

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Informatica
Corso di laurea in Bioinformatica

Relazioni di Laboratorio di Biologia Molecolare

Docente

Prof. Stefano Capaldi

Studenti

***Elisa Biasi
Irene Greco
Mattia Frigiola***

Anno Accademico 2022-2023

Indice

1	Miniprepazione del DNA plasmidico	1
1.1	Materiali e composti utilizzati	1
1.2	Protocollo	1
A	Preparazione del campione	1
B	Depurazione del campione	1
C	Trattamento con fenolo-cloroformio	2
D	Conservazione del DNA plasmidico	2

1 Miniprepazione del DNA plasmidico

1.1 Materiali e composti utilizzati

Strumentazione

- Pipette Eppendorf da 1.5 e 2.5 mL
- Propipette
- Vortex
- Centrifuga
- Freezer

Composti utilizzati

- **Coltura batterica** di batteri resistenti alla amoxicillina (antibiotico)
- **Soluzione I:** soluzione contenente EDTA, composto chelante che ha il compito di disattivare la DNAsi tramite la sottrazione degli ioni magnesio Mg^{+}
- **Soluzione II:** contenente NaOH e SDS (Laurilsolfato di sodio). L'NaOH provoca la rottura delle cellule, la denaturazione e precipitazione delle molecole di DNA mentre SDS provoca la denaturazione delle proteine tramite la rottura dei legami intermolecolari tra cui legami a idrogeno e interazioni idrofobiche
- **Soluzione III:** contenente acetato di potassio ($CH_3COO^{-}K^{+}$), il quale riporta il lisato cellulare a pH che consente la rinaturazione del DNA plasmidico ma non di quello cromosomico a causa delle dimensioni maggiore
- **Soluzione fenolo:cloroformio:** miscela di fenolo saturo e cloroformio in rapporto 1:1. Essendo che è una soluzione molto volatile si aggiunge isoamilico, il quale crea una fase al disopra della soluzione riducendo la possibilità di evaporare.
- **Soluzione di etanolo** (100 e 70 % v\ v)
- **Soluzione di TE:** contenete Tris ed EDTA

1.2 Protocollo

A Preparazione del campione

1. Prelevare 1.5 mL di coltura batterica sotto la cappa biologica ([Figura 1 e 2](#)).
2. Centrifuga per 30 secondi la cultura per far si che si creino due fasi: la fase liquida contenente il terreno di coltura ([Figura 4](#)), che verrà eliminata, e la fase solida, ovvero il pellet batterico, dove sono contenuti i nostri batteri ([Figura 3](#))

B Depurazione del campione

1. Aggiungere 100 μ L di Soluzione I al pellet batterico ([Figura 5](#))
2. Mescolare la soluzione tramite il vortex
3. Aggiungere 200 μ L di Soluzione II e mescolare capovolgendo la provetta 2 o 3 volte. In questa fase, la soluzione alcalina provoca la lisi delle cellule e la denaturazione e precipitazione del DNA batterico ([Figura 6](#))
4. Aggiungere 150 μ L di Soluzione III dopo 2-3 min dalla Soluzione II e mescolare capovolgendo la provetta 2 o 3 volte.

5. Centrifuga per 5 min in modo che i residui cellulari e il DNA cromosomico precipitino ([Figura 7](#)). Prelevare la frazione liquida e travasarla in una nuova provetta ([Figura 8](#))

La soluzione ottenuta non contiene DNA plasmidico puro perché contaminato da proteine, oltre a essere stato molto diluito durante le fasi precedenti. Per la purificazione dalle proteine si esegue un trattamento con fenolo-cloroformio.

C Trattamento con fenolo-cloroformio

1. Aggiungere 1 volume (500 μ L) di fenolo-cloroformio per estrarre le proteine ([Figura 10](#)).
2. Centrifuga la soluzione per 3 min, si creeranno due fasi: quella inferiore composta da fenolo-cloroformio e quella superiore con il DNA plasmidico
3. Recuperare la fase acquosa contenente il DNA plasmidico ([Figura 11](#))
4. Aggiungere 2 volumi di etanolo 100 % ([Figura 12](#))
5. Mettere la soluzione ottenuta in freezer a -20°C per favorire la precipitazione del DNA e poi centrifugare per 5 min ([Figura 13](#)). Si ottiene un precipitato biancastro contenente il DNA plasmidico
6. Rimuovere la fase alcolica all'interno della cappa chimica ([Figura 14](#))
7. Lavare il precipitato con etanolo 70 % per eliminare i sali presenti e centrifugare per 5 min
8. Rimuovere completamente l'etanolo prima con una micropipetta e poi facendo seccare all'aria per far evaporare eventuali residui

D Conservazione del DNA plasmidico

1. Per risospendere il DNA plasmidico, aggiungere 50 μ L di TE pH 8 per evitare la degradazione del DNA da parte delle DNAsi ([Figura 15](#))
2. Conservare la soluzione concentrata di DNA plasmidico a -20°C



Figura 1:
Prelevamento della
coltura batterica



Figura 2:
Coltura batterica



Figura 3:
Batteri Precipitati



Figura 4:
Batteri senza terreno



Figura 5:
Aggiunta Soluzione I



Figura 6:
Aggiunta soluzione II



Figura 7:
Centrifuga Soluzione III



Figura 8:
DNA e proteine di scarto

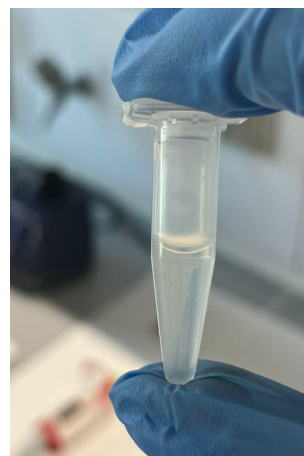


Figura 9:
DNA plasmidico in
soluzione

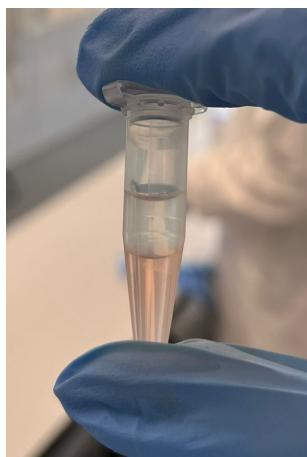


Figura 10:
Aggiunta cloroformio



Figura 11:
Recupero fase
superiore DNA

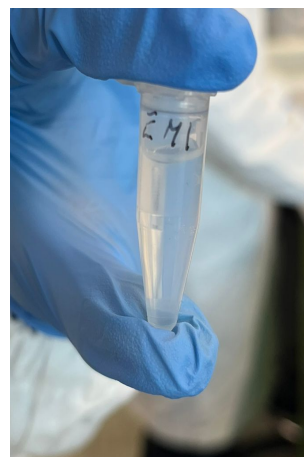


Figura 12:
Aggiunta di
etanolo 100 %



Figura 13:
Centrifuga dopo
aggiunta di etanolo 100 %

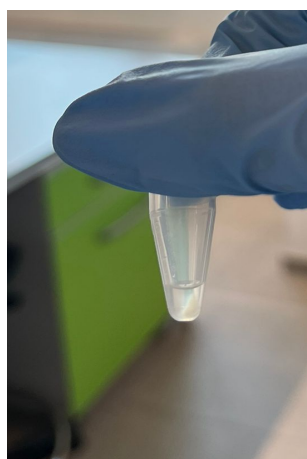


Figura 14:
Rimozione etanolo 100 %



Figura 15:
DNA plasmidico in
soluzione di TE