrando il DNA proveniente da tutte

le cellule insieme. Basta pensare alle lunghe e sottili molecole di DNA come a sottili fili bianchi. Se i fili fossero tesi lungo una stanza sarebbero difficili da vedere ma ammassati tutti insieme sul pavimento sarebbero visibili. Questa attività di laboratorio utilizza un detergente e degli enzimi per rompere le cellule raccolte dalla parete interna delle guance degli studenti e rilasciare il DNA. Sali ed alcool freddo vengono quindi aggiunti per precipitare il DNA in una massa sufficientemente grande da poter essere visibile.

Concetti fondamentali e preliminari per il livello avanzato

Applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante

Questa attivita' di laboratorio puo' essere integrata nelle classi che affrontano la struttura e funzione del DNA e puo' essere utilizzata per dare agli studenti una semplice e pratica esperienza con il loro DNA. Essa diventa piu' significativa se gli studenti comprendono che l'estrazione del DNA e' la prima tappa di molte applicazioni biotecnologiche, come:

Clonaggio

Clonare significa creare molte copie di un frammento di DNA o genoma. Un gene difettoso che causa una malattia puo' essere clonato per essere sequenziato ed analizzato al fine di trovare una cura. Un gene codificante una proteina intera o un segmento puo' essere clonato in modo tale da essere inserito all'interno di un altro organismo (vedere sotto "Trasferimento Genico"). Allo stesso modo, un intero genoma puo' essere clonato inserendolo all'interno dei nuclei cellulari che sono capaci di svilupparsi in interi organismi.

Trasferimento Genico: Organismi Geneticamente Modificati (OGM)

Per produrre quantita' utili di un'importante proteina, come per esempio quella della coagulazione del sangue umano, il gene che codifica per la proteina viene isolato e trasferito all'interno delle cellule le quali possono essere cresciute velocemente ed in grande quantita'. Queste "fabbriche" cellulari possono essere batteri, lieviti, cellule di piante o animali.

Talvolta un mammifero viene utilizzato per produrre la proteina desiderata. Un gene che codifica per una proteina utile puo' essere inserito in un uovo di mucca fertilizzato. La mucca geneticamente modificata produrra' la proteina desiderata nel suo latte, dal quale la proteina stessa puo' essere estratta.

Le colture agricole ora contengono geni provenienti da altri organismi. Per esempio, alcune piante contengono un gene che codifica per una proteina capace di uccidere i bruchi. Altre piante contengono geni che le rendono resistenti agli erbicidi permettendo agli agricoltori di trattare un campo intero con l'erbicida, uccidere le erbacce ma permettere alla pianta di sopravvivere.

Profilatura del DNA

Utilizzando una tecnica chiamata "polymerase chain reaction" (PCR), i ricercatori possono studiare regioni specifiche dei cromosomi in cui le sequenze di DNA degli individui sono differenti, ed amplificarle, o farne molte copie (cioe' creare un numero sufficiente di queste sequenze per manipolarle ed analizzarle). Utilizzando l'elettroforesi su gel, le differenze tra gli individui possono essere messe in evidenza come una combinazione di bande simile ad un codice a barre. Questa tecnica puo' essere utilizzata per risolvere crimini, nei test di paternita', ed anche per determinare le relazioni evoluzionistiche tra organismi.

Estrazione e precipitazione del DNA: come funziona?

Gli studenti inizieranno questa attivita' raschiando le cellule dalla parete boccale e mettendole in una provetta contenente il tampone di lisi. Il tampone di lisi contiene un detergente capace di rompere la membrana cellulare fosfolipidica e la membrana nucleare, rilasciando pertanto il DNA in soluzione. La soluzione contiene anche un agente tamponante per mantenere il pH della soluzione in modo tale da preservare la stabilita' del DNA.

Una proteasi, un enzima che digerisce le proteine, viene aggiunto per rimuovere le proteine legate al DNA e distruggere gli enzimi cellulari che digerirebbero il DNA. Questo assicura l'ottenimento massimo di resa del DNA intatto estratto. L'estratto cellulare contenente la proteasi viene incubato a 50°C, la temperatura ottimale per l'attivita' della proteasi.

Il DNA e gli altri componenti cellulari, come i grassi, gli zuccheri, e le proteine, vengono disciolti nel tampone di lisi. Il DNA ha una carica elettrica negativa dovuta ai gruppi fosfato della struttura portante del DNA, e la carica elettrica lo rende solubile. Quando un sale viene aggiunto al campione, gli ioni sodio del sale carichi positivamente sono attratti dalle cariche negative del DNA, e neutralizzano la carica elettrica del DNA. Questo

permette alle molecole di DNA di unirsi invece che respingersi l'un l'altra. L'aggiunta di alcool freddo precipita il DNA in quanto insolubile in presenza di un'alta concentrazione salina e di alcool. Il DNA precipitato incomincia ad essere visibile come fini filamenti bianchi al limite dello strato alcoolico, mentre le altre sostanze cellulari rimangono in soluzione.

Guida al laboratorio per l'insegnante

Questa sessione presenta una panoramica sullo svolgimento della lezione, la preparazione preliminare, l'allestimento della postazione di lavoro degli studenti, e le tecniche ed i concetti da evidenziare.

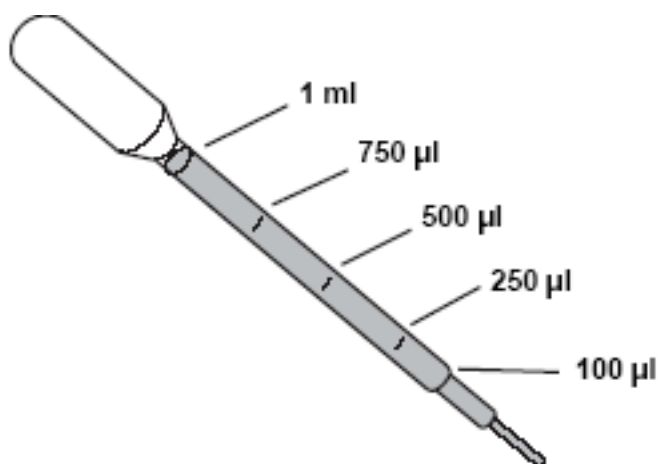
Tempi

1–2 giorni	Lezione 1	Materiale introduttivo preliminare Facoltativo: dimostrazione simulata della estrazione del DNA — raccomandata per gli studenti delle medie inferiori. Vedere le attività aggiuntive alla fine del manuale.
45 minuti	Lezione 2	Isolamento cellule della parete guancia, estrazione del DNA, precipitazione
30–45 minuti	Lezione 3	Facoltativo: preparazione della collana di DNA

Preparazione preliminare dell'insegnante (Pre-laboratorio)

Misura dei volumi

Il kit contiene pipette monouso graduate che verranno utilizzate per le misure dei liquidi. Il diagramma sotto mostra le tacche sulla pipetta corrispondenti ai volumi che verranno misurati. Possono anche essere utilizzate micropipette digitali.



- Tenere l'alcool (isopropanolo o etanolo) nel freezer almeno 1 ora prima di iniziare questo laboratorio.
- Aprire la busta contenente la proteasi in polvere ed il sale (**Prot**).
- Trasferire la polvere in una provetta da 15 ml. Aggiungere 15 ml di acqua alla soluzione **Prot**. La comune acqua in bottiglia da bere funziona bene; l'acqua distillata da laboratorio è comunque utilizzabile. Una volta che la soluzione **Prot** è risospesa può essere conservata fino ad una settimana in frigorifero a 4°. Se il kit viene utilizzato per diversi gruppi di studenti per alcune settimane si raccomanda di pesarne una aliquota da utilizzare subito, e risospingere il resto della polvere successivamente. La proteasi va reidratata ad una concentrazione di 100mg/ml.
- Aliquotare 1.25 ml della soluzione **Prot** reidratata in otto microprovette rosa come descritto di seguito.

Preparazione delle aliquote delle soluzioni per ogni postazione di lavoro (4 studenti/postazione)

- Per ogni studente, dispensare 3 ml di acqua in provette da 15 ml (fino a 4 provette per postazione). Qualsiasi tipo di acqua da bere può essere utilizzata
- Dispensare 1,25 ml della soluzione **Prot** reidratata in nove provette rosa e riportare l'indicazione **Prot**.
- Dispensare 10 ml di tampone di lisi in 9 provette da 15 ml. Riportare l'indicazione **tampone di lisi**.
- Posizionare 4 provette da 15 ml di acqua e una provetta di tampone di lisi in un beaker o in un porta provette e una microprovetta rosa con l'indicazione **Prot** in un portaprovette per ogni postazione di lavoro.

Nota: Alcuni utilizzatori possono trovare difficile raccogliere la soluzione di lavaggio boccale in provette da 15 ml. In alternativa è possibile utilizzare un bicchierino di plastica monouso per aliquotare l'acqua e raccogliere il lavaggio boccale.

Estrazione e precipitazione del DNA

Allestimento della postazione di lavoro

I materiali in questo kit sono sufficienti per 36 studenti.

Postazione dell'insegnante (Area comune)

Bagno d'acqua a 50°C con beaker o portaprovette per l'alloggiamento di 36 provette da 15ml.
Bottiglia ghiacciata di isopropanolo al 91% o etanolo al 95% in ghiaccio

Postazione di lavoro degli studenti (4 studenti a postazione)

Numero richiesto

Provette da 15 ml, ognuna contenente 3 ml di acqua	4
Microprovetta rosa marcata "prot", contenente 1.25ml di soluzione di proteasi e sale	1
Provetta da 15ml marcata "tampone di lisi", contenente 10ml di tampone di lisi	1
Pipette monouso di plastica	6
Portaprovette da microprovette	1
Pennarelli indelebili	1
Bicchierino di plastica o beaker per l'alloggiamento delle provette da 15ml e la raccolta dei rifiuti	1

Nota per l'insegnante

Una raccolta consistente di cellule è critica per il successo dell'esperimento. Per i migliori risultati, assicurarsi che gli studenti spendano il tempo raccomandato per raccogliere le cellule della bocca.

Guida rapida per l'estrazione e la precipitazione del DNA

1. Procurarsi una provetta da 15ml contenente 3 ml di acqua dall'insegnante, e marcarla con le proprie iniziali usando il pennarello indelebile.



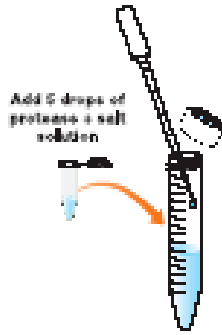
2. Delicatamente masticare l'interno delle guance per 30 secondi; NON serve far sanguinare!
3. Mettere l'acqua contenuta nelle provette da 15ml in bocca, e sciacquare l'interno della bocca per 30 secondi



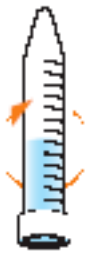
4. Raccogliere il risciacquo boccale in una provetta da 15ml
5. Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 2 ml di **tampone di lisi** alla provetta contenente le cellule. Chiudere e miscelare per inversione 5 volte (Non agitare!) Osserva la provetta: non noti niente? Prendere nota delle osservazioni



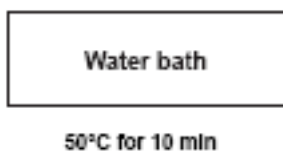
6. Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 5 gocce di proteasi prelevata dalla provetta "**prot**" alla provetta contenente l'estratto cellulare.



7. Chiedere e miscelare per inversione un pò di volte.



8. Mettere la provetta in un portaprovette o in un beaker nel bagno d'acqua ed incubare a 50°C per 10 minuti.



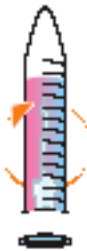
9. Togliere dal bagno d'acqua le provette
10. Procurarsi l'etanolo freddo. Inclinare la provetta di 45°, riempire la provetta con alcool freddo ed aggiungerne circa 10ml alla provetta. Utilizzando le pipette di plastica monouso graduate saranno necessarie pipettate multiple per aggiungere 10 ml totali



11. Chiudere la provetta e lasciarla riposare per 5 minuti. Annotare le eventuali osservazioni



12. Dopo 5 minuti invertire lentamente la provetta per 5 volte per favorire la precipitazione del DNA che ha cominciato ad aggregarsi
13. Con una pipetta monouso, trasferire con cura il DNA precipitato assieme a 750 μ l – 1ml di soluzione alcolica in una piccola ampolla di vetro fornita con il kit collana di DNA (166-2200EDU). In alternativa, conservare il DNA in una provetta fornita con il kit.



Manuale dello studente: Istruzioni di base

Estrazione di DNA dalle cellule della guancia

Cattura la tua essenza genetica in una bottiglia

Contenuti

- Lezione 1** Materiale introduttivo, laboratorio simulato (facoltativo)
- Lezione 2** Isolamento delle cellule della guancia, estrazione e precipitazione del DNA
- Lezione 3** Preparazione della collana di DNA (facoltativo)

Manuale dello Studente: Istruzioni di Base

Estrazione di DNA dalle cellule della guancia

Cattura la tua essenza genetica in una bottiglia

Introduzione

Cos'è il DNA e cosa fa?

L'acido desossiribonucleico (DNA) è una molecola presente in tutte le cose viventi, inclusi batteri, piante ed animali. Il DNA porta l'informazione genetica che è ereditata, o trasmessa dai genitori alla progenie. È responsabile del colore dei capelli, degli occhi e della pelle, dei lineamenti del viso, della carnagione, dell'altezza, del tipo di sangue, e di qualsiasi altra cosa che rende l'individuo unico. Ma contiene anche tutte le informazioni riguardanti il corpo che sono in comune agli altri esseri umani. In altre parole, il tuo DNA è come un progetto di sviluppo e dell'intera crescita fisica. Il tuo progetto del DNA è una combinazione di meta' DNA materno e meta' DNA paterno ed è il motivo per cui tu hai alcune caratteristiche da ciascuno dei tuoi genitori.

Il DNA contiene 4 unità chimiche, caratterizzate dalla prima lettera dei loro nomi: A (adenina), G (guanina), T (timina), e C (citosina). Queste 4 "lettere" del DNA costituiscono il codice per l'informazione genetica. Le lettere del codice del DNA sono simili alle lettere del nostro alfabeto. Le 26 lettere dell'alfabeto inglese costituiscono le parole, che possono essere combinate in infiniti modi per creare messaggi ed informazioni. Allo stesso modo, le 4 lettere chimiche del DNA sono organizzate per creare messaggi, chiamati geni, che possono essere compresi dalle cellule. Questi geni contengono l'informazione per costruire le proteine, responsabili per quasi la totalità delle strutture e funzioni del corpo. Un gene è come una ricetta, poiché contiene tutte le informazioni necessarie per costruire una proteina.

La tua sequenza di DNA è il particolare arrangiamento o ordine delle lettere chimiche all'interno della raccolta completa del DNA, o **genoma**. I ricercatori hanno scoperto che le sequenze di DNA umano sono identiche al 99.9%. Sono le variazioni di sequenza minori dello 0.1% in ogni individuo a renderci unici. In altre parole, ciò che vi distingue dal vostro compagno di classe è una differenza occasionale nelle lettere dei genomi.

Dove si trova il DNA?

Le unità di base del corpo di un organismo sono le cellule — esse costituiscono tutti i vostri tessuti ed organi (per esempio, i muscoli, il cervello, il sistema gastro-enterico, la pelle, le ghiandole, etc.). Le cellule sono compartimenti con membrane, fatte di proteine e lipidi (grassi), che le tengono separate da altre cellule. All'interno delle cellule ci sono poi compartimenti con funzioni specializzate. Un compartimento, chiamato **nucleo**, è come il quartier generale di controllo e contiene le molecole di DNA, che sono le istruzioni originali per le funzioni della cellula. Il DNA è organizzato in 46 strutture strettamente avvolte chiamate cromosomi. Ogni volta che una cellula si divide produce due nuove cellule identiche — per la crescita, la riparazione, o la riproduzione — i cromosomi vengono copiati, assicurando che le nuove cellule ricevano una copia completa del progetto genetico per l'organismo.

A cosa somiglia il DNA?

A livello molecolare, il DNA assomiglia ad una scala a chiocciola. La scala contiene due filamenti di DNA, con le lettere chimiche A, G, T e C accoppiate tra loro a formare i pioli. Questa struttura è chiamata DNA a doppia elica per la forma a spirale, costituita dai due filamenti di DNA. Ogni filamento di DNA è molto lungo e sottile ed è avvolto molto strettamente per permettergli di entrare nel nucleo cellulare. Se tutti i 46 cromosomi umani di una cellula fossero distesi ed allineati testa-coda, essi costituirebbero un filamento di DNA lungo 2 metri e largo solo 2 nanometri (2 miliardesimi di metro)!

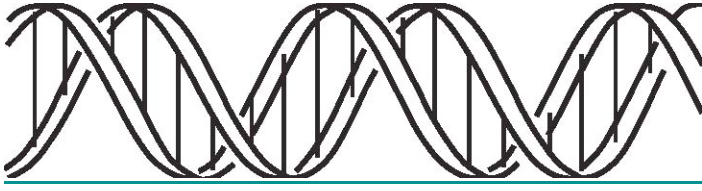


Fig. 2. Una rappresentazione schematica de DNA (acido desossiribonucleico). Il DNA e' una lunga molecola a catena la quale conserva l'informazione genetica.

Che cosa rende il DNA visibile?

Step 1: Raccolta delle cellule

Per vedere il tuo DNA, raccogli le cellule, rompile e concentra il DNA di tutte le cellule raccolte. Puoi raccogliere migliaia di cellule dalla parete interna della bocca solo raschiandola delicatamente ed accuratamente con uno spazzolino. Il tipo di cellule che rivestono la bocca si dividono molto spesso, cosicche' nuove cellule rimpiazzano le vecchie continuamente. Infatti, queste cellule si staccano e vengono rimpiazzate ogni volta che mastichi e mangi del cibo.

Domanda chiave:

1. Come puoi verificare se hai raccolto veramente delle cellule dalla tua parete boccale? Quale equipaggiamento di laboratorio potresti utilizzare?

Step 2: Lisi delle cellule

Una volta raccolte, le cellule devono essere rotte per rilasciare il DNA. I detergenti sciolgono le membrane delle cellule, proprio come i detergenti per i piatti sciolgono grassi e proteine da una padella sporca di grasso, in quanto le membrane cellulari e nucleari sono composte di grassi e proteine. La dissoluzione delle membrane determina il rilascio del DNA. Il processo di rottura delle cellule e' chiamato lisi, e la soluzione contenente il detergente e' chiamata tampone di lisi.

Domande chiave:

2. Nel lavaggio dei piatti, cosa funziona meglio, acqua calda o fredda? Cosa pensi possa aiutare il detergente a rompere la cellula, temperature alte o basse?
3. Pensi che il tuo DNA sia visibile dopo la rottura delle cellule? Perche' si e perche' no?

Step 3: Rimozione delle proteine

Il DNA e' impaccato strettamente intorno alle proteine. Come le rocchette per i fili, queste proteine tengono il DNA strettamente avvolto ed organizzato in modo tale che non si ingarbugli all'interno del nucleo. Per vedere il DNA, e' utile rimuovere le proteine in modo tale che il DNA possa prima stendersi ed espandersi, e quindi raccogliersi in un ammasso assieme al DNA di tutte le altre cellule. Incuberai con proteasi, che rompe le proteine cosicche' non siano piu' legate al DNA. La proteasi e' un enzima, o una macchina proteica, che lavora in condizioni ideali a 50°C, la temperatura dell'acqua leggermente riscaldata. La proteasi degrada le proteine associate al DNA ed aiuta la digestione dei resti della lisi cellulare o delle proteine delle membrane nucleari.

Domanda chiave:

4. Dove pensi di trovare le proteasi nel tuo corpo? Suggerimento: Le proteine che mangi dove vengono degradate?

Steps 4 e 5: Concentrazione del DNA

I filamenti di DNA sono cosi' sottili che non e' possibile vederli quando sono sciolti in soluzione. Pensa ai lunghi e sottili filamenti di DNA come un fine filo bianco. Se un lungo pezzo di filo fosse tirato lungo una stanza, sarebbe difficile vederlo. Per rendere il filamento piu' visibile, potresti raggomitolarlo tutto insieme ed ammassarlo sul

pavimento. In questo esperimento di laboratorio, utilizzerai sale ed alcool freddo per precipitare il DNA. Sale ed alcool freddo creano una condizione in cui il DNA non puo' stare in soluzione, si agglutina e diventa una massa solida visibile.

Domanda chiave:

5. Hai mai provato ad aggiungere zucchero al tè freddo? Lo zucchero si scioglie facilmente? Che differenza c'è nello sciogliere la stessa quantità di zucchero nella stessa quantità di tè caldo?

Che aspetto ha il DNA precipitato?

Come il sale o lo zucchero, il DNA è trasparente quando sciolto in un liquido, ma è bianco quando precipita in una quantità sufficiente per essere visibile. Non appena precipita, appare come fini filamenti bianchi sospesi in un liquido. I filamenti sono fragili — come spaghetti molto sottili, possono rompersi se non trattati delicatamente. Inoltre, se una massa di DNA viene tirata fuori dal suo liquido di sospensione, questa si raggrumerà, come gli spaghetti si raggruppano se tirati fuori dal loro liquido.

Estrazione del DNA dalle cellule della guancia: Istruzioni di Laboratorio

Cattura la tua Essenza Genetica in una Bottiglia!

Postazione dell'insegnante (Area comune)

Bagno d'acqua a 50°C

Bottiglia ghiacciata di isopropanolo al 91% o etanolo al 95% in ghiaccio

Postazione di lavoro degli studenti (4 studenti a postazione)

Numero richiesto

Provette da 15 ml, ognuna contenente 3 ml di acqua	4
Microprovetta rosa marcata "prot", contenente 1.25ml di soluzione di proteasi e sale	1
Provetta da 15ml marcata "tampone di lisi", contenente 10ml di tampone di lisi	1
Pipette monouso di plastica	6
Portaprovette da microprovette	1
Pennarelli indelebili	1
Bicchierino di plastica o beaker per le provette da 15ml e per la raccolta dei rifiuti	1

Procedura di estrazione e precipitazione del DNA

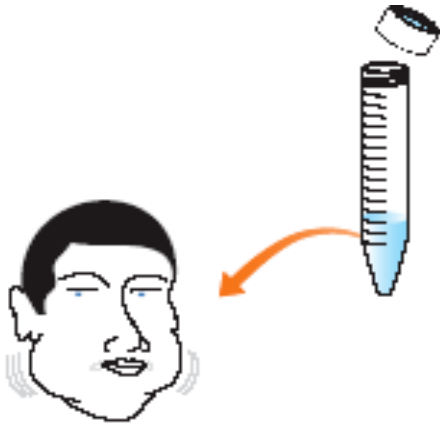
Fase 1 e 2: raccolta e rottura delle cellule

Per raccogliere il maggior numero di cellule possibile, è necessario masticare delicatamente l'interno della bocca per 30 secondi e quindi fare un risciacquo boccale con una piccola aliquota di acqua. La raccolta di una gran quantità di cellule è critica per il successo dell'esperimento. Per i migliori risultati, assicurarsi di aver speso il tempo raccomandato per la raccolta delle cellule.

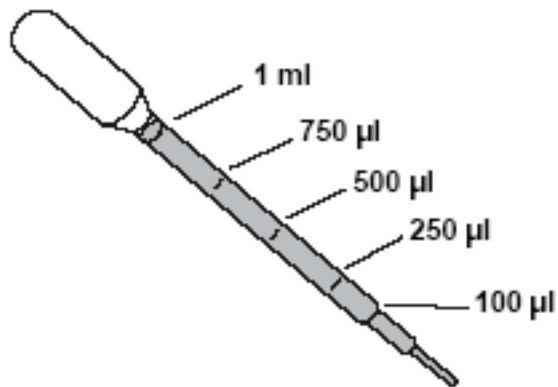
1. Procurarsi una provetta da 15ml contenente 3 ml di acqua dall'insegnante, e marcarla con le proprie iniziali usando il pennarello indelebile.



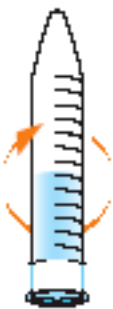
2. Delicatamente masticare l'interno delle guance per 30 secondi; NON serve far sanguinare!
3. Mettere l'acqua contenuta nelle provette da 15ml in bocca, e sciacquare l'interno della bocca per 30 secondi. Non ingoiare l'acqua!



4. Raccogliere il risciacquo boccale in una provetta da 15ml
5. Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 2 ml di **tampone di lisi** alla provetta contenente le cellule.

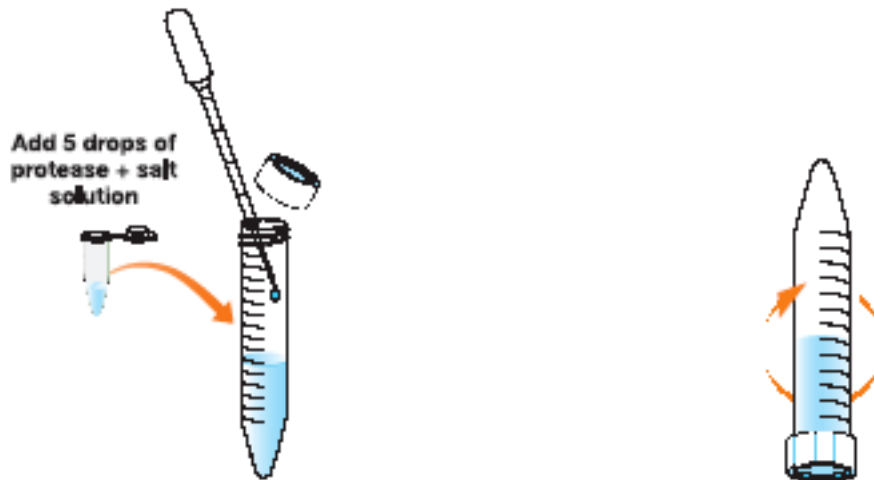


6. Chiudere e miscelare per inversione 5 volte per lisare le cellule (Non agitare!)

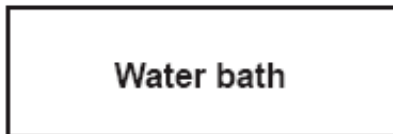


Fase 3: rimozione delle proteine

7. Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 5 gocce di proteasi prelevata dalla provetta "**prot**" alla provetta contenente l'estratto cellulare.
8. Chiudere e miscelare per inversione 5 volte.



9. Mettere la provetta in un portaprovette o in un beaker nel bagno d'acqua ed incubare a 50°C per 10 minuti.



50°C for 10 min

Fase 4 e 5: rendere il DNA visibile

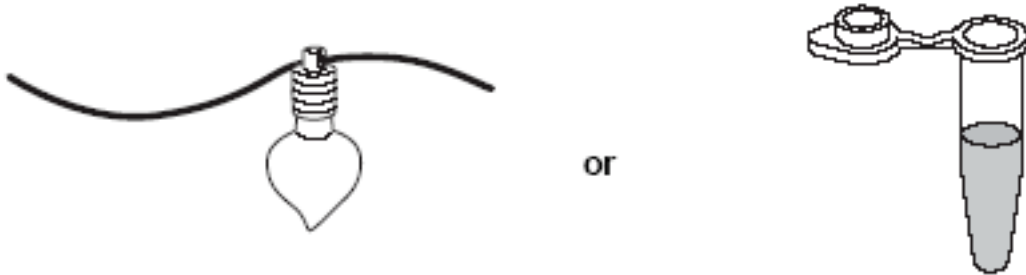
- 10 Procurarsi l'etanolo freddo. Inclinare la provetta di 45°, riempire la provetta con alcool freddo ed aggiungere circa 10ml alla provetta. Utilizzando le provette di plastica monouso graduate saranno necessarie pipettate multiple per aggiungere 10 ml totali



- 11 Chiudere la provetta e lasciarla riposare per 5 minuti a temperatura ambiente
- 12 Dopo 5 minuti osservare il contenuto della provetta specialmente nella zona in cui alcool ed estratto cellulare entrano in contatto. Non noti niente? Prendi nota delle tue osservazioni e confronta il tuo campione con quello dei compagni di classe.
- 13 Con il tappo della provetta ben chiuso, inverti lentamente la provetta per 5 volte. Fai attenzione a del materiale filamentoso e bianco che sta per formarsi. **Questo è il tuo DNA!**



-
- 14 Se preparerete una collana di DNA, la tua insegnante ti darà un'ampolla di vetro. Con una pipetta monouso, trasferire con cura il DNA precipitato assieme a $750\mu\text{l}$ – 1ml di soluzione alcolica nella piccola ampolla di vetro. La tua insegnante ti aiuterà a sigillare l'ampolla e a completare la collana.
 - 15 Se non costruirete la collana, puoi trasferire e conservare il DNA in una microprovetta con tappo. Con una pipetta monouso di plastica, trasferire delicatamente il DNA precipitato assieme e circa 1 ml di soluzione alcolica nella microprovetta. Chiudi bene la provetta e stupisci i tuoi amici con il tuo DNA!



Manuale dello studente: istruzioni avanzate

Estrazione di DNA dalle cellule della guancia

Cattura la tua essenza genetica in una bottiglia!

Contenuti

- Lezione 1** Materiale introduttivo
- Lezione 2** Isolamento cellule, estrazione e precipitazione del DNA
- Lezione 3** Preparazione collana di DNA (facoltativo)

Manuale dello Studente: Istruzioni Avanzate

Estrazione di DNA dalle cellule della guancia

Cattura la tua essenza genetica in una bottiglia!

Introduzione

L'acido desossiribonucleico (DNA) è una molecola presente in tutte le cose viventi, inclusi batteri, piante ed animali ed in quasi tutti i tipi cellulari. Il DNA è il portatore dell'informazione genetica ed è responsabile della determinazione delle caratteristiche dell'individuo: colore dei capelli, della pelle e degli occhi, lineamenti del viso, carnagione, altezza, tipo di sangue, e tutto ciò che rende un individuo unico. Esso porta l'informazione richiesta dalle cellule per eseguire le funzioni comuni a tutti i membri di una specie, o a tutte le cose viventi e pertanto è talvolta chiamato "progetto" biologico. Il tuo personale progetto è una combinazione di metà DNA materno (dal suo uovo) e metà DNA paterno (dal suo sperma) avvenuta durante il concepimento. Tutte le tue cellule contengono questo set completo di istruzioni.

Il DNA appare lo stesso quando viene estratto dalle cellule, ma è eccitante vedere il proprio DNA, sapendo che è veramente ciò che ci rende unici e vivi. In questa attività di laboratorio, estrarrai il tuo DNA — una sostanza che contiene il tuo "progetto" specifico — dalle tue cellule della guancia. Utilizzerai una facile e veloce procedura che i ricercatori correntemente utilizzano per estrarre il DNA da vari organismi.

Ogni giorno i ricercatori fanno nuove scoperte nello studiare l'informazione codificata dal DNA. La comprensione del DNA dà la possibilità di curare le malattie, la speranza per milioni di persone che soffrono di disordini e sindromi genetiche, di fabbricare migliori prodotti dalle sorgenti biologiche, ed anche forse la chiave per l'allungamento della vita. Stiamo incominciando a capire chi siamo ed il motivo per cui vale la pena di studiare il nostro materiale genetico.

Struttura del DNA

A livello molecolare, il DNA sembra una scala a chiocciola. Due lunghe molecole sono allineate l'una con l'altra, ed i pioli sono formati da appaiamenti di unità chimiche chiamate **basi**. Questa struttura è chiamata **doppia elica** avendo una forma a spirale costituita da due filamenti. Le basi funzionano come lettere in un codice, e sono note come **A**, **G**, **T**, e **C** (abbreviazioni del loro nome completo, adenina, guanina, timina, e citosina, rispettivamente). Ogni base è connessa ad uno zucchero e ad un gruppo fosfato e lo zucchero e gruppo fosfato formano la struttura portante della scala. (Un **nucleotide** è una unità che consiste di una base, uno zucchero, ed un fosfato.) I ricercatori hanno scoperto che **A** si appaia sempre con **T**, e **G** si appaia sempre con **C** in un doppio filamento di DNA.



Fig. 3. Una rappresentazione schematica del DNA (acido desossiribonucleico). Il DNA è una lunga molecola a forma di catena contenente l'informazione genetica.

Le 4 lettere chimiche del DNA sono organizzate per creare messaggi che possono essere compresi dalle cellule, chiamati **geni**. Questi geni contengono l'informazione per costruire le **proteine**, che sono la base per quasi tutte le strutture e funzioni del corpo. Ogni vostra cellula contiene parecchi miliardi di lettere di DNA "testo".

Una sequenza di DNA e' un particolare arrangiamento o ordine delle basi lungo la molecola di DNA. Le sequenze del DNA umano sono identiche tra loro al 99.9%. Sono variazioni di sequenza minori dello 0.1% a renderci unici. In altre parole, cio' che ti distingue dal tuo compagno di classe e' una differenza occasionale nella sequenza delle basi nei tuoi geni.

Il genoma, i cromosomi, i geni, il DNA, l'RNA, e le proteine...Che collegamento c'e'?

Il DNA si trova nel nucleo di ogni cellula del corpo umano, con la sola eccezione dei globuli rossi maturi del sangue. Il DNA e' organizzato in strutture chiamate **cromosomi**, in cui i lunghi e sottili filamenti di DNA sono strettamente avvolti intorno a proteine. Ogni volta che una cellula si divide — per crescere, ripararsi, o riprodursi — i cromosomi si replicano con un processo altamente organizzato chiamato mitosi. I 46 cromosomi umani sono analoghi a 46 volumi di una enciclopedia che collettivamente contiene tutta l'informazione nel nostro **genoma**.

Un **gene** e' una sezione di DNA contenente l'informazione per fare una proteina; e' come una ricetta scritta che specifica la composizione e l'ordine di assemblaggio della proteina. Il genoma umano contiene circa 40,000 geni. Il genoma e' analogo ad una (gigantesca) collezione di libri di cucina (ricorda, ci sono 46 "volumi" nell'intera collezione). Non tutte le ricette in un libro di cucina sono preparate in una volta per costituire un pasto, e nemmeno tutti i geni all'interno di un genoma vengono utilizzati in ogni cellula. Questa espressione selettiva dei geni a seconda del tipo cellulare determina le caratteristiche dei differenti tipi cellulari all'interno del corpo. In pratica, tutte le cellule contengono gli stessi libri (cromosomi), ma differenti cellule leggono differenti ricette (geni) dai libri.

Sebbene i geni specifichino le proteine che sono fatte dalle cellule, il DNA non e' lo stampo diretto per la sintesi delle proteine. Gli stampi per la sintesi delle proteine sono le molecole di RNA (acido ribonucleico) chiamate RNA messaggeri (mRNA). Ogni mRNA e' semplicemente una copia della sequenza di DNA di un gene. Gli mRNA sono intermedi che portano l'informazione dal DNA del nucleo ai **ribosomi**, o fabbriche di proteine, localizzati nel citoplasma. I ribosomi decodificano l'informazione genetica e legano insieme gli aminoacidi per costruire la **proteina** codificata dal gene. Tutte le proteine prodotte in una cellula funzionano per dare alla cellula le sue caratteristiche.

Domande chiave:

1. Immagina che stai cercando di spiegare la differenza tra cromosomi, geni, e DNA a tuo fratello o sorella piu' piccoli di 2 anni. Scrivi la tua spiegazione in parole semplici e comprensibili.
2. Una cellula del fegato contiene gli stessi cromosomi di una cellula della guancia?
3. Se tu volessi isolare una copia di un gene che codifica per una proteina trovata nello stomaco, quel gene potrebbe essere localizzato nelle cellule della guancia? Spiega il motivo.

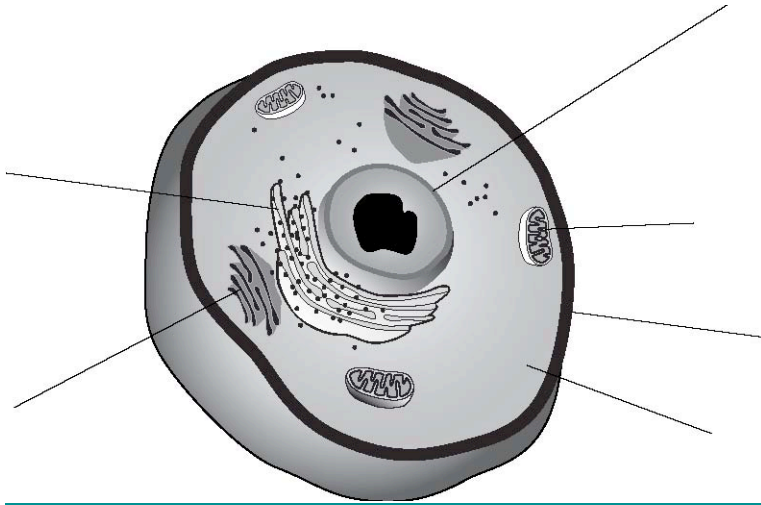
Come puo' il DNA essere isolato dalle cellule?

Step 1. Raccolta delle cellule

Il primo passaggio nell'isolamento del DNA e' la raccolta delle cellule. La parete boccale e' una buona fonte di cellule. Queste cellule si duplicano molto spesso e sono continuamente ricambiate, rendendole una fonte accessibile. Semplicemente raschiando l'interno della bocca delicatamente e ripetutamente con uno spazzolino e' possibile raccogliere una quantita' di cellule sufficiente a raccogliere il proprio DNA.

Domande chiave:

Ecco un'immagine schematica delle cellule della guancia.



4. Marca i compartimenti cellulari, incluse le membrane cellulari, il citoplasma, e il nucleo.
5. In che compartimento cellulare ti aspetti di trovare il DNA genomico?
6. Perché è necessario un intermedio come l' mRNA per copiare l'informazione dal DNA genomico per poterlo tradurre in proteine?
7. Quale pensi sia il primo passaggio nell'isolamento del DNA dalle tue cellule?

Step 2. Lisi cellulare e disgregazione del doppio strato fosfolipidico delle membrane

Se avessi ipotizzato che il primo passaggio dell'estrazione del DNA è la rottura delle cellule, avresti ragione! Il detergente scioglie le molecole lipidiche, e le membrane cellulari e nucleari sono principalmente costituite da lipidi (potresti aver già sentito parlare di membrane cellulari composte da un "doppio strato fosfolipidico"). Dopo aver raschiato le cellule dalla tua guancia, mettile in una soluzione contenente un detergente.

Domande chiave:

8. Una volta che le membrane si sono dissolte, il DNA viene rilasciato in soluzione ma ci sono molti altri tipi di molecole cellulari. Fai una lista di alcuni tipi di molecole oltre al DNA che ti aspetteresti di trovare in una cellula.
9. Quali metodi o agenti pensi possano essere utilizzati per rompere queste molecole indesiderate?

Step 3. 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).

Domande chiave:

10. Quali proteine possono essere associate con il DNA nella cellula?
11. La proteasi utilizzata in questa procedura funziona in condizioni ideali a 50°C. Ti aspetteresti che questo enzima fosse isolato da batteri della specie *E. coli*? Suggerimento: dove vive *E. coli*?

12. Preparati particolari vengono spesso utilizzati per intenerire pezzi duri di carne, come le bistecche. Sapendo che la bistecca è fatta di tessuto muscolare ricco di proteine proveniente dalle mucche, puoi immaginare una spiegazione per come gli inteneritori di carne funzionano?

Step 4. Rendere il DNA insolubile

Aggiungerai una soluzione salina al tuo campione, che renderà il DNA meno solubile nell'estratto cellulare. Il DNA ha una carica elettrica negativa dovuta ai gruppi fosfato della sua struttura portante. Quando il sale viene aggiunto, gli ioni sodio del sale carichi positivamente sono attratti dalle cariche negative del DNA, neutralizzandone le cariche elettriche. Questo permette alle molecole di DNA di aggregarsi invece che respingersi l'una con l'altra.

Step 5. Precipitazione del DNA con alcool freddo

Per separare il DNA dalle altre molecole nell'estratto cellulare, aggiungerai alcool freddo al tuo campione. Dopo l'aggiunta di alcool freddo, il DNA precipiterà in quanto meno solubile in alcool che in acqua. Più freddo è l'etanolo, meno solubile sarà il DNA in esso. Questo è simile alla solubilità dello zucchero nel tè (o in qualsiasi altra bevanda); lo zucchero si scioglie più facilmente nel tè caldo che nel tè freddo.

In presenza di alte concentrazioni di sale e di alcool freddo, il DNA che è stato rilasciato dalle cellule precipita e si aggrega fino al punto di poter essere visto ad occhio nudo! Le altre molecole, come gli aminoacidi ed i carboidrati, rimangono sciolte, in alcool ed acqua e non sono visibili. Sono necessari migliaia di filamenti di DNA per formare una fibra grande abbastanza da essere visibile. Ogni filamento avrà migliaia di geni in esso, così vedrai del materiale che contiene milioni di geni alla volta. Ricorda, tuttavia, che stai vedendo il DNA proveniente da molte migliaia di cellule tutte insieme.

Domande chiave:

13. Collega le affermazioni di sinistra con i passaggi di laboratorio sulla destra.

- | | |
|---------------------------------------|--|
| Raccogliere le cellule | A. Sfregare uno spazzolino contro l'interno della vostra guancia |
| Dissolvere le membrane cellulari | B. Aggiungere proteasi, incubare a 50°C |
| Precipitare il DNA | C. Miscelare in una soluzione di detergente |
| Degradare le proteine | D. Stratificare alcool freddo sull'estratto cellulare |
| Rendere il DNA meno solubile in acqua | E. Aggiungere sale |

Estrazione del DNA dalle cellule della guancia: istruzioni di laboratorio

Cattura la tua essenza genetica in una bottiglia

Allestimento della postazione di lavoro

Postazione dell'insegnante (Area comune)

Bagno d'acqua a 50°C.

Bottiglia ghiacciata di isopropanolo al 91% o etanolo al 95% in ghiaccio

Postazione di lavoro degli studenti (4 studenti a postazione)

Numero richiesto

Provette da 15 ml, ognuna contenente 3 ml di acqua	4
Microprovetta rosa marcata "prot", contenente 1.25ml di soluzione di proteasi e sale	1
Provetta da 15ml marcata "tampone di lisi", contenente 10ml di tampone di lisi	1
Pipette monouso di plastica	6
Portaprovette da microprovette	1
Pennarelli indelebili	1
Bicchierino di plastica o beaker per le provette da 15ml e per la raccolta dei rifiuti	1

Procedura di estrazione e precipitazione del DNA

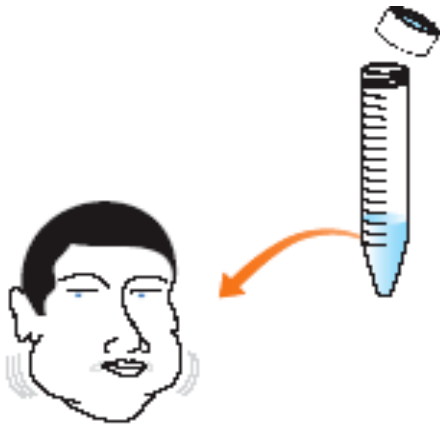
Fase 1 e 2: raccolta e rottura delle cellule

Per raccogliere il maggior numero di cellule possibile, è necessario masticare delicatamente l'interno della bocca per 30 secondi e quindi fare un risciacquo boccale con una piccola aliquota di acqua. La raccolta di una gran quantità di cellule è critica per il successo dell'esperimento. Per i migliori risultati, assicurarsi di aver speso il tempo raccomandato per la raccolta delle cellule.

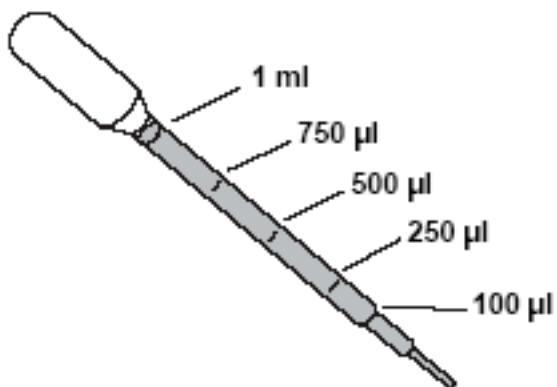
- Procurarsi una provetta da 15ml contenente 3 ml di acqua dall'insegnante, e marcarla con le proprie iniziali usando il pennarello indelebile.



- Delicatamente masticare l'interno delle guance per 30 secondi; NON serve far sanguinare!
- Mettere l'acqua contenuta nelle provette da 15ml in bocca, e sciacquare l'interno della bocca per 30 secondi. Non ingoiare l'acqua!



- Raccogliere il risciacquo boccale in una provetta da 15ml
- Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 2 ml di **tampone di lisi** alla provetta contenente le cellule.



- Chiudere e miscelare per inversione 5 volte per lisare le cellule (Non agitare!)

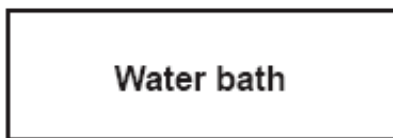


Fase 3: rimozione delle proteine

- Utilizzando una pipetta di plastica, aggiungere 5 gocce di proteasi prelevata dalla provetta “prot” alla provetta contenente l'estratto cellulare.
- Chiudere e miscelare per inversione 5 volte.



- Mettere la provetta in un portaprovette o in un beaker nel bagno d'acqua ed incubare a 50°C per 10 minuti.



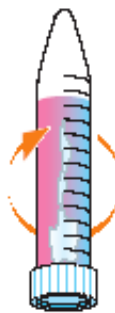
50°C for 10 min

Fase 4 e 5: rendere il DNA visibile

- Procurarsi l'etanolo freddo. Inclinare la provetta di 45°, riempire la provetta con alcool freddo ed aggiungere circa 10ml alla provetta. Utilizzando le provette di plastica monouso graduate saranno necessarie pipettate multiple per aggiungere 10 ml totali



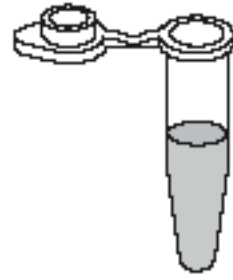
- Chiudere la provetta e lasciarla riposare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Dopo 5 minuti osservare il contenuto della provetta specialmente nella zona in cui alcool ed estratto cellulare entrano in contatto. Non noti niente? Prendi nota delle tue osservazioni e confronta il tuo campione con quello dei compagni di classe.
- Con il tappo della provetta ben chiuso, inverti lentamente la provetta per 5 volte. Fai attenzione a del materiale filamentoso e bianco che sta per formarsi. **Questo è il tuo DNA!**



- Se preparerete una collana di DNA, la tua insegnante ti darà un'ampolla di vetro. Con una pipetta monouso, trasferire con cura il DNA precipitato assieme a 750 μ l – 1ml di soluzione alcolica nella piccola ampolla di vetro. La tua insegnante ti aiuterà a sigillare l'ampolla e a completare la collana.
- Se non costruirete la collana, puoi trasferire e conservare il DNA in una microprovetta con tappo. Con una pipetta monouso di plastica, trasferire delicatamente il DNA precipitato assieme e circa 1 ml di soluzione alcolica nella microprovetta. Chiudi bene la provetta e stupisci i tuoi amici con il tuo DNA!



or



Attività aggiuntive

Dimostrazione simulata dell'estrazione del DNA

Per gli studenti delle scuole medie inferiori, si raccomanda una dimostrazione simulata della procedura di estrazione per aiutare gli studenti a visualizzare cosa accade a livello molecolare durante questo passaggio. E' un esercizio divertente che permette agli insegnanti di presentare i concetti necessari a rendere il laboratorio più eloquente. Per dimostrare il processo di isolamento del DNA dalle cellule della guancia, puoi creare il modello di una cellula utilizzando una palla di lattice trasparente e riempirla con componenti vari e stringhe a rappresentare le membrane, gli organelli, le proteine, e il DNA. Sottolinea che i detergenti sciolgono le membrane (rompendo il pallone), che le proteasi digeriscono le proteine (spezzettando qualche componente), e che sale ed alcool determinano la precipitazione ed aggregazione del DNA (ammassando le stringhe).

Osservazione microscopica e colorazione del nucleo delle cellule

Il colorante per DNA FastBlast™ può essere utilizzato come colorante del nucleo delle cellule della guancia. Le cariche positive delle molecole di Fast Blast si legano ai gruppi fosfato del DNA. L'utilizzo dello stesso colorante per visualizzare il DNA nel gel di agarosio così come nei nuclei cellulari può aiutare gli studenti a capire dove si trova il DNA nelle cellule eucariotiche.

Nota: Il colorante FastBlast™ non è tossico ma colora pelle e tessuti. Indossare guanti ed un camice da laboratorio quando si utilizza questa soluzione.

Preparazioni preliminari dell'insegnate

Scopo

Preparare una diluizione 1:50 del colorante FastBlast™ (e PBS 1X, se necessario)*

Materiali richiesti

- Colorante Fast Blast DNA 500X (numero di catalogo 166-0420EDU)
- Micropipetta da 200µl o pipetta in plastica monouso
- Puntali per micropipetta (se si utilizza una micropipetta)
- 5ml di soluzione salina isotonica (per esempio la soluzione salina per le lenti a contatto o PBS 1X)*

Procedura

Diluire il colorante per DNA Fast Blast prima di utilizzarlo per visualizzare i nuclei cellulari. Per preparare il colorante diluito, aggiungere 100µl di Fast Blast 500X a 4.9ml di soluzione salina isotonica.

Nota: una soluzione isotonica è necessaria per mantenere la giusta pressione osmotica attraverso la membrana cellulare.

* PBS può essere acquistato in soluzione concentrata 10X (numero di catalogo 166-2403EDU). Diluirlo 1X prima dell'uso.

Equipaggiamento ed accessori richiesti

- Microscopio
- Vetrini da microscopio
- Vetrini coprioggetto
- Pipette di plastica monouso
- Puntali per micropipetta
- Micropipetta da 20µl

Procedura

Raccolta delle cellule della guancia

Raccogliere le cellule della guancia grattando leggermente l'interno della guancia 10 volte con un puntale per

micropipetta sterile. Il modo migliore per farlo è tenere un angolo della bocca aperto con una mano e con l'altra grattare la parete della guancia con il puntale. Applicare una leggera pressione. Alla fine dovrebbe essere visibile un piccolo volume di cellule all'interno del puntale.

Colorazione delle cellule

1. Aggiungere una goccia di Fast Blast diluito al vetrino da microscopio. Settare la micropipetta a 20µl ed inserire il puntale con le cellule. Pipettare 5 volte per trasferire le cellule nella goccia di colorante presente sul vetrino.
2. Ricoprire il campione con un vetrino coprioggetto pulito. Osservare il vetrino a basso e medio ingrandimento e scegliere il più appropriato.

Nota: è necessario che gli studenti vengano prima addestrati all'utilizzo del microscopio. Fast Blast colora le cellule in circa 2 minuti

Colorazione del DNA precipitato con Fast Blast™ concentrato (numero di catalogo 166-0420EDU)

1. Utilizzare una pipetta monouso per trasferire il DNA precipitato e meno di 1 ml di alcool dalla provetta da 15ml ad una microprovetta da 1.5ml con tappo. Utilizzando la stessa pipetta, rimuovere l'eccesso di alcool, e lasciare circa 750µl nella provetta.
2. Aggiungere 500µl del colorante Fast Blast™ 500X alla microprovetta e lasciare il DNA a colorare per almeno 10 minuti.
3. Utilizzando una pipetta monouso di plastica, trasferire tutto il liquido, incluso il DNA, dalla microprovetta alla provetta da 15ml contenente alcool al 70%. Lasciare riposare per 5 minuti.
4. Pipettare o decantare quanto più alcool possibile. Fare attenzione a non perdere il DNA! Riempire la provetta da 15ml fino alla tacca da 10ml con alcool 70% fresco. Lasciare riposare per 15 minuti.
5. (Facoltativo) Continuare con lo step 13 della guida rapida per conservare il DNA colorato in una microprovetta con tappo o preparare la collana di DNA.

Risposte alle domande chiave (Istruzioni di base)

1. **Come potresti verificare se hai veramente raccolto le cellule dalla tua guancia? Che equipaggiamento di laboratorio potresti utilizzare?**

Potresti toccare un vetrino da laboratorio con lo spazzolino dopo aver raccolto le cellule della guancia e guardarle al microscopio.

2. **Nel lavare i piatti, cosa funziona meglio, l'acqua calda o fredda? Cosa pensi possa aiutare il detergente a rompere le cellule, l'alta o bassa temperatura?**

L'acqua calda funziona meglio nel lavare i piatti perché aiuta i grassi e le proteine a sciogliersi meglio nel detergente per piatti. L'alta temperatura aiuta il detergente presente nel tampone di lisi a rompere le cellule.

3. **Pensi che il tuo DNA sia visibile dopo aver rotto le cellule? Perché sì e perché no?**

Il tuo DNA non sarà visibile dopo aver rotto le cellule perché è sciolto nel tampone di lisi.

4. **Dove pensi potresti trovare le proteasi nel tuo corpo? Suggerimento: Dove vengono degradate le proteine ingerite?**

Le proteasi si trovano nello stomaco, dove le proteine ingerite vengono digerite.

5. **Hai mai provato ad aggiungere zucchero al tè freddo? Si scioglie facilmente? Che**

differenza c'è nello sciogliere la stessa quantità di zucchero nella stessa quantità di tè caldo?

Lo zucchero si scioglie molto meno facilmente nel tè freddo che nel tè caldo. La bassa temperatura del tè freddo riduce la solubilità dello zucchero, o la capacità di sciogliersi. In generale, il calore aumenta la solubilità delle sostanze sciolte in un liquido.

Risposte alle domande chiave (istruzioni avanzate)

- 1. Immagina di stare spiegando la differenza tra i cromosomi, i geni ed il DNA a tuo fratello o tua sorella più giovane di due anni. Scrivi la tua spiegazione in parole semplici che loro possano capire.**

Il DNA è un composto chimico che si trova in tutti gli esseri viventi e viene trasmesso dai genitori ai figli. Esso porta l'informazione necessaria a renderti quello che sei.

I cromosomi sono lunghi filamenti di DNA avvolto. Il DNA all'interno delle tue cellule è organizzato in strutture chiamate cromosomi, che facilitano l'assemblaggio all'interno della cellula e la copiatura quando la cellula si divide. I

I geni sono segmenti di DNA contenenti l'informazione necessaria per costruire le proteine, le quali effettuano lavori critici all'interno delle cellule viventi.

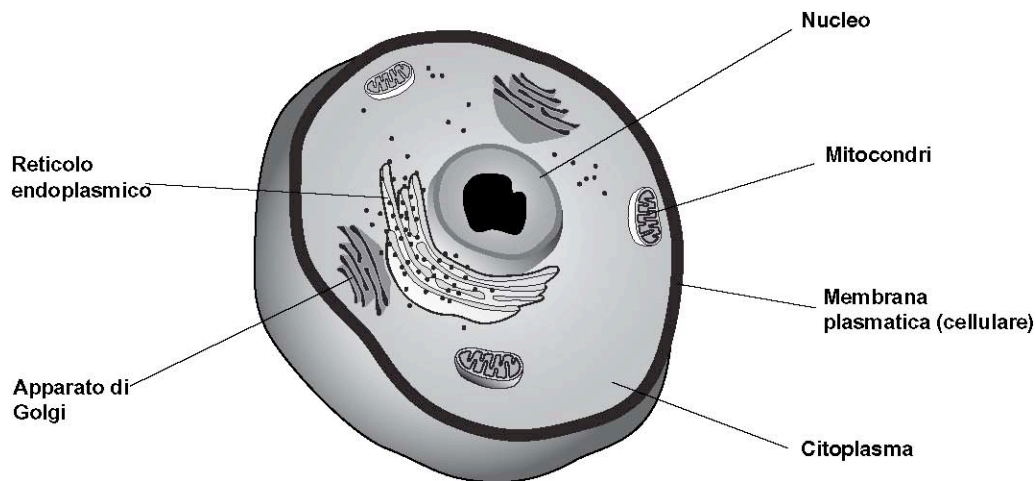
- 2. Una cellula del fegato contiene gli stessi cromosomi di una cellula della guancia?**

Sì. Il DNA genomico che si trova in tutte le cellule non riproduttive è lo stesso, non importa da quale tessuto le cellule provengano.

- 3. Se volessi isolare la copia di un gene che codifica per una proteina che si trova nello stomaco, quel gene potrebbe trovarsi nelle cellule della guancia? Spiega le tue ragioni.**

Il gene che codifica per una proteina dello stomaco dovrebbe trovarsi nel DNA genomico della cellula della guancia. Comunque, la cellula della guancia non dovrebbe produrre l'RNA messaggero, o copie, del gene per la proteina dello stomaco. I geni per la proteina dello stomaco vengono espressi solo nello stomaco.

Sotto un'immagine schematica di una cellula della guancia.



- 4. Indica i compartimenti cellulari, incluse le membrane cellulari, il citoplasma, ed il nucleo.**
5. In quale compartimento cellulare ti aspetti di trovare il tuo DNA genomico?

Il DNA genomico è localizzato nel nucleo.

6. Perché è necessario un intermedio come l' mRNA per copiare l'informazione proveniente dal DNA genomico in modo tale da poter essere tradotto in proteine?

Il DNA genomico si trova nel nucleo e rimane sempre lì (come un libro archiviato che non può mai lasciare la libreria), ma i ribosomi che fabbricano le proteine sono nel citoplasma. Un intermedio mobile è necessario per portare l'informazione genetica dal nucleo al citoplasma.

7. Quale pensi sia il primo passaggio nell'isolamento del DNA dalle cellule?

Le membrane cellulare e nucleare devono essere disgregate per rilasciare il DNA.

8. Una volta che le membrane si sono dissolte, il DNA viene rilasciato in soluzione, ma ci sono molti altri tipi di molecole cellulari. Fai una lista dei tipi di molecole oltre al DNA che ti aspetti di trovare nella cellula.

Proteine, lipidi, zuccheri, e minerali (sali) sono componenti comuni delle cellule.

9. Che metodo o sostanza pensi possa essere utilizzata per rompere queste molecole indesiderate?

Ci sono enzimi che digeriscono specificamente tutti i tipi di molecole biologiche. Le proteasi rompono le proteine, i detergenti sciolgono i lipidi, e gli enzimi come la beta-galattosidasi degradano gli zuccheri. Il calore e l'agitazione possono accelerare questi processi di digestione.

10. Quali proteine possono essere associate al DNA nella cellula?

Il DNA cromosomico è legato agli istoni. Altre proteine nucleari associate possono comprendere DNA polimerasi o fattori trascrizionali.

11. La proteasi utilizzata in questa procedura funziona meglio a 50°C. Ti aspetteresti che questo enzima venga isolato dal batterio E. coli? Suggerimento: dove vive E. coli?

No. E.coli vive nel nostro intestino e cresce a 37°C. Un enzima la cui temperatura ideale è 50°C è stato probabilmente isolato da un organismo che vive a quella temperatura o ad una molto vicina.

12. Le sostanze per rendere tenera la carne vengono spesso utilizzate per intenerire duri pezzi di carne come la bistecca. Sapendo che la bistecca è fatta di tessuto muscolare ricco di proteine, puoi spiegare come lavorano gli inteneritori di carne?

Molti inteneritori di carne contengono papaina, una proteasi. La proteasi rompe le molecole proteiche. Degradando parzialmente alcune delle proteine la carne o muscolo duri vengono resi più morbidi.

13. Combina le affermazioni sulla sinistra con i passaggi di laboratorio sulla destra.

A Raccogli le cellule	A. Sfrega uno spazzolino contro l'interno della tua guancia
C Sciogli le membrane cellulari	B. Aggiungi proteasi e incubala a 50°C
D Precipita il DNA	C. Miscela in una soluzione di detergente
B Rompi le proteine	D. Stratifica alcool freddo sull'estratto cellulare
D Rendi il DNA meno solubile in acqua	E. Aggiungi sale

Parafilm è un marchio di American National Can Co. Styrofoam è un marchio di Dow Chemical Co.



Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Web site www.bio-rad.com **Bio-Rad Laboratories Main Office** 2000 Alfred Nobel Drive , Hercules, CA94547, Ph. (510) 741-1000, Fx. (510) 741-5800 **Also in:** **Australia** Ph. 02 9914 2800, Fx. 02 9914 2889 **Austria** Ph. (01) 877 89 01, Fx. (01) 876 56 29 **Belgium** Ph. 09-385 55 11, Fx. 09-385 65 54 **Brazil** Ph. 55 21 507 6191 **Canada** Ph. (950) 712-2771, Fx. (950) 712-2990 **China** Ph. (86-21) 63052255, Fx. (86-21) 53964775 **Czech Republic** Ph. (420) 2-4141 0532 Fx. (420) 2-4143 1642 **Denmark** PH. 45 44 52-1000, Fx. 45 44 52 1001 **Finland** Ph. 358 (0) 804 2200, Fx. 358 (0) 9 804 1100 **France** Ph. 01 4795 69 65 Fx. 01 47 41 9133 **Germany** Ph. 089 318 84-177, Fx. 089 318 84-123 **Hong Kong** Ph. 852-2789-3300, Fx. 852-2789-1257 **India** Ph. (91-124) -6398112/113/114, 6450092/93, Fx. (91-124)-6398115/6450095 **Israel** Ph. 03 951 4127, Fx. 03 951 4129 **Italy** Ph. 39 02 216091, Fx. 39 02 21906399 **Japan** Ph. 03-5811-6270, Fx. 03-5811-6272 **Korea** Ph. 82-2-3473-4460, Fx. 82-2-3472-7003, **Latin America** Ph. 305-894-5950, Fx. 305-894-5960, **Mexico** Ph. 52 5 534 2552 to 54, Fx 52 5 524 5971 **The Netherlands** Ph. 0318-540666, Fx. 0318-542216 **New Zealand** Ph. 64-9-4152280, Fx. 64-9-443 3097 **Norway** Ph. 47-23-38-41-30, Fx. 47-23-38-41-39 **Poland** Ph. (48) 22-8126 672, Fx. (48) 22-8126 682 **Portugal** **Russia** Ph. 7 095 721 1404, Fx. 7 095 721 1412 **Singapore** Ph. 65-2729877, Fx. 65-2734835 **South Africa** 00 27 11 4428508, Fx. 00 27 11 4428525 **Spain** Ph. 34 91 590 5200, Fx. 34 91 590 5211 **Sweden** Ph. 46 (0)8-55 51 27 00, Fx. 46 (0)8-55 51 27 80 **Switzerland** Ph. 061 717-9555, Fx. 061 717-9550 **United Kingdom** Ph. 0800-181134, Fx. 01442-259118

Sig 0402

