

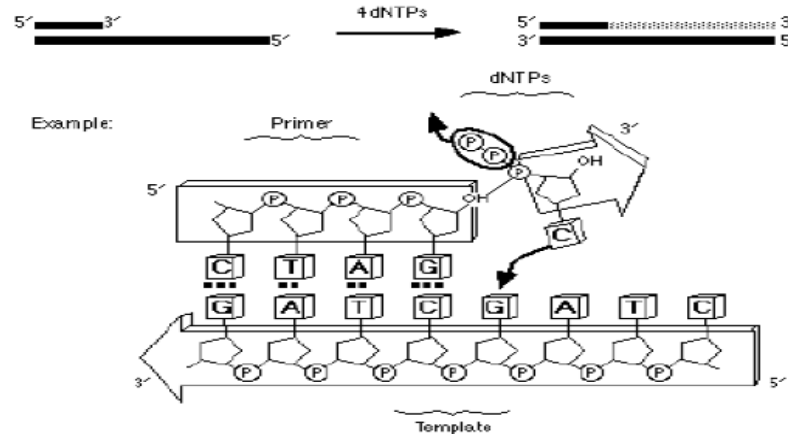
Enzimi utilizzati nella manipolazione degli acidi nucleici

- **Polimerasi (RNA e DNA polimerasi)**
- **Enzimi di modificazione (fosfatasi, chinasi, ligasi ecc.)**
- **Nucleasi (esonucleasi ed endonucleasi)**
- **Enzimi di restrizione**

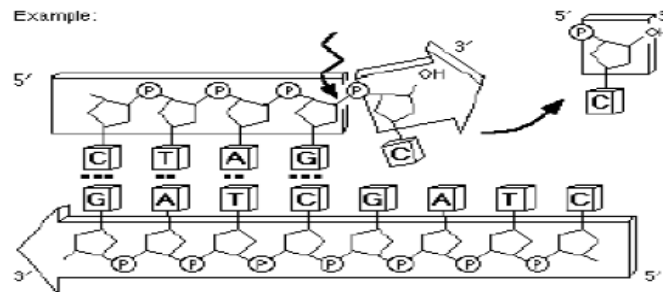
ENZIMI

DNA Polimerasi DNA dipendenti

Tutte le DNA polimerasi aggiungono deossiribonucleotidi al terminale 3' di una molecola primer di DNA a doppia elica.



La sintesi avanza esclusivamente in direzione $5' \rightarrow 3'$ rispetto al filamento sintetizzato. Ogni nucleotide che viene incorporato durante la polimerizzazione è complementare al suo opposto sul template (dA con dT, dC con dG). La reazione di sintesi richiede i quattro deossiribonucleosidi trifosfato (dNTPs) e ioni magnesio. Molte DNA polimerasi hanno una esonucleasi $3' \rightarrow 5'$ inerentemente associata con l'attività polimerasica.



L'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ rimuove un singolo nucleotide alla volta rilasciando un nucleoside 5' monofosfato. In assenza di dNTPs, questa attività di degradazione sarà catalizzata a partire da un idrossile terminale 3' libero sia di un singolo che di un doppio filamento di DNA. In presenza di dNTPs, l'attività esonucleasica su un filamento a doppia elica di DNA è inibita dall'attività polimerasica. Durante la sintesi del DNA, l'attività esonucleasica realizza la correzione rimuovendo i nucleotidi incorporati errati. Oltre all'azione esonucleasica $3' \rightarrow 5'$, molte DNA polimerasi (per esempio *E. coli* DNA polimerasi I) hanno anche un'attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$. Questa attività esonucleasica degrada la doppia elica di DNA a partire da un terminale idrossile 5' libero.

Proprietà delle DNA Polimerasi:

Enzimi	Esonucleasi 3' → 5'	Esonucleasi 5' → 3'	Velocità di polimerizzazione	Processività
DNA Polimerasi di <i>E. coli</i>	Bassa	Presente	Intermedia	Bassa
Frammento di Klenow	Bassa	Assente	Intermedia	Bassa
Trascrittasi inversa	Assente	Assente	Bassa	Intermedia
DNA polimerasi T4	Alta	Assente	Intermedia	Bassa
DNA polimerasi T7 nativa	Alta	Assente	Veloce	Alta
DNA Polimerasi T7 geneticamente modificata	Bassa	Assente	Veloce	Alta
DNA polimerasi T7 geneticamente modificata	Assente	Assente	Veloce	Alta
<i>Taq</i> DNA polimerasi	Assente	Presente	Veloce	Alta

DNA polimerasi I di *Escherichia coli*

L'enzima è il prodotto del gene *polA* di *E. coli*. Il gene *polA* è stato clonato nel batteriofago lambda, e l'enzima è sovraprodotto dopo trattamento termico che attiva il ciclo litico del fago, mantenuto fino a quel momento nello stadio lisogenico. La DNA polimerasi I è un singolo polipeptide con peso molecolare di 109,000. Oltre a questa attività polimerasica DNA dipendente, essa ha anche un'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ e un'attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$. L'attività esonucleasica è molto meno attiva rispetto a quella della DNA polimerasi T4 o T7.

Altre applicazioni della DNA polimerasi I di *E. coli*.

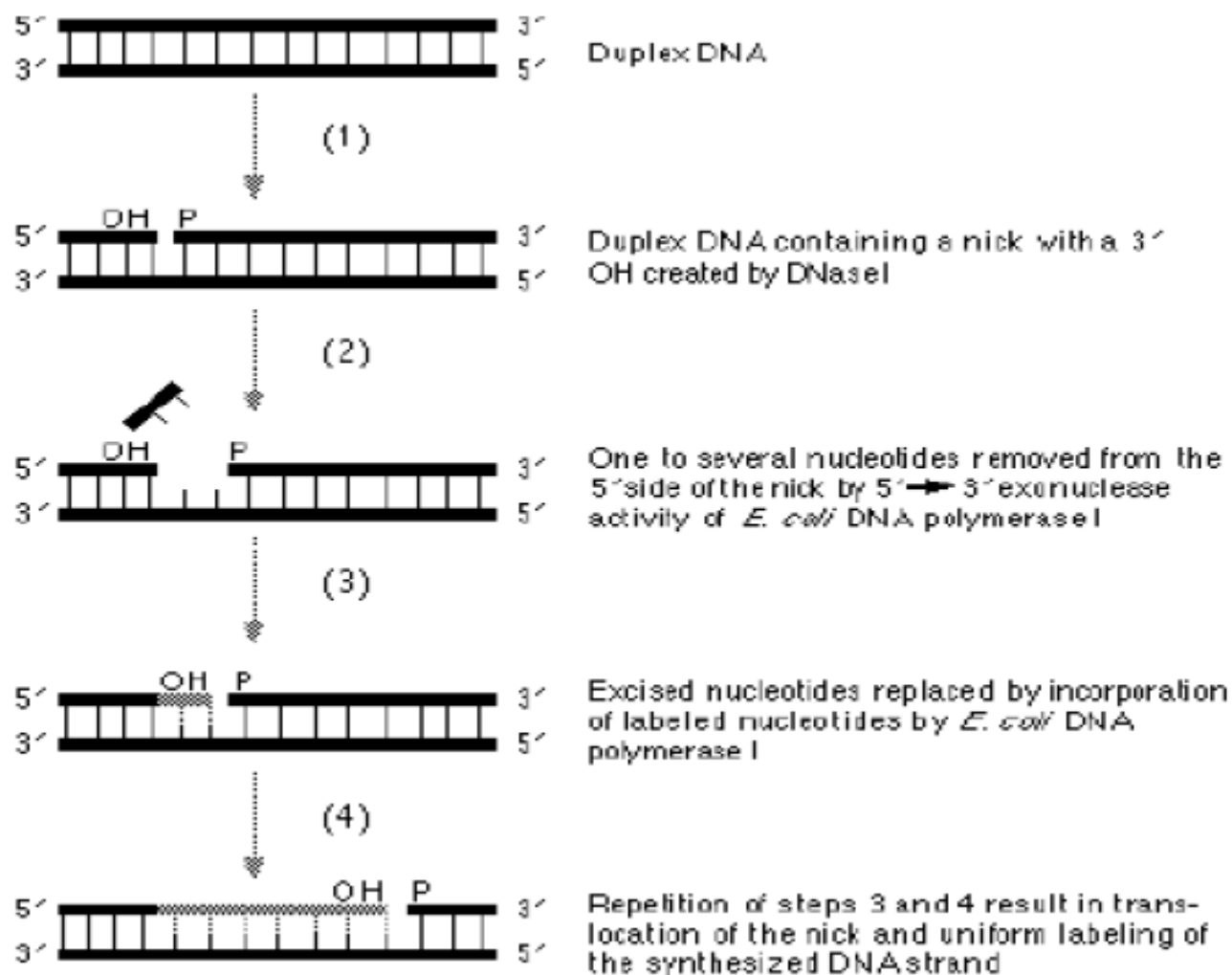
1. Marcare i terminali $3'$ delle molecole di DNA. Questa procedura è generalmente realizzata con il frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*.
2. Riparare i terminali $3'$ o $5'$ sporgenti (protuberanze) per creare terminali piatti. Questa procedura è generalmente realizzata con il frammento Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*. Per riparare i terminali $3'$ sporgenti è usata preferibilmente la DNA polimerasi T4 perché la sua attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ è più attiva.

Frammento di Klenow della DNA polimerasi I

Il frammento di Klenow, con peso molecolare di 76,000, è rappresentato dal 70% del C-terminale della DNA polimerasi I di *E. coli*. Esso conserva l'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ e l'attività polimerasica della DNA polimerasi I, ma manca dell'attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$.

Nick Translation

(permette di marcare con nucleotidi modificati)



Taq DNA polimerasi

La Taq DNA polimerasi nativa fu isolata da un microrganismo termofilo, il *Thermus aquaticus*. L'enzima ha una massa molecolare di 94 kDa. Ha una temperatura ottimale di polimerizzazione di 75-80°C e non sembra che abbia nessuna attività esonucleasica 3' → 5'. L'enzima è costituito da una singola catena polipeptidica con elevato numero di turnover ed elevata processività.

Applicazioni

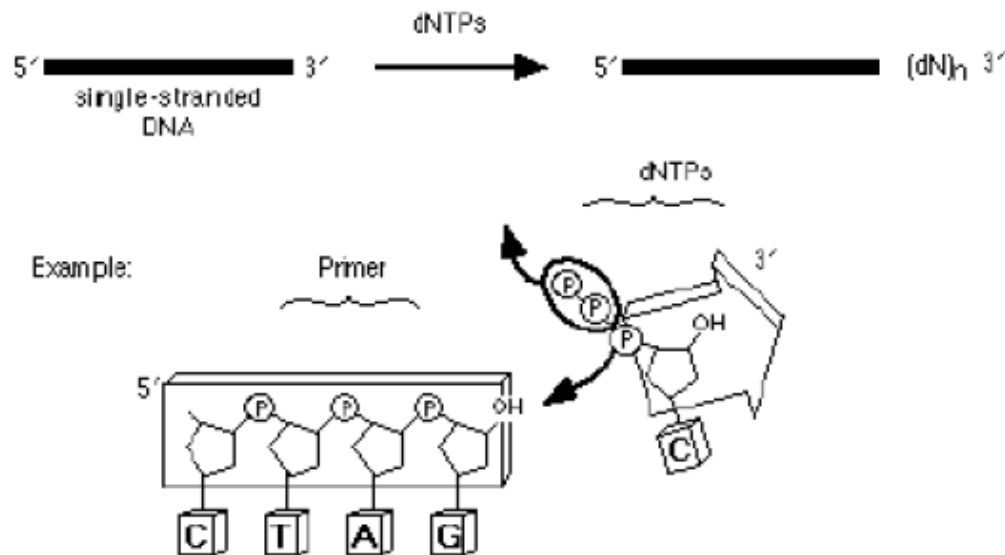
1. La Taq polimerasi è attiva in un largo range di temperature e ha una elevata temperatura ottimale di polimerizzazione che la rende ideale per essere utilizzata nelle reazioni a catena della polimerasi o PCR. Le elevate temperature permettono più specifici appaiamenti dei primer oligonucleotidici, questo incrementa l'efficienza e la specificità e quindi la sensibilità della PCR. Il fatto che i primer oligonucleotidici resistano a ripetuti cicli, dalla temperatura di annealing usata per la PCR fino alla temperatura richiesta per separare i filamenti, presenta il vantaggio di aggiungere l'enzima una sola volta al campione precedentemente all'avvio dei cicli di amplificazione.

La Taq polimerasi ha un elevato numero di turn over, alta processività, e la capacità di usare analoghi dei dNTP (deossinucleosidi trifosfato) quali inosina, la rendono un enzima eccellente per il sequenziamento del DNA. Queste qualità associate con la sua elevata temperatura d'esercizio permettono il sequenziamento di modelli che presentano strutture forti strutture secondarie a basse temperature ovviando all'uso dei convenzionali enzimi per il sequenziamento.

DNA polimerasi template indipendenti

Deossinucleotidiltransferasi terminale

La terminal transferasi, purificata la prima volta dal timo di vitello, catalizza l'incorporazione di deossinucleotidi al terminale idrossilico 3' del DNA accompagnato dal rilascio di fosfato inorganico.



DNA polimerasi RNA dipendenti

Trascrittasi inversa

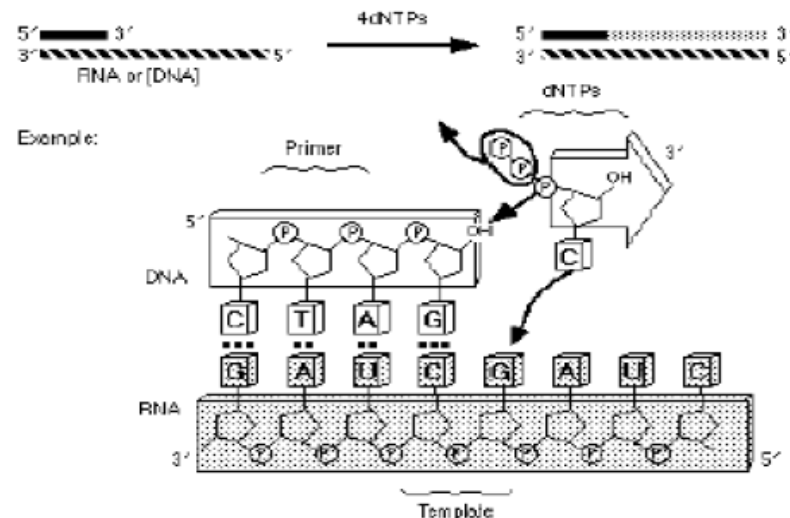
Le “trascrittasi inverse” sono enzimi che derivano dai retrovirus come l'AMV (avian myeloblastosis virus) o il MMLV (Moloney murine leukemia virus) che le utilizzano per sintetizzare copie di DNA a partire dai loro genomi a Rna. L'enzima AMV viene purificato a partire dai virus AMV isolati, mentre l'enzima MMLV viene purificato grazie alla produzione in *E.coli* che contiene il gene clonato.

Le trascrittasi inverse di AMV e MMLV sono enzimi multifunzionali, ma esse sono principalmente utilizzate come “DNA polimerasi dipendenti da RNA”. In particolare dei deossiligonucleotidi (una sequenza specifica oppure una collezione di sequenze random di DNA) vengono impegnati come primer sui templati di RNA (di solito mRNA) per l'allungamento.

Il DNA sintetizzato a partire dal template-RNA viene chiamato cDNA.

La trascrittasi inversa possiede anche un'attività di “DNA polimerasi DNA dipendente”. L'incorporazione dei dNTPs è molto lenta (all'incirca vengono incorporati 5 nucleotidi al secondo) quasi 100 volte più lenta della DNA polimerasi del batteriofago T7.

La DNA polimerasi della trascrittasi inversa manca dell'attività esonucleasica in direzione $3' \rightarrow 5'$.



RNA polimerasi DNA dipendenti

RNA polimerasi di *Escherichia coli*

L'oloenzima di *E. coli* possiede 5 subunità (struttura $\alpha 2\beta\beta'$ o) ed un totale peso molecolare di circa 450,000. Esso trascrive un DNA template (in forma denaturata o nativa) in un RNA copia utilizzando ribonucleosidi trifosfati come precursori. La trascrizione viene avviata preferenzialmente su promotori che contengono sequenze conservate localizzate 10 e 35 bp a monte dell'inizio della trascrizione e, in vivo, di solito cessa all'altezza di sequenze chiamate terminatori.

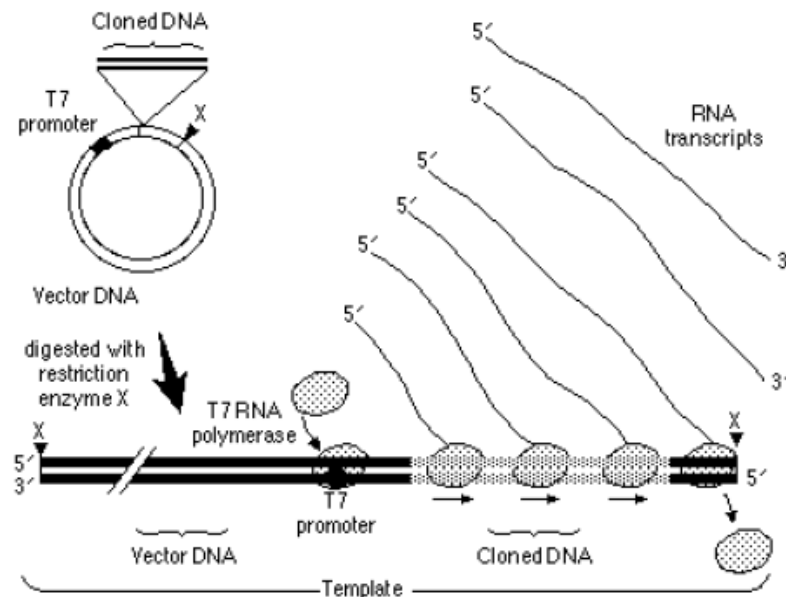
La specificità e l'estensione della trascrizione dipende fortemente dalla qualità della preparazione del DNA, dalla forza della sequenza promotore e terminatore e dal tipo e dalla concentrazione dei cationi mono e bivalenti nella miscela di reazione. Il core dell'enzima, che manca della subunità "o", non riconosce le sequenze-promotore e di conseguenza comincia la trascrizione in modo casuale sul template

RNA polimerasi dei fagi SP6, T7, T3

Le Rna polimerasi dei fagi T7 e T3, prodotte dai rispettivi fagi (dal gene 1), furono in origine purificate individui infetti di *E. coli*. Al giorno d'oggi entrambe le polimerasi vengono purificate da ceppi di *E. coli* che sovraesprimono i geni clonati.

L' RNA polimerasi del fago SP6 viene ottenuta da *Salmonella typhimurium* infettata dal batteriofago SP6.

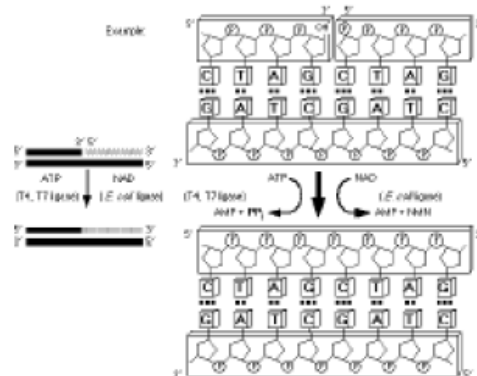
Queste tre omologhe RNA polimerasi fagiche sono tutte costituite da singoli polipeptidi con un peso molecolare compreso tra 90,000 e 100,000. Ciascuna ha un' elevata specificità per il suo promotore, il quale consiste in una sequenza specifica di 20 bp. La trascrizione è sia molto rapida (10 volte la velocità della RNA polimerasi di *E. coli* in vitro) e sia estremamente processuale.



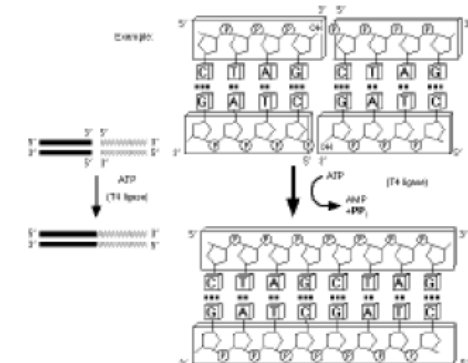
DNA LIGASI

Le DNA ligasi catalizzano la formazione dei legami fosfodiesterici tra i termini 5'-fosfato e 3'-idrossile giustapposti lungo i filamenti del DNA a doppia elica. Questa attività permette:

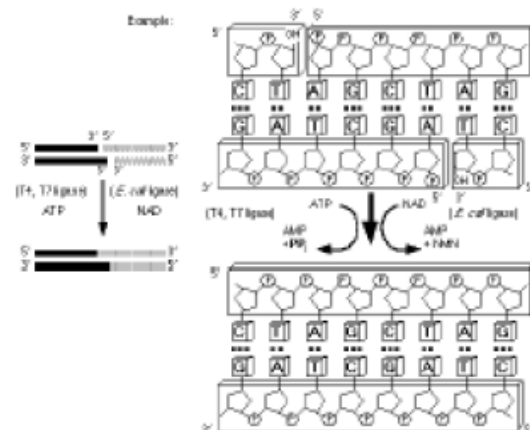
- di riparare eventuali incisioni in un singolo filamento del DNA.



- di legare dei frammenti di restrizione che hanno entrambe le estremità piatte



- di legare sequenze terminali omologhe e coesive



DNA ligasi T4

La T4 DNA ligasi, il prodotto del gene 30 del fago T4, fu originalmente purificata da cellule fago-infettate di *E. coli*. Il gene 30 del fago T4 è stato clonato, e l'enzima è ora preparato da ceppi sovraespressori. Utilizzando ATP come cofattore, la T4 DNA ligasi catalizza il riparo delle incisioni nel singolo filamento del dna e lega i frammenti di restrizione che hanno sia estremità piatte che sequenze terminali coesive. E' l'unica ligasi che lega efficientemente le estremità piatte in condizioni di reazione normali: infatti sembra che la attività della T4 DNA ligasi sia stimolata dalla T4 RNA ligasi.

Applicazioni

La T4 DNA ligasi è di gran lunga la DNA ligasi più utilizzata. Essa può essere utilizzata virtualmente per ogni applicazione che richieda una DNA ligasi. Molto importante è la sua efficienza nel legare le estremità piatte, una reazione che altre ligasi non riescono ad eseguire.

DNA ligasi di *Escherichia coli*

La DNA ligasi di *E. coli* è il prodotto del gene *lig*. Il gene *lig* è stato clonato e l'enzima ottenuto da ceppi che lo sovraesprimono. La DNA ligasi di *E. coli* catalizza la riparazione di nick a singolo filamento sul DNA a doppia elica e unisce i filamenti che hanno estremità omologhe e coesive. La DNA ligasi di *E. coli* non può unire estremità piatte nelle normali condizioni di reazione. A differenza delle altre ligasi essa utilizza il NAD come cofattore.

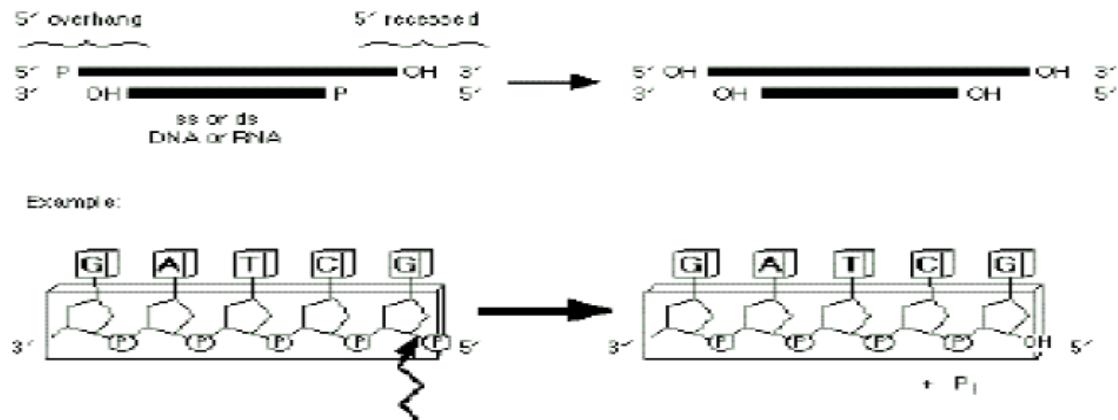
Applicazioni

La DNA ligasi di *E. coli* può essere usata in alternativa alla DNA ligasi T4 quando non sono richieste le estremità piatte. La trasformazione effettuata usando DNA legato con la DNA ligasi di *E. coli* ha un basso background da ligature errate se comparato alla DNA ligasi T4; quest'ultima ha ancora minore specificità per la struttura dell'estremità (blunt, sticky etc).

Fosfatasi e chinasi

Fosfatasi alcalina

Fosfatasi alcalina batterica (BAP) da *E. coli* e fosfatasi dell'intestino di vitello (CIP) sono state usate comunemente nella ricerca di acidi nucleici. Entrambi gli enzimi catalizzano l'idrolisi di residui di 5'-P da DNA, RNA e ribo- e deossiribonucleoside trifosfati. I prodotti defosforilati hanno un'estremità 5'-OH che può essere successivamente marcata radioattivamente usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e chinasi polinucleotide T4.



Entrambe le fosfatasi richiedono Zn^{2+} per la loro attività. La differenza principale tra i due enzimi è la stabilità: CIP è facilmente inattivato dal riscaldamento a 70°C per 10 minuti e/o dall'estrazione con il fenolo, la BAP invece è molto più resistente a questi trattamenti. Così, per più ragioni, CIP è l'enzima scelto. Inoltre CIP ha un'attività specifica più alta che BAP.

Condizioni di reazione per la BAP

Inoculare a 60°C per 30 minuti. La reazione viene bloccata con SDS e proteinasi K incubando a 37°C per 30 minuti. Poi si estrae due volte con fenolo e si precipita il DNA con etanolo.

Condizioni di reazione per la CIP

Incubare a 37°C per 30 minuti. La reazione si blocca riscaldando a 75°C per 10 minuti (la CIP è labile al calore), oppure estraendo con fenolo e precipitando con etanolo.

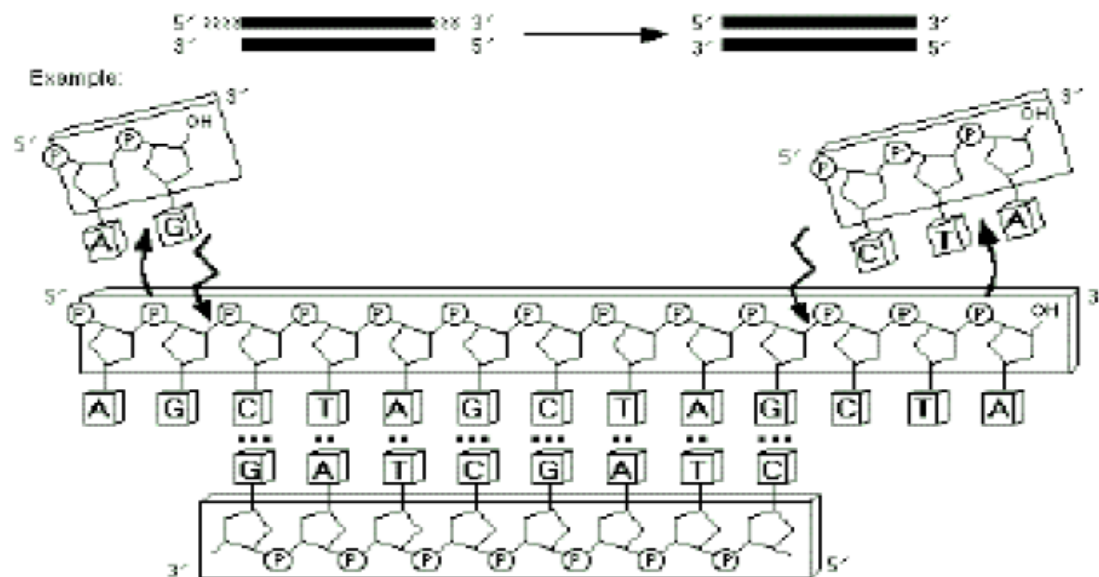
Applicazioni

1. Defosforilazione all'estremità 5' degli acidi nucleici per marcare con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e T4 polinucleotide chinasi. La marcatura del DNA al 5' con ^{32}P era usata per il sequenziamento con la procedura di Maxam-Gilbert
2. Defosforilazioni all'estremità 5' di un vettore di DNA per evitare che si leghi con se stesso.

Esonucleasi

Esonucleasi VII (exo VII)

L'esonucleasi VII proveniente da *E. coli* consiste in due subunità, i prodotti dei geni *xseA* e *xseB*. E' un'esonucleasi che lavora su singolo filamento e che agisce su entrambe le estremità del DNA. I prodotti dell'exo VII sono piccoli oligonucleotidi. Exo VII è l'unica tra le nucleasi qui discusse che non ha bisogno di Mg^{2+} . Ha attività massima in presenza di EDTA 10 mM.



Applicazioni

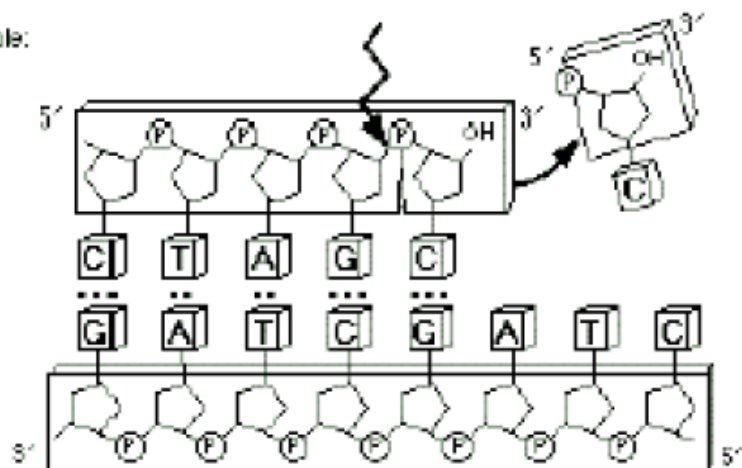
1. Mappatura delle posizioni degli introni nel DNA genomico.
2. Escissione di segmenti di DNA che sono stati inseriti nei vettori plasmide tramite il metodo di tailing di poli(dA-dT).

Esonucleasi III (exo III)

E' il prodotto del gene *xthA* di *E.coli*. E' sintetizzata dalle cellule di *E. coli* che sovraproducono la proteina. E' un enzima polifunzionale che catalizza l'idrolisi di diversi tipi di legami fosfodiesterici nel DNA a doppio filamento. La principale applicazione della *exoIII* è come specifica esonucleasi 3'-5' su doppio filamento che catalizza il rilascio di nucleotidi 5' dall'estremità 3'-OH del DNA a doppio filamento.



Example:



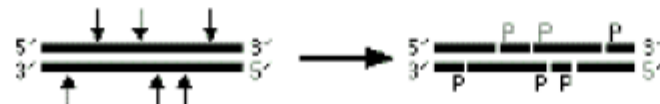
Applicazioni

1. Preparazione di sonde radioattive filamento specifiche.
2. Preparazione di templati a singolo filamento di DNA per sequenziamento.
3. Costruzione di delezioni unidirezionali, poichè *exo III* è specifica per il DNA a doppio filamento essa degraderà preferibilmente DNA duplex aventi 3'-recessed end as opposed to one with a 5'-recessed end. Questa proprietà è utile per la costruzione di un set di delezioni unidirezionali da una data posizione nel DNA clonato, che sono usate per il sequenziamento di DNA senza siti di restrizione precedentemente mappati.

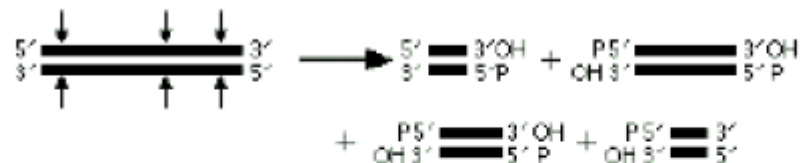
Deossiribonucleasi I (DNasi I)

Deriva dal pancreas bovino, è un'endonucleasi che degrada il DNA a doppio filamento producendo oligonucleotidi 3'-OH. L'enzima richiede cationi bivalenti. La specificità della reazione varia a seconda del tipo di catione presente. In presenza di Mg^{2+} la DNasi I produce nick non corrispondenti nei due filamenti di DNA mentre in presenza di Mn^{2+} l'enzima produce rotture corrispondenti su entrambi i filamenti.

I. Activity in the presence of Mg^{++} :



II. Activity in the presence of Mn^{++} :



Applicazioni

1. Nick translation (vedi marcatura sonde). Introduce nick su entrambi i filamenti di DNA che possono fungere da primer per iniziare la sintesi di DNA da parte della DNA polimerasi I di *E. coli*.
2. Clonaggio random di frammenti di DNA catalizzando il taglio su doppio filamento in presenza di Mn^{2+} .

Ribonucleasi

Ribonucleasi (RNAsi) con differenti specificità di sequenza sono usate per una molteplicità di scopi analitici inclusi il sequenziamento, la mappatura e la quantificazione dell'RNA. Un'applicazione comune dell'RNasi A è l'idrolisi dell'RNA che contamina le preparazioni di DNA.

Un'altra RNasi usata comunemente è l'RNasi H. Molte RNasi disponibili sono endoribonucleasi sequenza specifiche. Questa proprietà è stata sfruttata per il sequenziamento enzimatico dell'RNA. Ad esempio una combinazione di tre diverse RNasi e la nucleasi di *Staphylococcus aureus* può essere usata nella determinazione della sequenza di RNA.

Ribonucleasi A

Proviene dal pancreas bovino, è un'endoribonucleasi che idrolizza specificatamente l'RNA dopo residui C e U. Il taglio avviene tra il gruppo 3-fosfato di una pirimidina del ribonucleotide e il 5'-OH dell'adiacente nucleotide. La reazione genera un fosfato ciclico 2'-3' che viene poi idrolizzato ai corrispondenti 3'-nucleosidi fosfati.

L'attività dell'RNasi A può essere specificamente inibita da un inibitore di RNasi, una proteina isolata dalla placenta umana.

Applicazioni

1. Mappatura e quantificazione di vari RNA usando il saggio di protezione da ribonucleasi. E' usata in combinazione con l'RNasi T1.
2. Idrolisi dell'RNA che contamina preparazioni di DNA.
3. Sequenziamento di RNA.

Ribonucleasi H

Isolata da *E. coli*. E' una endoribonucleasi che idrolizza specificamente i legami fosfodiesterici dell'RNA negli ibridi RNA-DNA generando prodotti con estremità 3'-OH e 5'-P. Non degrada DNA o RNA a singolo o doppio filamento. Il taglio dell'RNasi H può essere diretto verso siti specifici tramite ibridazioni di corti deossi-oligonucleotidi con l'RNA.

Una unità è definita come la quantità di enzima che produce una nmole di ribonucleotidi solubili in acido da poly(A)-poly(T) in 20 minuti a 37°C.

Applicazioni

1. Sintesi di cDNA a doppio filamento rimuovendo il filamento di mRNA dall'ibrido RNA-DNA prodotto durante la sintesi del primo filamento di cDNA. E' anche usata nel protocollo per degradare RNA residui insieme all'RNasi A.
2. Creazione di tagli specifici in molecole di RNA usando deossioligonucleotidi sintetici per creare regioni a doppio filamento RNA-DNA.

Enzimi di restrizione

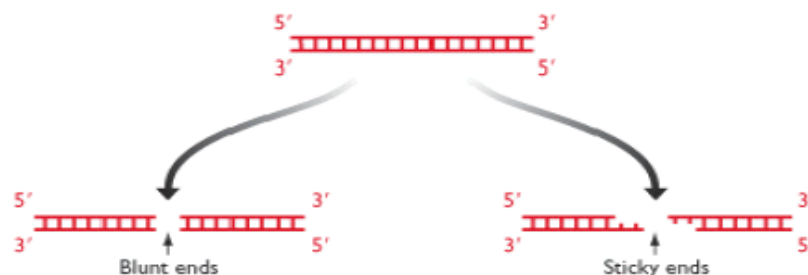
Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi che tagliano le molecole di DNA a doppio filamento in siti specifici che si trovano all'interno o adiacenti a particolari sequenze di nucleotidi chiamate siti di riconoscimento.

Gli enzimi di restrizione comunemente riconoscono sequenze di DNA palindromiche.

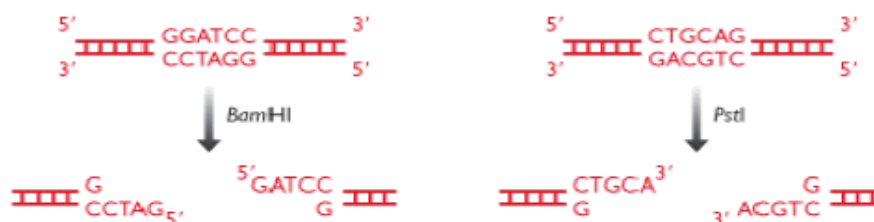
Gli enzimi di restrizione producono due diversi tipi di estremità:

- gli enzimi che tagliano entrambi i filamenti esattamente all'asse di simmetria della sequenza palindromica generano frammenti di DNA con estremità piatte (blunt ends)
- gli enzimi che tagliano ogni filamento in posizione simile ai lati opposti dell'asse di simmetria creano frammenti di DNA con estremità protruding (overhangs) a singolo filamento (sticky ends)

Blunt and sticky ends



5' and 3' overhangs



EcoR I

Description G▼AATT C
C TTAA▲G

Features

- **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications.
- **Available at High Concentration:** Cat.# R4014 and R4017 contain 25,000 and 50,000 units of EcoRI, respectively, at a concentration of 40–80u/μl.
- **Choose Your Configuration:** Learn more about our custom options for this product at: promega.com/myway/

Protocol [Restriction Enzyme Usage Information.](#)

Storage Conditions Store at –20°C.

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 400mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.15% Triton® X-100, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Source *Escherichia coli* RY 13.

Incubation Conditions Buffer H. 37°C.

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	H	MULTI-CORE™
25–50%	50–75%	50–75%	50–75%	100%	100%*

*MULTI-CORE™ Buffer is not recommended due to potential star activity.

Frequency of Cutting

λ	Ad-2	ΦX174	pUC18	M13mp18	pBR322
5	5	0	1	1	1

Notes

Star activity may be observed with glycerol concentrations >12%, enzyme:DNA ratios >25u/μg, in the absence of NaCl, in the presence of Mn²⁺, or under high pH conditions.

Additional Information

PN060/23 [Promega Notes 60 Article](#)

Related Products

[LigaseFast™ Rapid DNA Ligation System](#)

[Blue/Orange Loading Dye, 6X](#)

[Agarose, LE, Analytical Grade](#)

[Ethidium Bromide Solution, Molecular Grade](#)

[Lambda DNA/EcoRI Markers](#)

Isolamento del DNA genomico

Il protocollo di isolamento e purificazione del DNA genomico dipende dall'organismo e quindi dalle caratteristiche delle cellule da cui si intende ottenerlo.

•I batteri (procarioti) sono privi di nucleo, il genoma è costituito solitamente da un singolo cromosoma presente nel citoplasma e la cellula possiede una parete cellulare.

•Nelle cellule eucariote il materiale genetico è contenuto nel nucleo e la cellula può avere la parete cellulare (cellule vegetali) o non averla (cellule animali).

Purificazione del DNA genomico da procarioti

Tutti i protocolli di purificazione del DNA genomico dei procarioti si basano sulla differenza di solubilità comportamento in relazione alla forza ionica della soluzione del DNA genomico rispetto a quello plasmidico.

I protocolli più utilizzati prevedono inizialmente la lisi delle cellule seguita dalla degradazione e dall'allontanamento del RNA e delle proteine per mezzo di RNAasi e proteasi ed estrazione con fenolo-cloroformio.

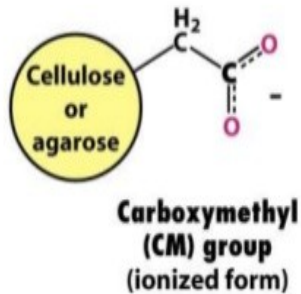
Il DNA genomico viene quindi separato da quello plasmidico mediante precipitazione frazionata con etanolo o mediante l'utilizzo di resine a scambio anionico.

Cromatografia a scambio ionico

Ion exchangers – Functional groups

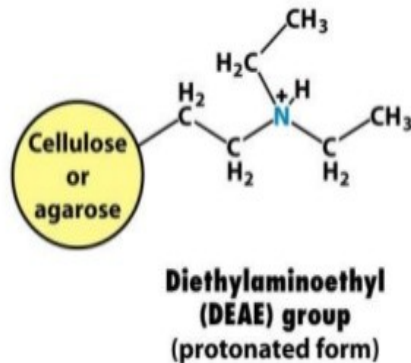
Cation exchanger

- ▶ Methylsulfonate(S-)
- ▶ Sulphopropyl (SP-)
- ▶ Carboxymethyl (CM-)

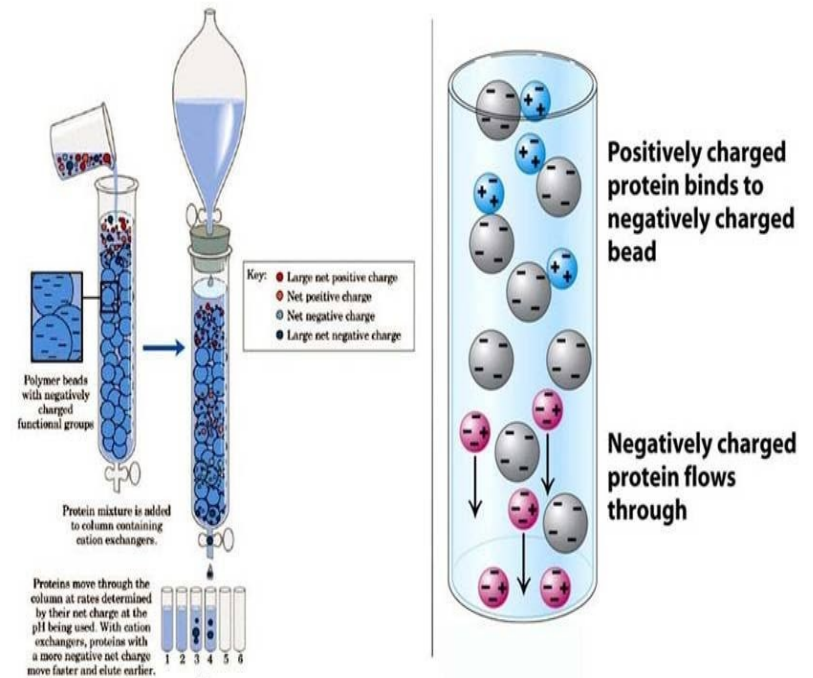


Anion exchanger

- ▶ Quaternary aminoethyl (QAE-)
- ▶ Diethylaminopropyl (DEPE-)
- ▶ Diethylaminoethyl (DEAE-)

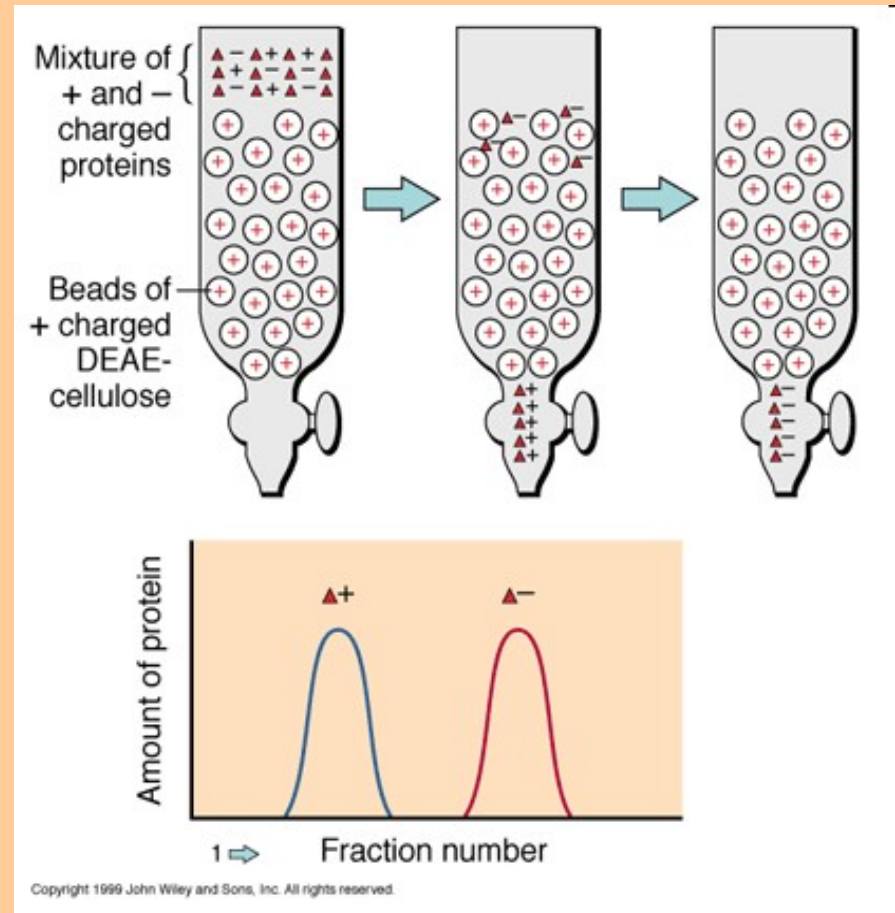


Ion Exchange Chromatography Principle



Cromatografia a scambio anionico

La fase stazionaria (resina) contiene gruppi carichi positivamente (ammine quaternarie). In condizioni di bassa forza ionica, il DNA con elevata carica negativa si lega per interazione elettrostatica alla resina mentre gli altri componenti neutri o carichi positivamente non si legano. Cambiando il pH o la forza ionica della soluzione si ha l'eluizione del DNA stesso.



Isolamento del RNA totale

RNA normalmente è costituito da un filamento singolo → molto meno stabile del DNA, si degrada facilmente anche per l'azione degli enzimi ad attività RNAsica rilasciati in seguito alla lisi cellulare.

La purificazione del RNA viene condotta lavorando sempre a bassa temperatura (4 °C) e con soluzioni trattate con DEPC (dietilpirocarbonato, inibitore delle RNAsi).

Il protocollo comunemente utilizzato prevede la lisi cellulare mediante trattamento con detergenti o omogenizzazione meccanica (macinazione in azoto liquido nel caso di materiale vegetale) ed il trattamento con un TRIZOL, un composto a base fenolica in grado di inattivare gli enzimi degradativi (RNAsi) e capace di denaturare e far precipitare la maggior parte dei componenti cellulari ed in particolare le proteine ed il DNA.

Al campione viene aggiunto cloroformio e centrifugato, ed il surnatante (fase acquosa) trattato con DNAsi per eliminare il DNA eventualmente presente.

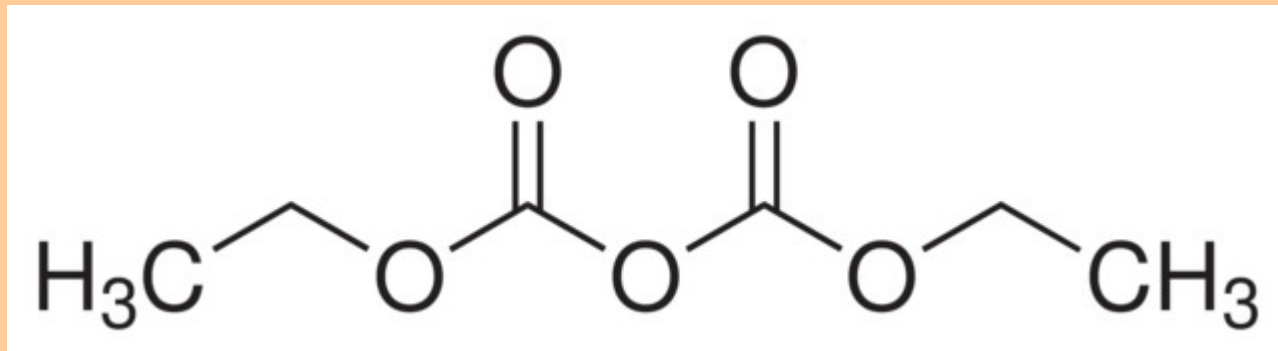
Si effettua quindi un trattamento con la miscela fenolo-cloroformio per rimuovere ulteriormente i contaminanti ed infine l' RNA viene precipitato aggiungendo etanolo.

L'RNA purificato viene quindi risospeso in acqua DEPC.

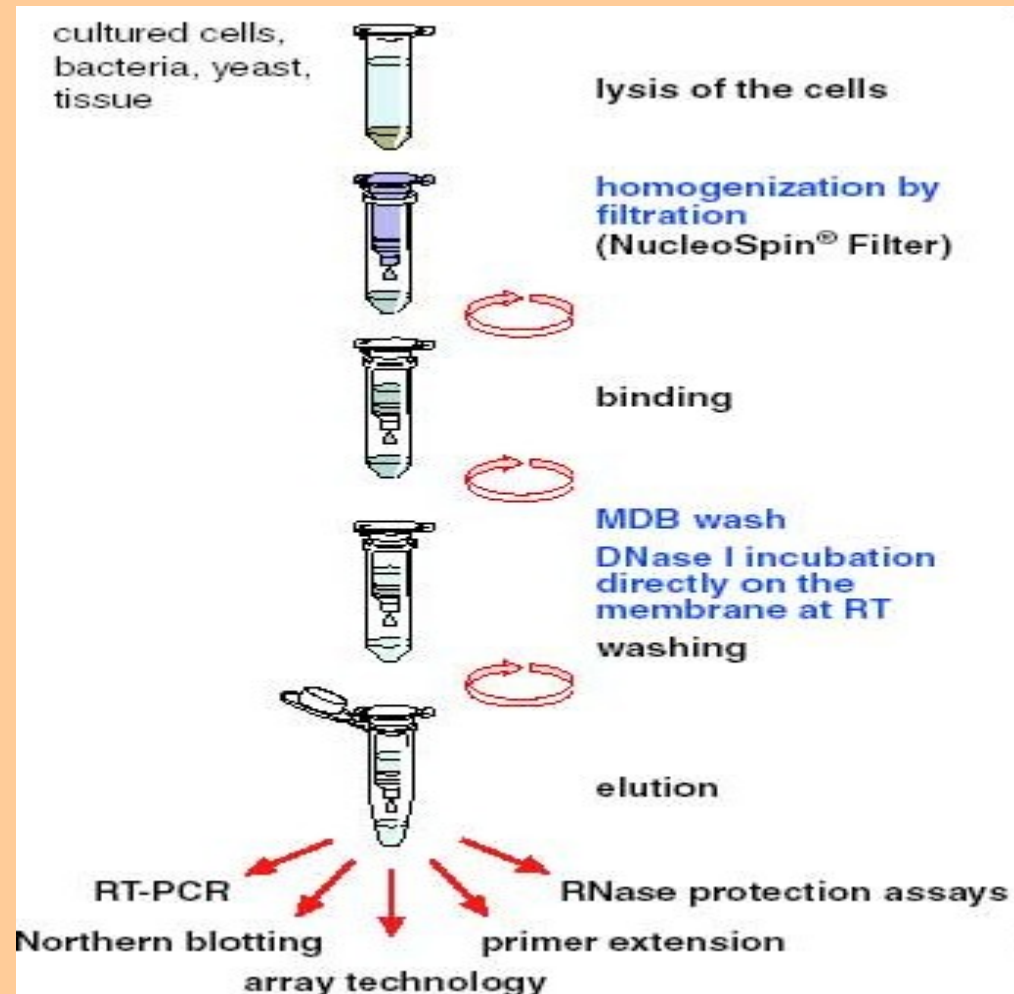
TRIZOL



Diethylpyrocarbonate (DEPC)



Esistono anche in questo caso dei kit commerciali che si basano sull'utilizzo di resine in grado di legare l'RNA e che di solito garantiscono una resa più alta ed un prodotto finale più puro.



Quantificazione del DNA

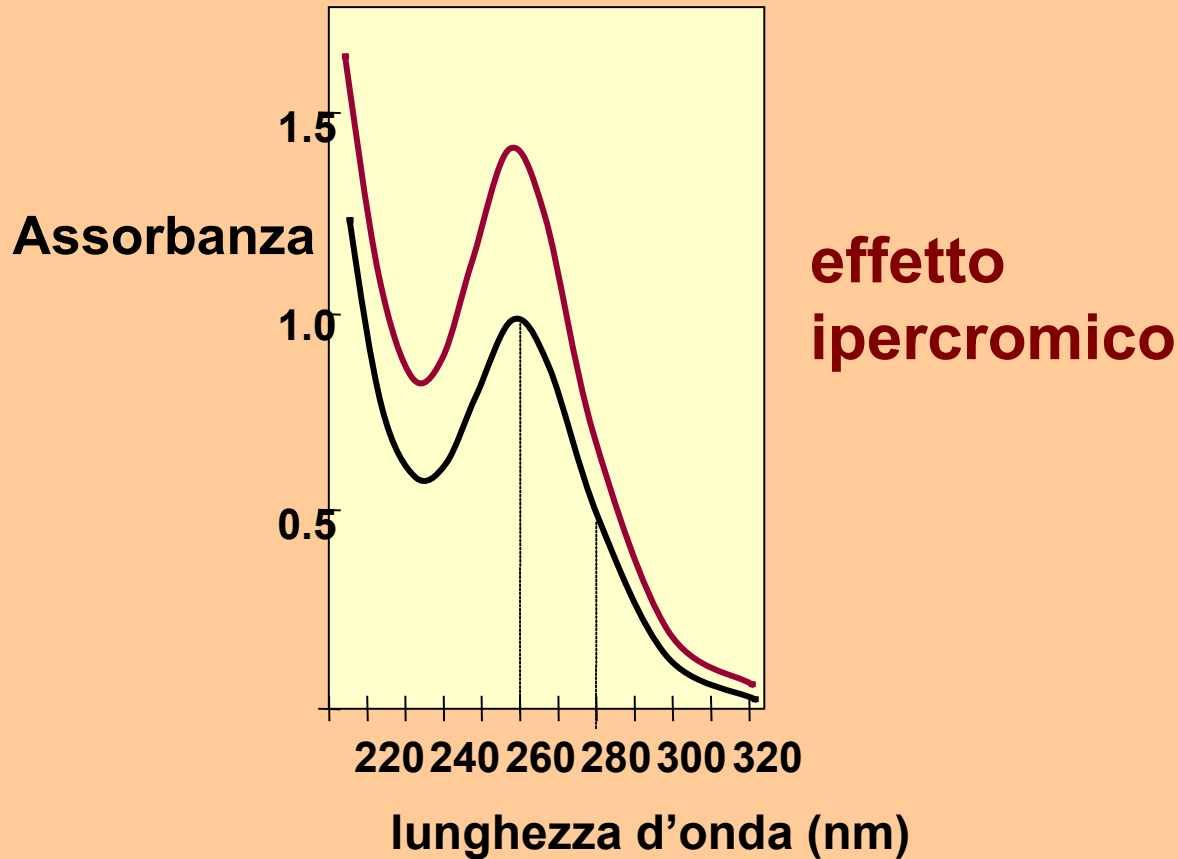
- **Direttamente da gel di agarosio: quantità minima rilevabile: circa 10 ng.**

- **Assorbimento a 260 nm: 1 unità di assorbanza:**

DNA a doppia elica: 1 Unità assorbimento = 50ug/ml

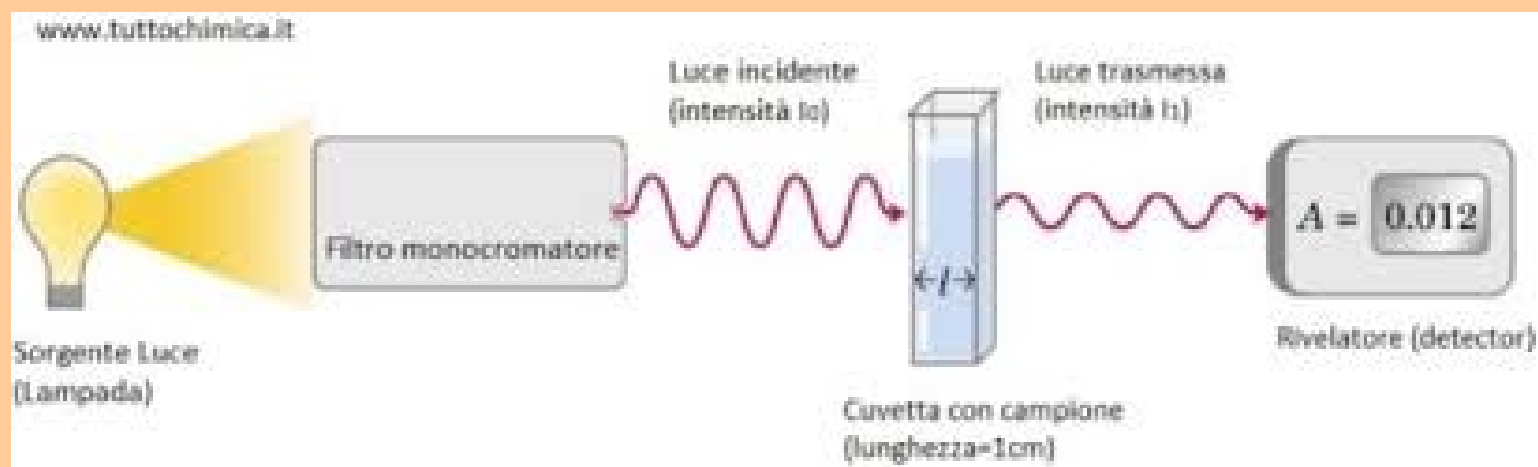
Concentrazione DNA (ug/ml) = $A_{260\text{nm}}$ x 50ug/ml

Spettro di assorbimento del DNA

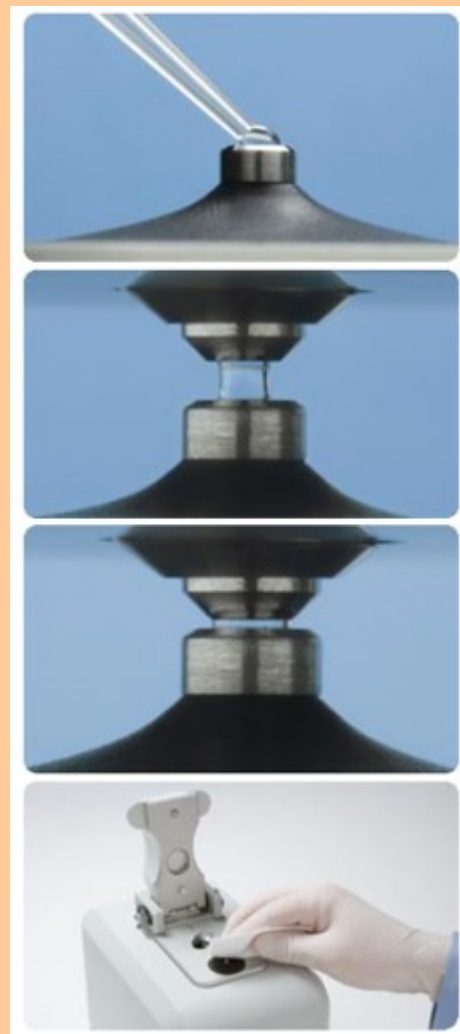


Per determinare la purezza del campione si calcola il rapporto tra l'assorbimento a 260 nm (DNA) e a 280 nm (proteine). In una preparazione pura questo rapporto è > 1.7 .

SPETTROFOTOMETRO



SPETTROFOTOMETRO NANODROP



Quantificazione del RNA totale e del DNA mediante Spettroscopia UV

Spettrofotometro a cuvetta:

- 1) Diluire 1:20 il campione di RNA in acqua (volume finale 500 uL) in una eppendorf pulita.
- 2) Dopo aver registrato il bianco, acquisire lo spettro di assorbimento tra 230 e 400 nm.
- 3) Calcolare la quantità di RNA ($A=1 \rightarrow 40 \text{ ng/ul}$) e la sua purezza (rapporto A_{260}/A_{280}) tenendo conto delle diluizioni.

Spettrofotometro nanodrop:

Si misurerà la concentrazione del pUC18 (miniprep della prima esperienza)

- 1) Depositare una goccia (2 uL) di acqua sul tip del nanodrop.
- 2) Abbassare delicatamente il braccio e registrare il bianco.
- 3) Sollevare il braccio, asciugare il tip con della carta assorbente.
- 4) Depositare una goccia (2 uL) di campione sul tip del nanodrop.
- 5) Abbassare delicatamente il braccio e registrare lo spettro.
- 6) Calcolare la quantità di RNA ($A=1 \rightarrow 40 \text{ ng/ul}$) e la sua purezza (rapporto A_{260}/A_{280})

Congelare l'RNA non diluito ed il plasmide pUC18.