

## 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 surnatante 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 energiche (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 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 surnatante 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.*

**Incubare a -20 °C per circa 20 minuti.**

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 esser 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.**

*↑ EDTA = agente chelante*

*inattiva le DNasi, chela il metallo  $Mg^{2+}$*

*Ca*

*Si risospende in TE <sup>tamponi</sup> 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 risospende in acqua si deve conservare a -20°C (la bassa temperatura blocca le DNAsi)*



## Trattamento con fenolo:cloroformio

### 1. Aggiungere alla soluzione contenente il DNA 1 vol. di fenolo:cloroformio:isoamilico (25:24:1)

*La presenza dell'isoamilico serve per semisaturare il cloroformio che altrimenti puro avrebbe la tendenza a disidratare il campione.*

### 2. Miscelare le due fasi (non vortexare)

*Agitare vigorosamente fintanto che il campione non si presenta lattiginoso*

### 3. Centrifugare almeno 3 minuti.

*Si formano due fasi distinte: quella inferiore di fenolo-cloroformio e quella superiore con il DNA in soluzione. L'interfaccia bianca è data dalle proteine denaturate.*

### 4. Recuperare la fase superiore, contenente DNA.

*È importante evitare di creare vortici che smuovano lo strato inferiore: tenere la punta della pipetta appena sotto la superficie dello strato superiore (Fig.1). Ad un certo punto si forma una bolla di soluzione contenente il DNA. Può essere utile tenere inclinato il tubo in modo da prevedere dove si formerà la bolla (Fig.2). Con il puntale posizionarsi al centro della bolla e cercare di prelevare il più possibile.*

*È importante evitare di trasportare nel nuovo tubo tracce di fenolo-cloroformio (visibili in controluce come "sferette" vetrose), perché queste degraderebbero gli enzimi utilizzati in seguito (polimerasi, enzimi di restrizione...).*

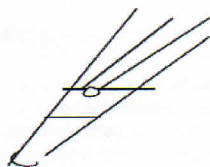


Fig.1

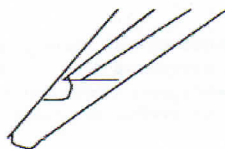


Fig.2

### 5. Precipitare il DNA con etanolo o isopropanolo

*Se inizialmente il DNA era in TE, è necessario aggiungere 1/10 vol. NaOAc 3M pH 4.8 prima di aggiungere i 2 vol. di etanolo assoluto oppure gli 0.6 vol. isopropanolo. Qualora questo trattamento venga condotto durante la Miniprep (punto 5), la presenza massiccia di sali forniti con la Sol. 3 rende inutile (se non dannosa) l'aggiunta di 1/10 vol. NaOAc 3M pH 4.8 prima dell'alcool. In questo caso la precipitazione deve essere condotta come da punto 6 del protocollo Miniprep*

#### NOTE

*Il fenolo cloroformio è una soluzione sinergica altamente deproteinizzante che serve per eliminare i possibili contaminanti del DNA per evitare che interferiscano con i successivi trattamenti, specialmente nel caso in cui si lavori con enzimi di restrizione. Questo trattamento può essere fatto anche su DNA genomico o comunque su DNA plasmidico già risospeso in TE. Il passaggio in fenolo:cloroformio deve sempre esser seguito da precipitazione in etanolo assoluto (o isopropanolo) e successiva risolubilizzazione in TE.*