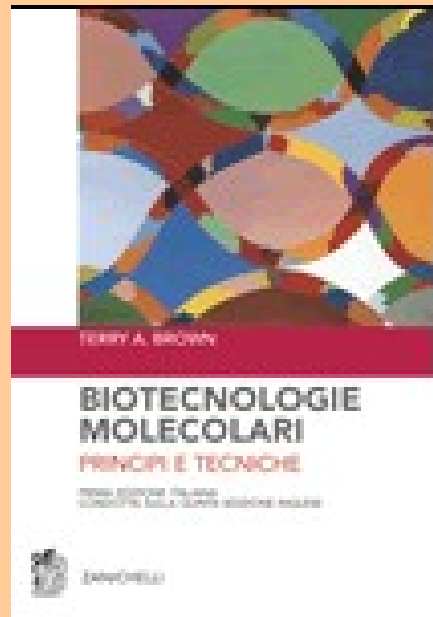


# Laboratorio di Biologia Molecolare

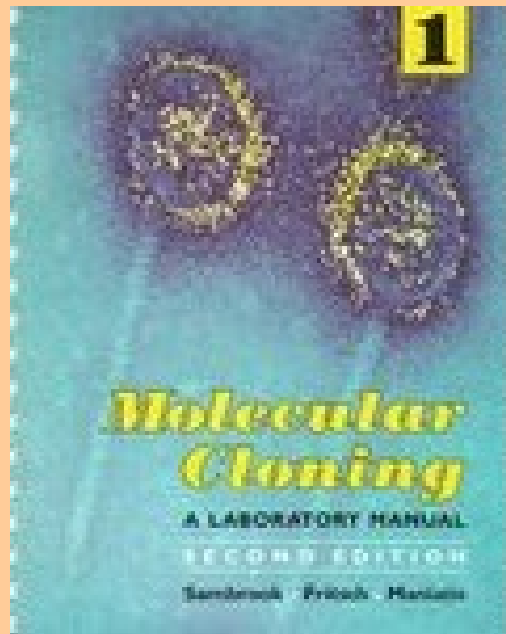
Terry A. BROWN

# BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI



T. Maniatis

# Molecular cloning

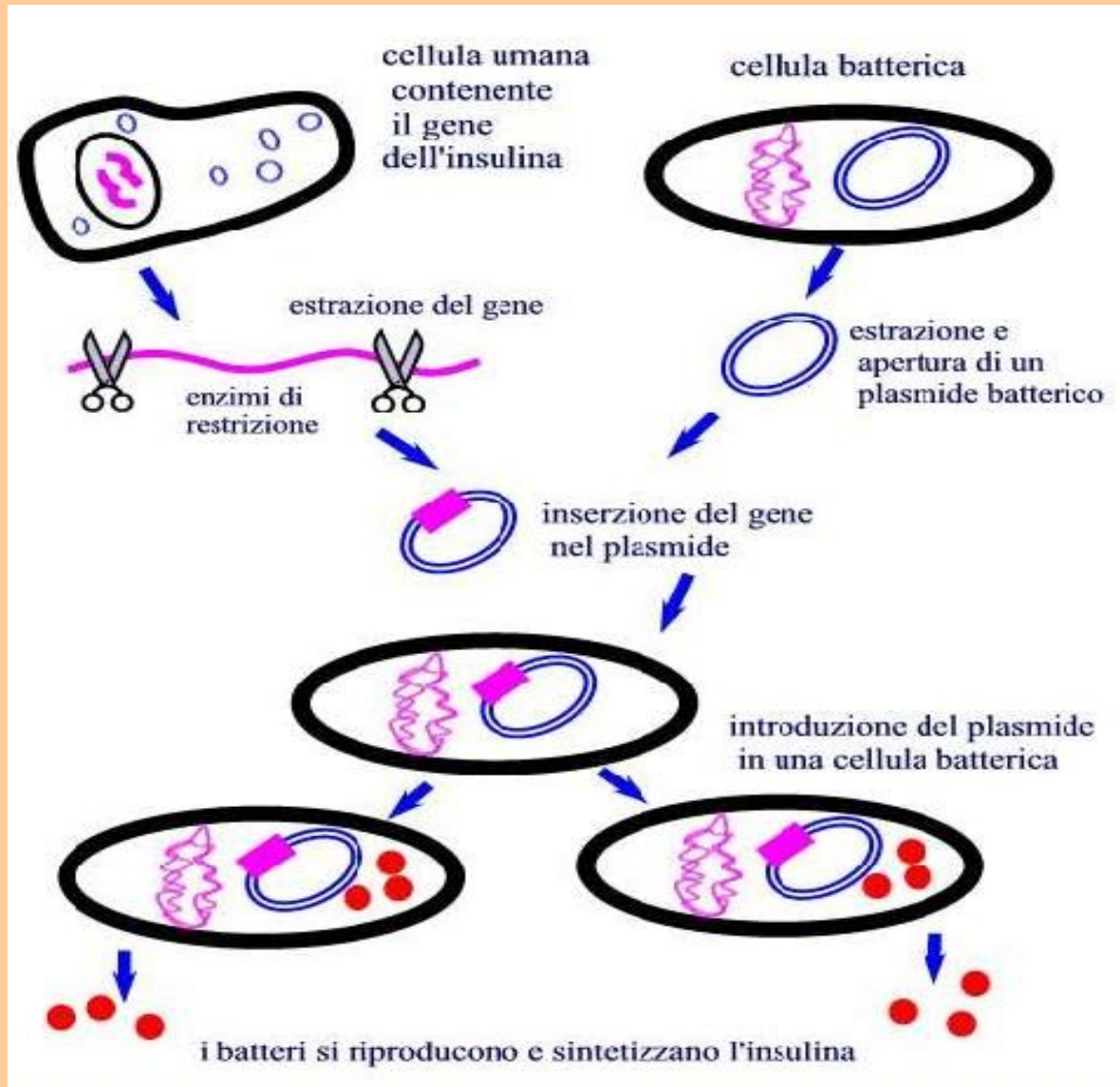


**Manuale di laboratorio**

# **Tecnologia del DNA ricombinante**

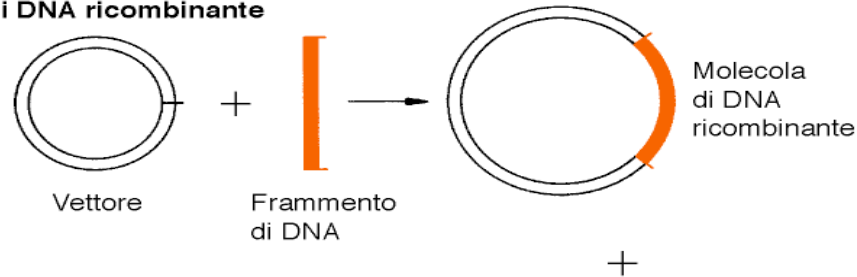
- **Clonaggio di geni.**
- **Sequenziamento del DNA.**
- **Espressione di proteine ricombinanti.**
- **Studio dell'attività dei geni.**

# Tecnologia del DNA ricombinante

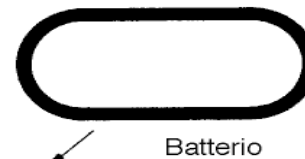


# Clonaggio di un gene

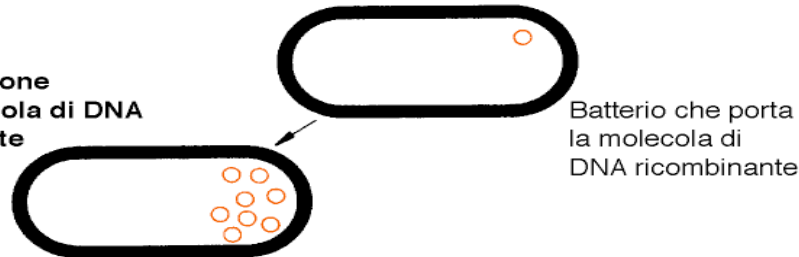
## 1 Costruzione di una molecola di DNA ricombinante



## 2 Trasporto nella cellula ospite



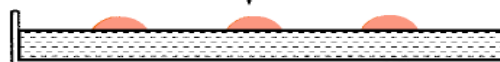
## 3 Moltiplicazione della molecola di DNA ricombinante



## 4 Divisione della cellula ospite

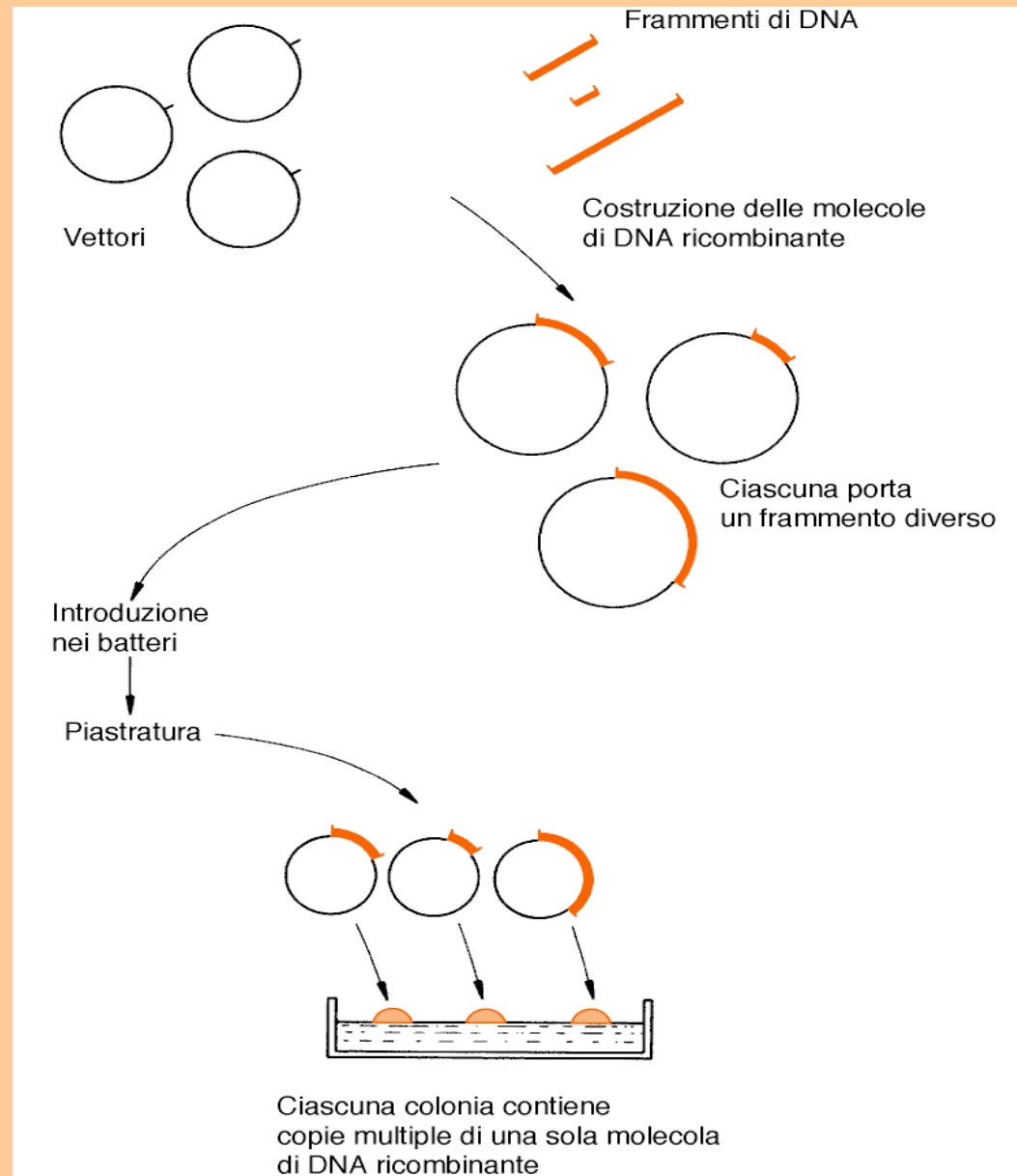


## 5 Numerose divisioni cellulari portano a un clone



Colonie batteriche che crescono su un mezzo solido

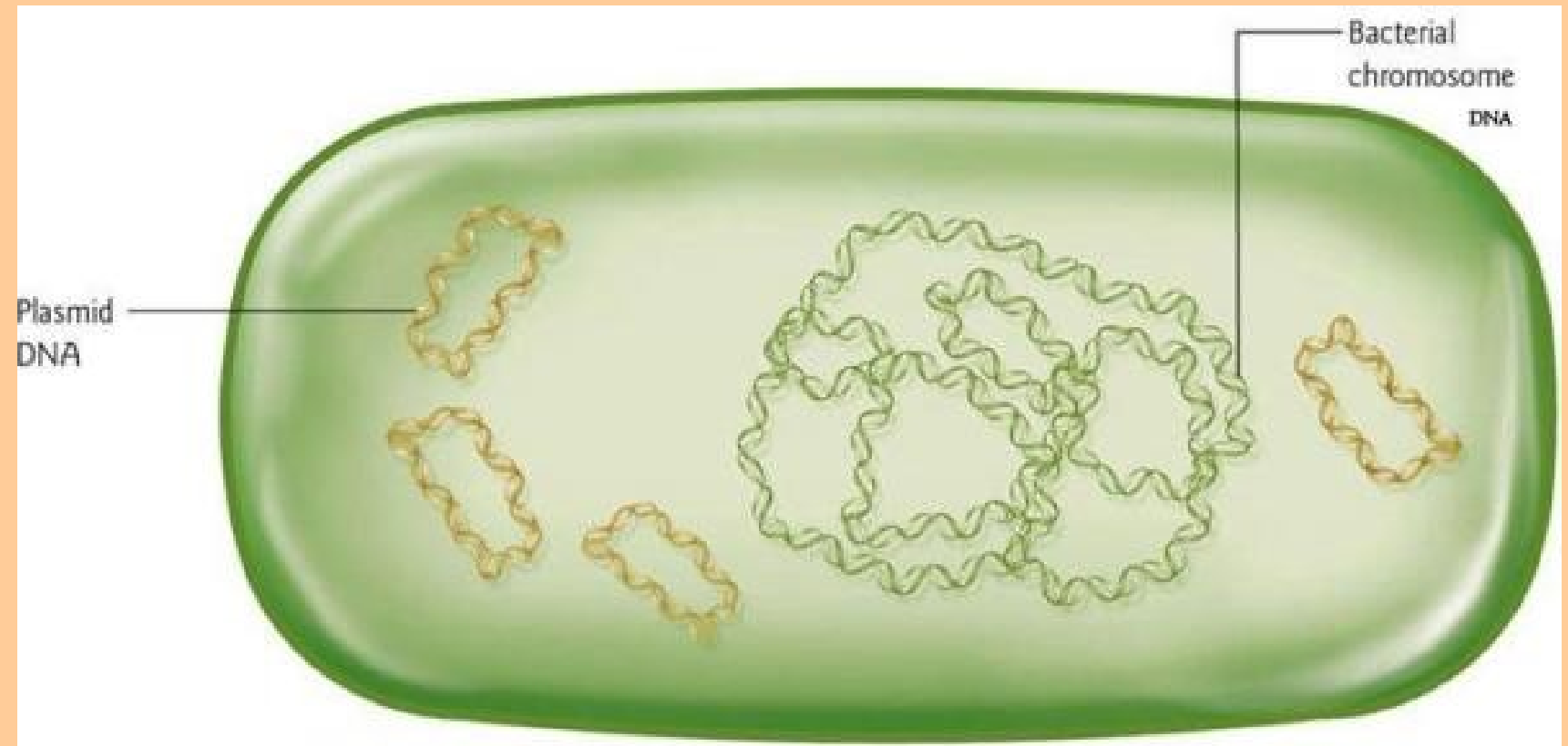
# Purificazione di singoli frammenti di DNA mediante clonaggio



# Vettori derivati da plasmidi batterici

Plasmids are self-replicating, extrachromosomal DNA molecules found in virtually all bacterial species. In nature, plasmids occur in exuberant profusion, varying in structure, size, mode of replication, number of copies per bacterial cell, ability to propagate in different bacteria, transferability between bacterial species, and perhaps most important, in the traits they carry. **Most prokaryotic plasmids are double-stranded circular DNA molecules; however, linear plasmids have been identified in both gram-positive and gram-negative bacteria.** The size of plasmids varies widely, from several kilobases to hundreds of kilobases. Replication of plasmids depends on host-cell proteins but also may require plasmid-encoded functions. **Plasmid replication may be synchronized with the bacterial cell cycle, resulting in a low number of plasmid molecules per bacterial cell, or independent of the host cell cycle, allowing for the proliferation of hundreds of plasmid copies per cell.** Some plasmids freely transfer their DNA across bacterial species, some only transfer their DNA into bacteria of the same species, and some do not transfer their DNA at all. Plasmids carry genes that specify a wide variety of functions including: resistance to antibiotics, resistance to heavy metals, sensitivity to mutagens, sensitivity or resistance to bacteriophages, production of restriction enzymes, production of rare amino acids, production of toxins, determination of virulence, catabolism of complicated organic molecules, ability to form symbiotic relationships, and ability to transfer DNA across kingdoms.





Starting in the 1970s, vectors for propagation, manipulation, and delivery of specific DNA sequences were constructed with fragments from naturally occurring plasmids, primarily *Escherichia coli* plasmids.



**Plasmid Vectors**

All plasmid vectors contain three common features:

- a *replicator*
- a *selectable marker*
- a *cloning site*

# The replicator

**The replicator is a stretch of DNA that contains the site at which DNA replication begins (the origin of replication or ori), and that also includes genes encoding whatever plasmid-encoded RNAs and proteins are necessary for replication.**

***Replicators*** classification is based on the number of plasmid molecules maintained per bacterial cell under some set of standard growth conditions. The so-called ***copy number*** of the plasmid.

***High copy number plasmids:  $> 20$  mol/cell***

***Low copy number plasmids:  $< 20$  mol/cell***

High-copy-number plasmids tend to be under ***relaxed control*** of replication. These relaxed plasmids initiate DNA replication in a process controlled by plasmid-encoded functions (see Mechanism of Replication and Copy-Number Control), and replication does not depend on the unstable host replication initiation proteins synthesized at the start of the bacterial cell cycle.

Low-copy-number plasmids are usually under ***stringent control***. Initiation of replication of these plasmids depends on unstable proteins synthesized at the start of the bacterial cell cycle and thus is ***synchronized with the replication of the bacterial chromosome***. As copy number decreases, random segregation of plasmid copies is not sufficient to ensure that each daughter cell acquires a copy of the plasmid. However, most low-copy-number plasmids carry genes that guarantee their maintenance in the bacterial population.

**Table 1.1** Characteristics of Commonly Used Plasmid Replicators

| Replicator    | Prototype plasmid  | Size (bp)      | Markers on prototype  | Copy <sup>a</sup> number                  | References           |
|---------------|--------------------|----------------|---|---|----------------------|
| pMB1          | pBR322             | 4,362          | Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>                            | Low; 15-20                                | Bolivar et al., 1977 |
|               | <b>pUC vectors</b> |                | Ap <sup>r</sup>   | <b>High ; 500-700</b>                     |                      |
| ColE1         | pMK16              | ~4,500         | Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ,<br>ColE1 <sup>imm</sup> | High; >15                                 | Kahn et al., 1979    |
| p15A          | pACYC184           | ~4,000         | Eml <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>                           | High; ~15                                 | Chang et al., 1978   |
| pSC101        | pLG338             | ~7,300         | Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>                           | Low; ~6                                   | Stoker et al., 1982  |
| F             | pDF41              | ~12,800        | TrpE  | Low; 1 to 2                               | Kahn et al., 1979    |
| R6K           | pRK353             | ~11,100        | TrpE  | Low; <15                                  | Kahn et al., 1979    |
| R1 (R1drd-17) | pBEU50             | ~10,000        | Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>                            | Low at 30°C; high above 35°C <sup>b</sup> | Uhlin et al., 1983   |
| RK2           | pRK2501            | ~11,100        | Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>                           | Low; 2 to 4                               | Kahn et al., 1979    |
| $\lambda$ dv  | $\lambda$ dvgal    | — <sup>c</sup> | Gal   | —   | Jackson et al., 1972 |

<sup>a</sup> Copy numbers are for the prototype plasmid. Plasmid vectors that contain replicators derived from these plasmids may have different copy numbers due to introduction of mutations into the replicator. For example, pUC series (pmB1-derived) has copy numbers of 1000-3000.

<sup>b</sup> Temperature sensitive.

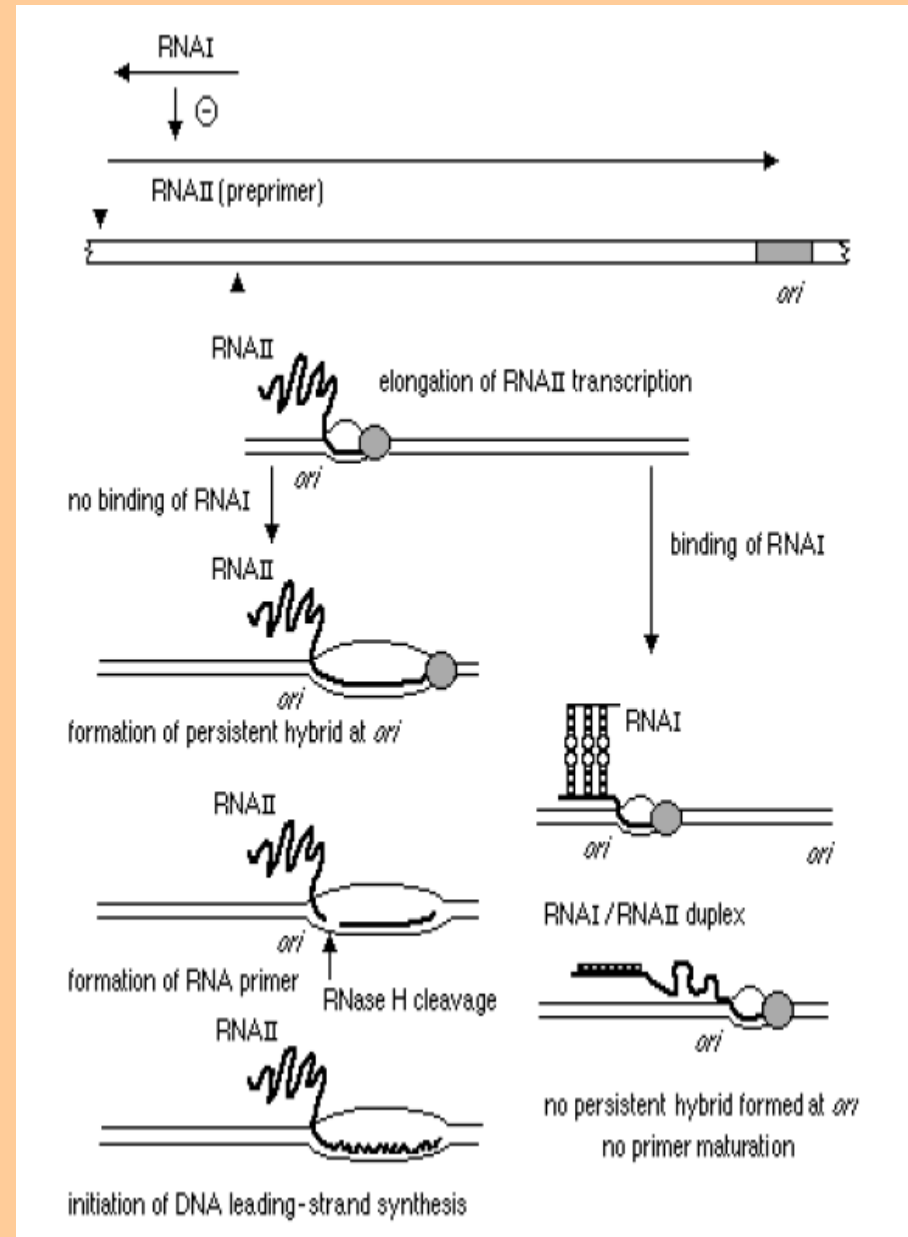
<sup>c</sup> Not known.

While there are many different **replicators**, the majority of plasmid vectors used in routine recombinant DNA work contain one of the functionally similar replicators derived from plasmids ColE1 or pMB1 (for example, the popular pBluescript series contain a ColE1 origin, and the pUC plasmids are derived from pMB1). The ColE1 replicator is a 600-nucleotide DNA fragment that contains the origin of replication (*ori*), encodes an RNA primer, and encodes two negative regulators of replication initiation. All enzymatic functions for replication of the plasmid are provided by the bacterial host.



Plasmid replication begins with transcription of an RNA primer upstream of the *ori* (RNAII; see Fig. 1.1) by the host RNA polymerase. RNAII is elongated through and terminated downstream of the *ori*. Interaction of a specific secondary structure in the nascent RNAII transcript with the DNA template results in formation of a persistent hybrid between RNAII and the DNA template such that RNAII remains paired with the DNA template at the *ori*. The RNAII transcript is cleaved by RNaseH at the *ori* sequence. This processed RNAII primer is extended by DNA polymerase I to initiate plasmid replication. Regulation of the proper RNAII secondary structure controls initiation of DNA replication and is responsible for determining the number of plasmid molecules per cell.

Both ColE1 and pMB1 plasmids are high-copy-number plasmids, maintained at between 15 and 25 copies per bacterial cell, respectively. **The copy number of these plasmids is regulated by an antisense RNA transcript, RNAI, and the protein ROP, the product of the *rop* gene. RNAI and the ROP protein act in concert to intercept formation of the proper RNAII secondary structure. RNAI is exactly complementary to the 5' end of the RNAII transcript. RNAI base pairs with the 5' end of RNAII, preventing the formation of the specific secondary structure necessary for establishment of a persistent hybrid between RNAII and the DNA template that is a prerequisite for maturation of the RNAII primer.**



## **PLASMID INCOMPATIBILITY**

For experiments that require that more than one plasmid vector be maintained in a bacterial cell at the same time, another critical feature of plasmid replicators is whether or not two plasmid replicators are *compatible*. Two plasmids are said to be *incompatible* with one another, and hence belong to the same ***incompatibility group***, if they cannot stably co-exist. Plasmids are generally incompatible if they share any function required for the regulation of plasmid replication.

## SELECTABLE MARKERS

In order to guarantee that a plasmid vector is taken up by and maintained in bacterial cells, **there must be a way to select for plasmid-containing cells**. Genes encoding **resistance to antibiotics** such as **ampicillin, tetracycline, kanamycin and chloramphenicol** are the most common bacterial selectable markers for plasmid vectors. Typically, cells are transformed with plasmid DNA and then plated out on **LB plates that contain the proper antibiotic**. Only the bacterial cells containing the plasmid will grow on the selective medium; the antibiotic-resistance phenotype conferred is dominant to the antibiotic-sensitive phenotype of cells that do not possess the plasmid vector. Another dominant selectable marker that is occasionally used is the immunity to infection by phage lambda (lambda repressor)

| ANTIBIOTICO            | MODALITA' D'AZIONE   | RESISTENZA   |
|------------------------|--|--|
| Tetraciclina           | Si lega ad una proteina della subunità 30S del ribosoma inibendone la traslocazione.                           | Il gene per la resistenza codifica per una proteina di 399 aminoacidi associata alla membrana che impedisce l'entrata dell'antibiotico nella cellula. Il blocco all'ingresso richiede tempi brevi e non è influenzato dalla quantità di antibiotico presente.  |
| Ampicillina            | Si lega e inibisce enzimi della membrana batterica coinvolti nella sintesi della parete cellulare.             | Il gene per la resistenza codifica per un enzima che è secreto nello spazio periplasmico del batterio, dove detossifica la droga idrolizzando l'anello $\beta$ lattame. È molto usato e sta creando problemi per la comparsa di antibiotico resistenze.  |
| Cloramfenicolo         | Si lega alla subunità ribosomale 50S e inibisce la sintesi proteica.   | Il gene codifica per una proteina citosolica tetramerica che, in presenza di acetil coenzima A, catalizza la formazione di derivati idrossil acetossi del cloramfenicolo che sono incapaci di legarsi ai ribosomi. L'espressione dell'acetiltrasferasi è sensibile ai cataboliti ed aumenta quando i batteri crescono su una fonte di carbonio diversa dal glucosio. |
| Kanamicina e neomicina | Sono aminoglicosidi deossistreptamine che si legano ai componenti ribosomali e inibiscono la sintesi proteica. | Entrambi gli antibiotici sono inattivati da una aminoglicoside fosfotrasferasi localizzata nello spazio periplasmico. Si ritiene che la fosforilazione interferisca con il trasporto attivo degli antibiotici nella cellula.   |

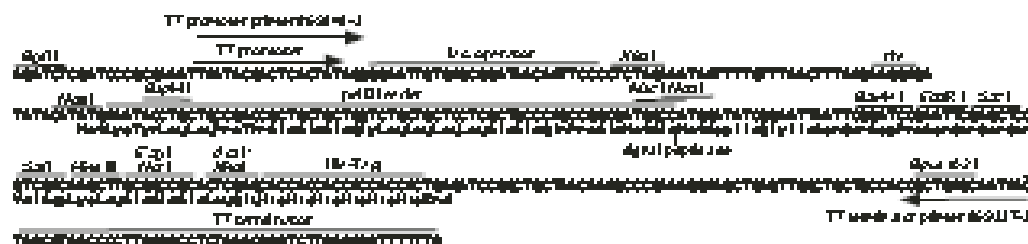
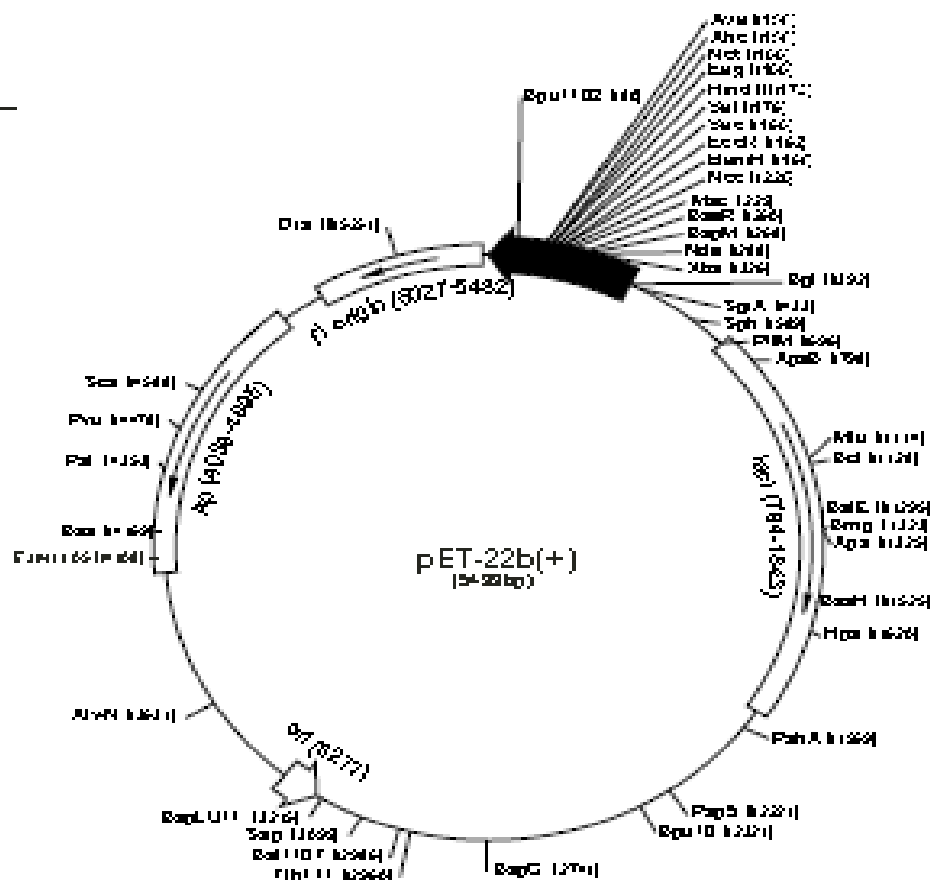
**Due plasmidi sono incompatibili se conferiscono la resistenza allo lo stesso antibiotico.**

## CLONING SITE (polylinker)

Today's plasmid vectors contain a multiple cloning site (MCS) or polylinker cloning region that can include **>20 tandemly arranged restriction endonuclease sites**. The sites in the polylinker are almost always designed to be **unique** within the vector sequence so that cutting the vector with a restriction endonuclease in the polylinker and cloning foreign DNA into this site **does not disrupt other critical features of the vector**. **The plethora of sites in the polylinker ensures that the appropriate enzyme sites will be available for cloning most DNA fragments**, provides unique reference restriction sites for rapid restriction mapping of the insert, and generally **allows for a great deal of flexibility when manipulating the cloned DNA**. The sequences that directly flank the polylinker site are often useful for manipulation or analysis of insert DNA. Many polylinker sites are flanked by sequences for which there are commercially available complementary oligonucleotides, for example the M13 reverse, -20, and -40 primers, that can be used for priming polymerase chain reactions (PCR) or DNA sequencing reactions. Such primers are useful tools for **amplification** or sequencing of any DNA fragment inserted into the polylinker. Some polylinkers are bordered by 8-bp-cutter restriction sites, like *Not1*. These sites occur infrequently in DNA and thus allow for the easy excision of an intact insert fragment from the plasmid vector.

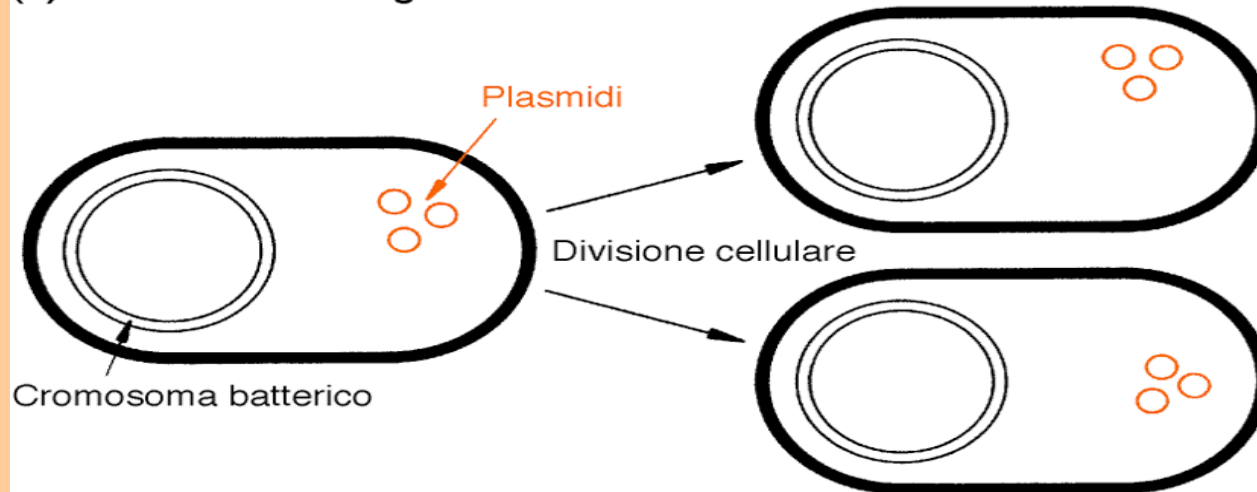
pt 7.22d(4) sequence bands only

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| I $\gamma$ promoter                   | 381-377   |
| I $\gamma$ transcription start        | 380       |
| polyA coding sequence                 | 224-239   |
| Multiplication site<br>(Abo 1, 356-0) | 163-226   |
| HuIgA coding sequence                 | 140-167   |
| I $\gamma$ terminator                 | 26-32     |
| Isol coding sequence                  | 764-1348  |
| pBR322 origin                         | 3277      |
| His coding sequence                   | 4036-4636 |
| Fl origin                             | 6267-6428 |



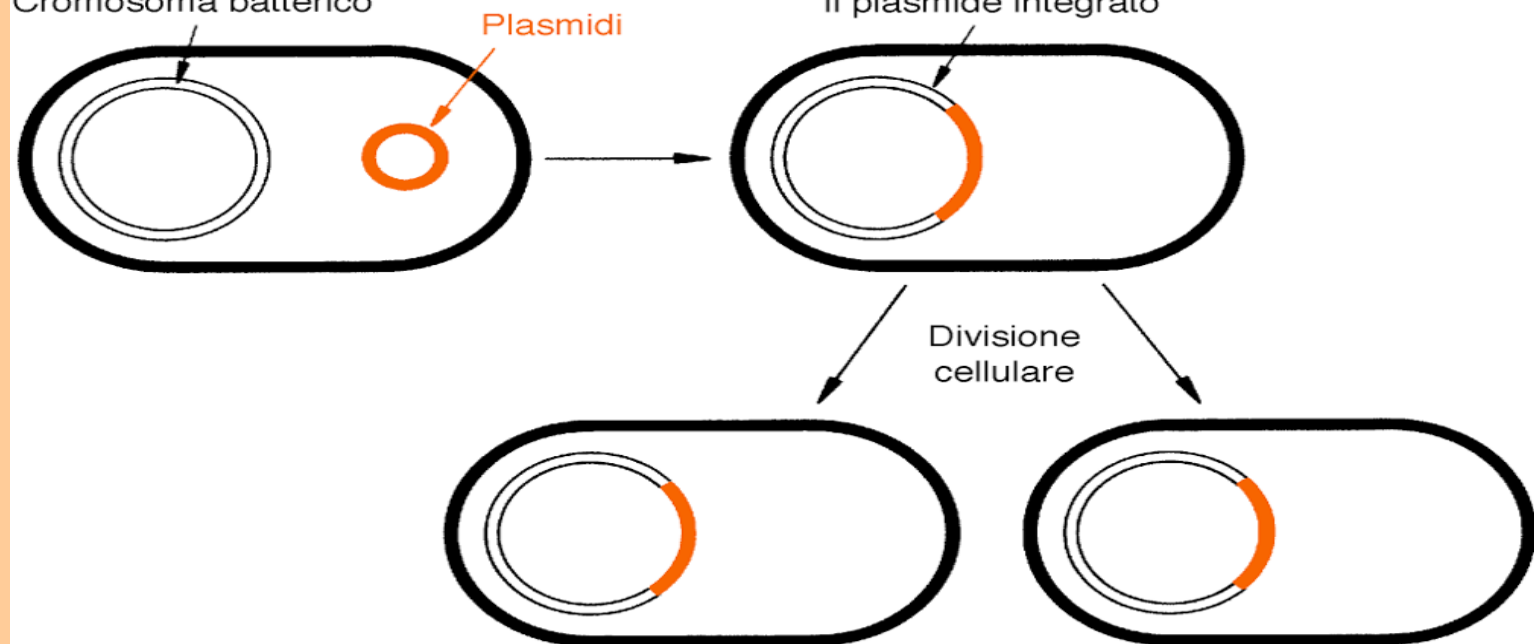
# Plasmidi integrativi (episomi) e non integrativi

(a) Plasmide non integrativo



(b) Episoma

Cromosoma batterico





# Purificazione del DNA plasmidico (Miniprep) mediante lisi alcalina

*Secondo la procedura della lisi alcalina, il DNA plasmidico è preparato piccole quantità di diverse colture (1-24) di batteri contenenti plasmidi. I batteri sono lisati da un trattamento con una soluzione contenente sodio dodecil solfato SDS (denatura le proteine batteriche) e NaOH (denatura il DNA plasmidico e cromosomale). La miscela è neutralizzata con potassio acetato che permette la rinaturazione del DNA plasmidico a differenza di quello genomico. La maggior parte del DNA cromosomale e le proteine batteriche precipitano-così come l'SDS che forma un complesso con il potassio- e sono rimosse da una centrifugazione. Il DNA plasmidico rinaturato, che rimane nel supernatante, viene concentrato per precipitazione in etanolo.*

*Si possono distinguere tre fasi operative cui riferirsi anche per la descrizione di altri protocolli di estrazione del DNA:*

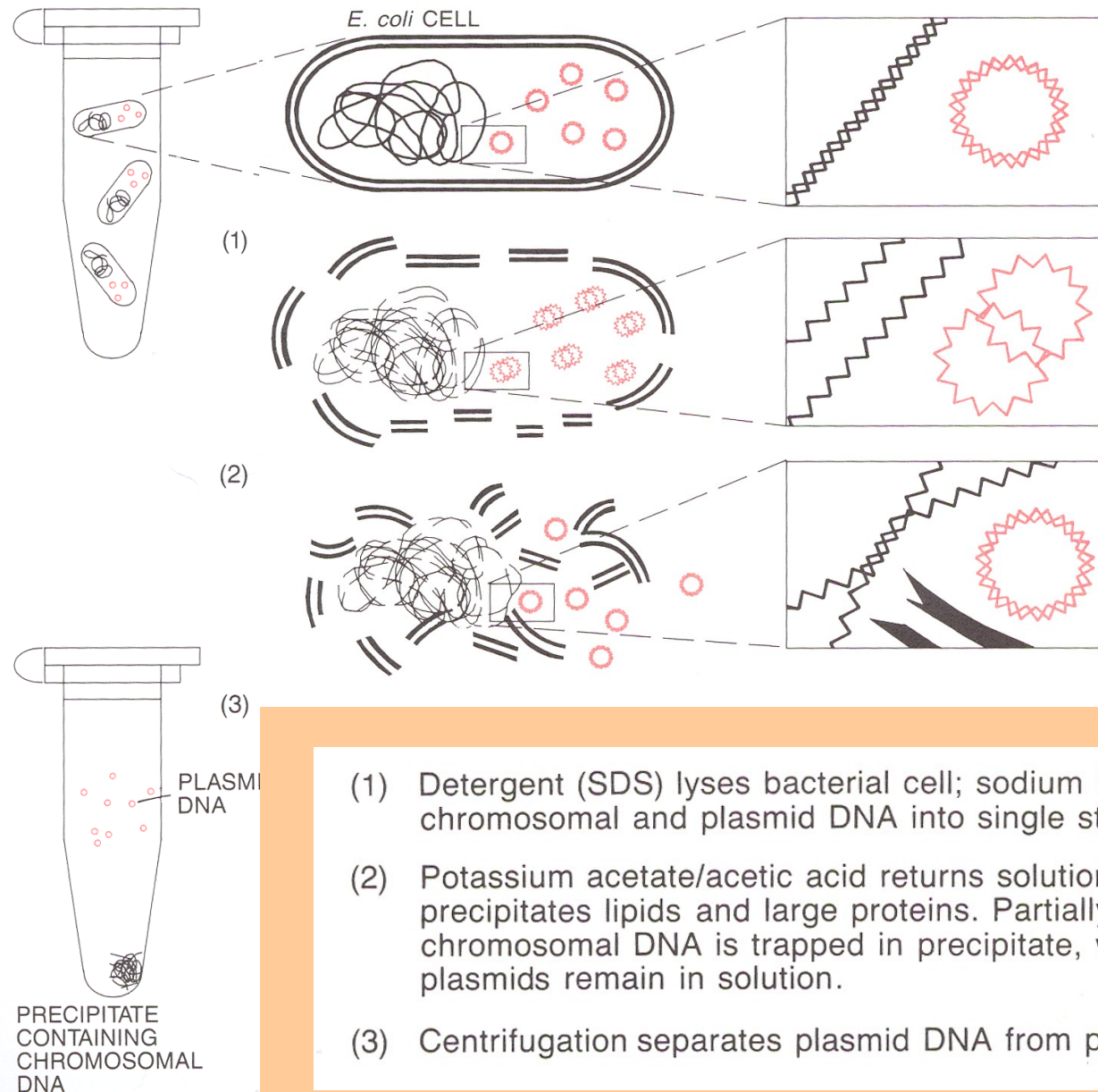
- 1. Lisi alcalina: lisi delle cellule batteriche mediante l'uso di una soluzione alcalina che provoca la denaturazione e la precipitazione di tutte le componenti cellulari, ad eccezione del DNA plasmidico che rimane in soluzione.*
- 2. Trattamento Fenolo:Cloroformio: purificazione del DNA plasmidico estratto mediante un passaggio che prevede l'uso del fenolo:cloroformio.*
- 3. Precipitazione e risospensione del DNA: operazione che prevede la precipitazione ed il lavaggio del DNA, seguito da risospensione in TE*

*L'estrazione del DNA plasmidico deve esser effettuata a partire da colture fresche, in quanto l'utilizzo di colture vecchie potrebbe influenzare negativamente la corretta purificazione del DNA a causa dell'accumulo di metaboliti secondari.*

*La Soluzione I è necessaria per risospendere le cellule e porle nelle condizioni adatte alla successiva lisi. Il glucosio: rende la soluzione isoosmotica; la sua presenza impone la sterilizzazione in autoclave della soluzione per evitare lo sviluppo di muffe. Il tampone Tris-Cl (pH 8.0) : fornisce potere tamponante, viene equilibrato con HCl a valori prossimi ad 8.0 , che è il pH ideale per mantenere in soluzione il DNA nella sua forma a doppio filamento. L' EDTA (pH 8.0): è necessario per sequestrare (chelare) gli ioni bivalenti, in particolare impedisce agli ioni  $Mg^{2+}$  di agire da coenzimi per DNasi, rendendole inattive. Questo garantisce l'estrazione e la conservazione di DNA integro in qualsiasi condizione di lavoro, tranne nel caso in cui operino enzimi di restrizione. L'EDTA, inoltre, chela gli ioni  $Ca^{2+}$  indebolendo la parete cellulare, evitando l'utilizzo di lisozima (se non in presenza di microrganismi recalcitranti) che ha lo svantaggio di ricoprire il DNA di impurezze se usato per più di 2 minuti.*

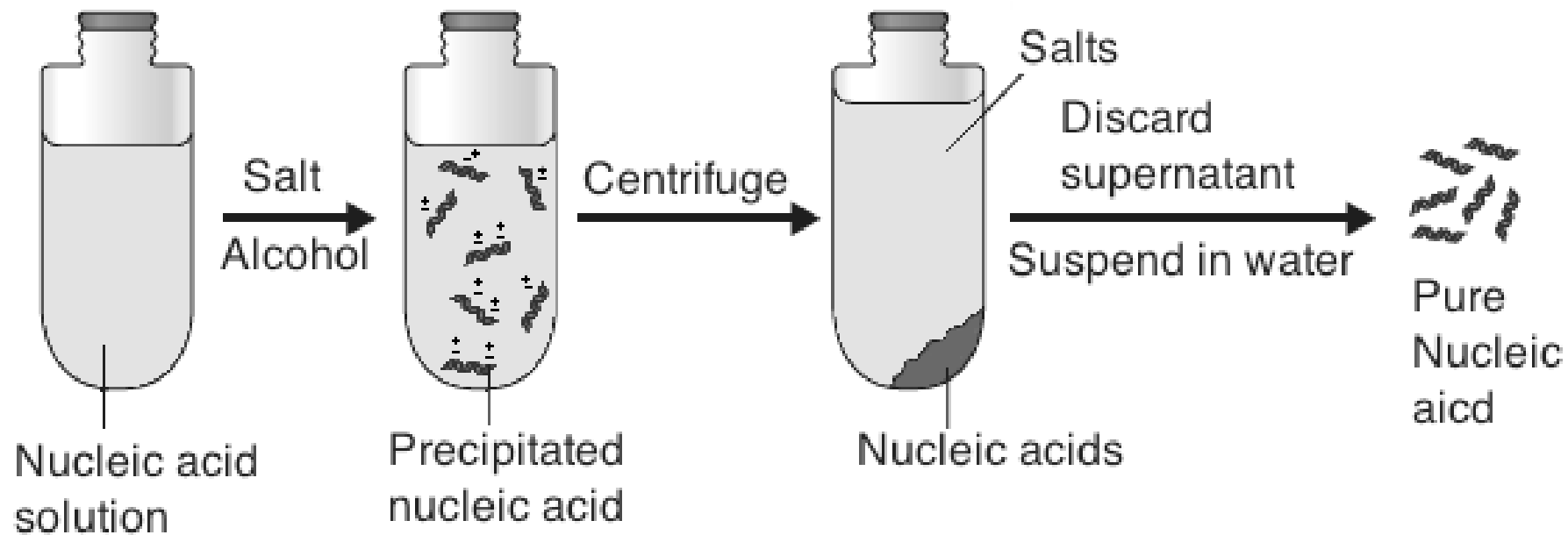
*FACOLTATIVO: alla Sol. 1 è possibile aggiungere RNasi (10 mg/ml) per eliminare l'RNA, in quantità di 1  $\mu$ l per ml di soluzione. Se non si aggiunge RNasi alla soluzione I e non si tratta con fenolo-cloroformio restano residui di RNA e proteine. Nella corsa elettroforetica l'RNA tende a trascinare il DNA che così non darà bande nette.*

*La Soluzione II provoca la lisi alcalina delle cellule. La soluzione fresca ha maggior capacità alcalinizzante, che viene persa col passare del tempo. L'NaOH permette la lisi alcalina con la quale il DNA genomico e plasmidico denaturano e precipitano. L'SDS è un detergente che in ghiaccio precipita perdendo di efficacia, quindi, la soluzione II non va mantenuta in ghiaccio.*



- (1) Detergent (SDS) lyses bacterial cell; sodium hydroxide denatures chromosomal and plasmid DNA into single strands.
- (2) Potassium acetate/acetic acid returns solution to neutral pH and precipitates lipids and large proteins. Partially renatured chromosomal DNA is trapped in precipitate, while renatured plasmids remain in solution.
- (3) Centrifugation separates plasmid DNA from precipitate.

## Precipitazione del DNA con Alcoli (Etanolo, isopropanolo)



# **Alternativa alla precipitazione con Etanolo: purificazione con colonna di silice**

*Il protocollo permette di purificare fino ad un massimo di 20 µg di DNA plasmidico , partendo da 1.5 ml di coltura fresca in LB, di ceppi di E.coli caratterizzati dalla capacità di mantenere un elevato numero di copie.*

*La quantità di coltura non è assoluta: dipende dal numero di copie plasmidiche e dalla velocità di crescita batterica. Per ottimizzare la quantità di batteri da trattare, si può fare l'estrazione con una quantità doppia di batteri ed osservare qual è il limite massimo della colonna utilizzata (in questo modo è possibile stimare il numero di plasmidi per batterio conoscendo la concentrazione batterica).*

*Questo protocollo si distingue dal Maniatis Miniprep perché il DNA viene purificato tramite il passaggio in una colonnina contenente silice.*

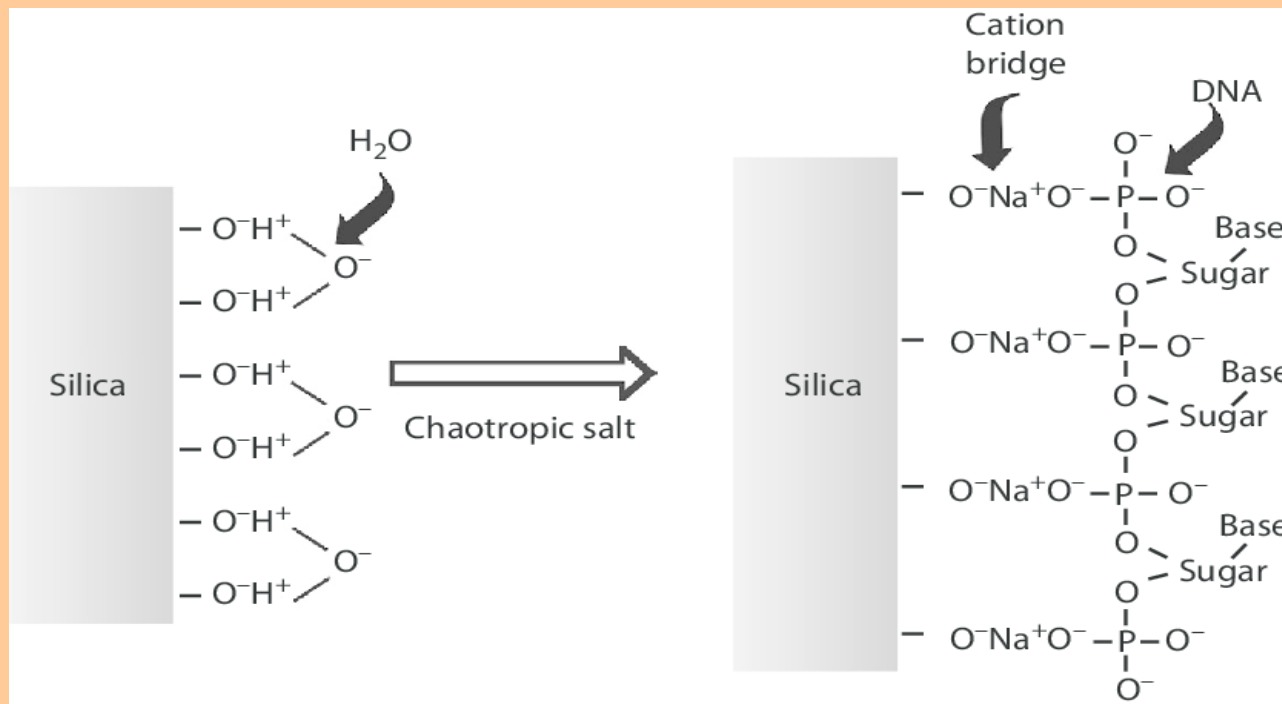
*Si distinguono due fasi operative:*

- 1. Lisi alcalina: il principio è analogo a quello utilizzato dalla Magnatis Miniprep, ovvero la lisi cellulare avviene in condizioni alcaline, tutte le componenti cellulari sono denaturate e fatte precipitare, ad eccezione del DNA plasmidico che rimane in soluzione.*
- 2. Purificazione del DNA su colonnina di silice: il DNA plasmidico viene purificato facendo passare la soluzione ottenuta nella prima parte attraverso una colonnina piena di silice, in grado di trattenere gli acidi nucleici.*

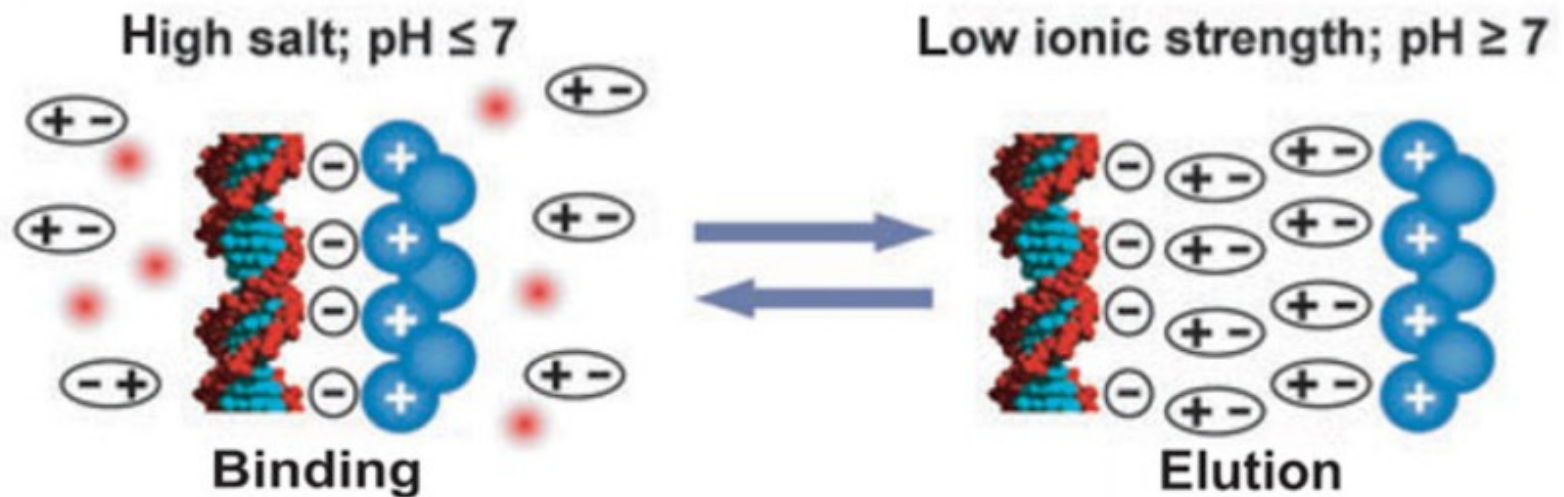
*Come funziona questo kit: Le colonnine contengono silice impaccata. La soluzione contenente il DNA, un'alta concentrazione di sali e 30-50% etanolo è fatta passare per centrifugazione attraverso la resina. In questo modo si ha il binding del DNA (dato che a queste condizioni è semidenaturato, esponendo così le cariche negative responsabili del legame). Il distacco dalla resina è dato dal passaggio di una soluzione a basse concentrazioni di sali e priva di etanolo.*

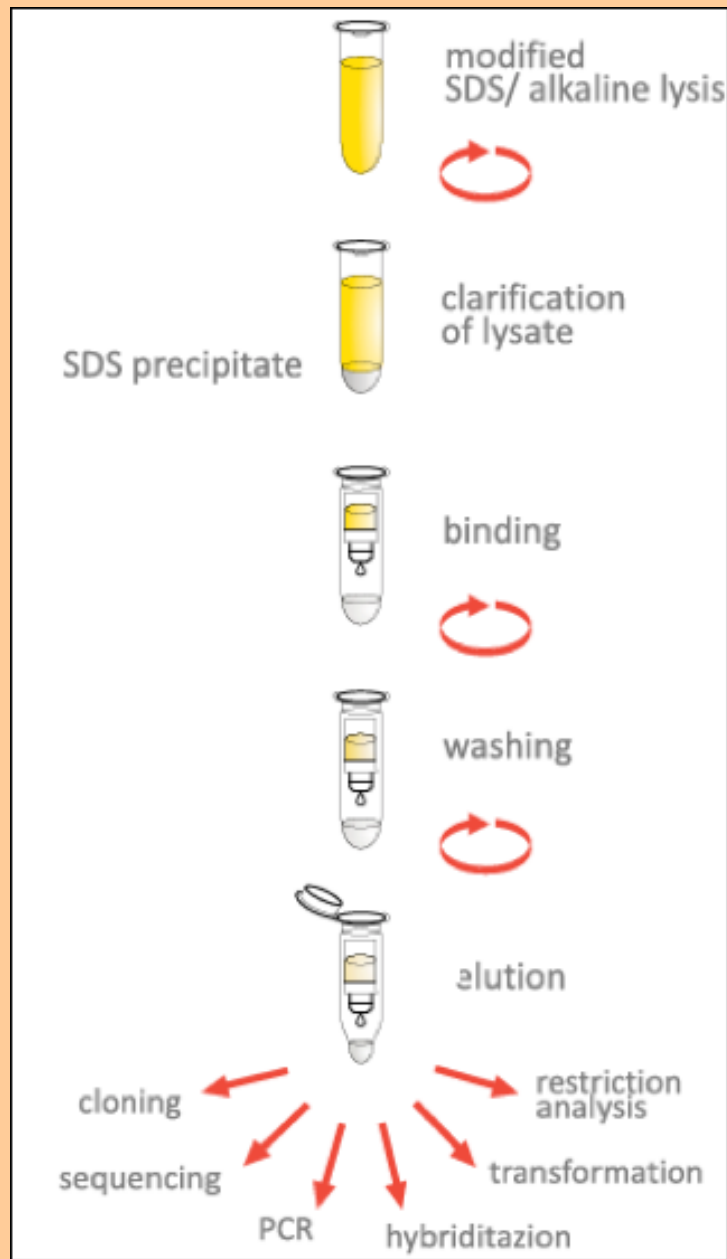
*Attivazione della resina con guanidina isotiocianato.*

- Oggi i Kit sono ottimizzati per utilizzare volumi uguali delle varie soluzioni.*
- Conoscendo la composizione delle soluzioni I, II e III è possibile confrontare il primo protocollo con il secondo ed eventualmente rifare le soluzioni del kit o creare varianti.*



**a**





# Kit miniprep commerciale

## Vantaggi:

- Resa maggiore
- DNA plasmidico più puro
- Rapidità

## Svantaggi:

- Costo più elevato



# Principali dotazione ed attrezzature di laboratorio

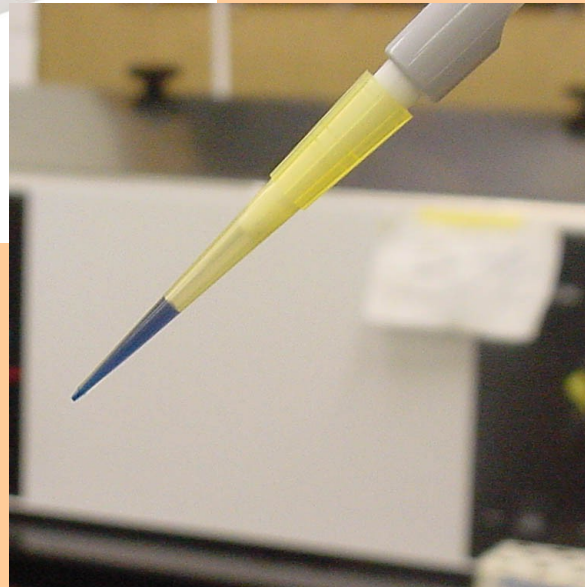
## Provette eppendorf



## Provette Falcon



# Micropipette e puntali



# Cappa Biologica



# Prima esperienza di laboratorio

miniprep del plasmide **pUC18** con kit  
protocollo Maniatis

# GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

## Procedure

All steps are carried out at room temperature.

1. **Harvest cells.** Pellet 2 ml of an overnight recombinant *E. coli* culture by centrifugation. The optimal volume of culture to use depends upon the plasmid and culture density. For best yields, follow the instructions in the note below. Transfer the appropriate volume of the recombinant *E. coli* culture to a microcentrifuge tube and pellet cells at 12,000 ´ g for 1 minute. Discard the supernatant.

**Note:** For best results with recombinant *E. coli* grown in LB (Luria Broth), use 1-3 ml of culture for high copy plasmids or 1-5 ml of culture for low copy plasmids. With recombinant *E. coli* grown in rich media such as TB (Terrific Broth) or 2X YT, use only 1 ml of culture. Higher volumes can cause a reduction in yield.

2. **Resuspend cells.** Prior to first time use, be sure to add the appropriate volume of the RNase A Solution to the Resuspension Solution. Completely resuspend the bacterial pellet with 200 µl of the Resuspension Solution. Vortex or pipette up and down to thoroughly resuspend the cells until homogeneous. Incomplete resuspension will result in poor recovery.

3. **Lyse cells.** Lyse the resuspended cells by adding 200 µl of the Lysis Buffer. Immediately mix the contents by gentle inversion (6-8 times) until the mixture becomes clear and viscous. **Do not vortex.** Harsh mixing will shear genomic DNA, resulting in chromosomal DNA contamination in the final recovered plasmid DNA. **Do not allow the lysis reaction to exceed 5 minutes.** Prolonged alkaline lysis may permanently denature supercoiled plasmid DNA that may render it unsuitable for most downstream applications.

4. **Neutralize.** Precipitate the cell debris by adding 350 µl of the Neutralization/Binding Buffer. Gently invert the tube 4-6 times. Pellet the cell debris by centrifuging at 12,000 ´ g or maximum speed for 10 minutes. Cell debris, proteins, lipids, SDS, and chromosomal DNA should fall out of solution as a cloudy, viscous precipitate. If the supernatant contains a large amount of floating particulates after centrifugation, recentrifuge the supernatant before proceeding to step 6.

5. **Prepare Column.** Insert a GenElute Miniprep Binding Column into a provided microcentrifuge tube, if not already assembled. Add 500 µl of the Column Preparation Solution to each miniprep column and centrifuge at 12,000 ´ g for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.

**Note:** The Column Preparation Solution maximizes binding of DNA to the membrane resulting in more consistent yields.

6. **Load cleared lysate.** Transfer the cleared lysate from step 4 to the column prepared in step 5 and centrifuge at 12,000 ´ g for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.

7. **Optional wash (use only with EndA+ strains).**

Add 500 µl of the Optional Wash Solution to the column. Centrifuge at 12,000 ´ g for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.

**Note:** When working with bacterial strains containing the wild-type EndA+ gene, such as HB101, JM101, and the NM and PR series, the Optional Wash step is necessary to avoid nuclease contamination of the final plasmid DNA product.

8. **Wash column.** Wash Solution. Add 750 µl of the diluted Wash Solution to the column. Centrifuge at 12,000 ´ g for 30 seconds to 1 minute. The column wash step removes residual salt and other contaminants introduced during the column load. Discard the flow-through liquid and centrifuge again at maximum speed for 1 to 2 minutes without any additional Wash Solution to remove excess ethanol.

9. **Elute DNA.** Transfer the column to a fresh collection tube. Add 50 µl of Elution Solution or molecular biology reagent water to the column. For DNA sequencing and other enzymatic applications, use water or 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, as an eluant. Centrifuge at 12,000 ´ g for 1 minute. The DNA is now present in the eluate and is ready for immediate use or storage at –20 °C.



## MINIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO

### Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina

(MINIPREP MANIATIS)

- Prelevare 1.5 ml di coltura batterica cresciuta o/n

*L'estrazione del DNA plasmidico deve essere effettuata a partire da colture fresche, in quanto l'utilizzo di colture vecchie potrebbe influenzare negativamente la corretta purificazione del DNA a causa dell'accumulo di metaboliti secondari. La quantità esatta di coltura batterica prelevata non è importante: si tende tuttavia a riempire l'eppendorf per massimizzare la quantità di DNA estratto. Non è indispensabile l'utilizzo di una cappa sterile: l'eventuale presenza di DNasi esogene viene contrastata con l'utilizzo, nelle fasi successive, di EDTA.*

- Centrifugare per 30'' a 12000 rpm e eliminare il supernatante.

*L'operazione può essere effettuata a 4°C o a temperatura ambiente indipendentemente: una volta si operava con microcentrifughe refrigerate per rallentare il metabolismo cellulare e quindi ridurre l'azione delle nucleasi. Oggi si ritiene superflua questa operazione e si preferisce operare a temperatura ambiente (23-25°C). Il tempo e la velocità della centrifugazione devono essere tali da consentire la formazione di un pellet più o meno compatto (quelli riportati sono valori di centrifugazione indicativi: se il pellet è instabile procedere con un'ulteriore centrifugazione). Per eliminare il supernatante è sufficiente versare il contenuto del tubo capovolgendolo e picchiettarlo leggermente, con tappo aperto, su carta cercando di allontanare le eventuali goccioline di terreno residue: tale operazione consente di non modificare le concentrazioni delle tre soluzioni in seguito utilizzate.*

1. Risospendere il pellet batterico in 100 µl di Soluzione I.

*Per la risospensione si può utilizzare il vortex o il puntale di una pipetta, in quanto le cellule sono ancora integre ed il DNA è protetto.*

2. Aggiungere 200 µl di Soluzione II.

*Mescolare capovolgendo il tubo due o tre volte. In questa fase la soluzione alcalina provoca la lisi delle cellule e la denaturazione e precipitazione delle molecole di DNA genomico e plasmidico. Quindi, le molecole di DNA diventano estremamente fragili, per questo si deve mescolare adeguatamente ma evitando azioni troppo energetiche (vortex) per non rompere meccanicamente il DNA stesso. Si ottiene un lisato cellulare viscoso e biancastro.*

3. Aggiungere 150 µl di soluzione III entro 2-3 minuti dall'aggiunta della Soluzione II e mescolare capovolgendo il tubo due o tre volte

*Anche in questo caso non vortexare per non di rompere il DNA. Con l'aggiunta della soluzione III si riporta il lisato cellulare a pH che consentono la rinaturazione del DNA plasmidico. Il tempo di attesa che precede l'aggiunta della soluzione III è fondamentale per la separazione del DNA plasmidico dal genomico: il DNA plasmidico, proprio perché superavvolto e di piccole dimensioni, se mantenuto in condizioni di lisi per un tempo non superiore ai 3-4 minuti riesce a rinaturare, mentre il DNA genomico e le proteine rimangono intrappolate irreversibilmente nel complesso formato da potassio e SDS. Nel caso la soluzione II venisse lasciata agire per periodi più lunghi, il DNA plasmidico sarebbe comunque in grado di rinaturare ma assumerebbe una conformazione tale da risultare inattaccabile dagli enzimi di restrizione.*

4. Centrifugare a massima velocità per 5 min. e recuperare il supernatante in un nuovo tubo

*Questo tempo deve essere rispettato per permettere la sedimentazione dei residui cellulari. Si consiglia di prelevare una quantità di supernatante non superiore a 500 µl in vista dall'aggiunta di un volume doppio di etanolo nelle fasi successive.*

5. OPZIONALE : Trattamento con fenolo-cloroformio per eliminare le proteine rimanenti.

*Questo trattamento è spiegato in dettaglio più avanti*

6. Precipitare il DNA con due vol. di etanolo (100% v/v) oppure con 0.6 vol. di isopropanolo.

*L'etanolo è aggiunto al 100% per ottenere una soluzione finale al 70%. Per esempio: a 100 µl di DNA si aggiungono 200 µl di etanolo assoluto oppure 60 µl di isopropanolo. In questa fase è necessario capovolgere il tubo delicatamente: il DNA deve venire a contatto con l'alcol per precipitare.*

7. Centrifugare a 12000 g per 5 min.

*Se il DNA è sporco è possibile vedere il pellet bianco sul fondo del tubo. Se è presente una grande quantità di polisaccaridi il pellet è mucillaginoso.*

8. Rimuovere il supernatante e lavare con etanolo 70% v/v.

*Per eliminare l'etanolo capovolgere la provetta aperta e scuoterla leggermente su un pezzo di carta, oppure effettuare un breve passaggio in centrifuga (30" a massima velocità) per far scendere eventuali goccioline sul fondo del tubo e quindi aspirarle con una micropipetta.*

*Il lavaggio con EtOH 70% serve a eliminare i sali rimasti.*

*Versare nel tubo circa 500 µl di EtOH 70%.*

9. Rimuovere completamente l'etanolo e lasciare seccare all'aria per 10 minuti.

*Per eliminare l'etanolo aspirarlo con una micropipetta senza rompere il pellet, eventualmente ripetere una breve centrifugazione come spiegato al punto 8. E' importante che il pellet sia completamente asciutto perché la presenza di tracce di etanolo determina una scarsa risospensione del DNA e, soprattutto, ne provoca la fuoriuscita dal pozzetto quando si effettua il caricamento su gel di agarosio per un'elettroforesi. Questo passaggio può essere velocizzato ponendo la provetta in un luogo ben aerato, per esempio in una cappa a flusso laminare.*

10. Risospendere il DNA plasmidico in 50 µl di TE pH 8.0.

*Si risospinge in TE per evitare il pericolo di degradazione del DNA da parte delle DNAsi, infatti, la presenza di EDTA nel TE garantisce protezione dalle DNAsi*

11. Conservare a 4°C.

*Se si risospinge in acqua si deve conservare a -20°C (la bassa temperatura blocca le DNAsi)*