

Contents

1	Miniprep - Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina	2
1.1	Introduzione - Contesto	2
1.2	Obiettivo	2
1.3	Strumentazione	2
1.4	Soluzioni e reagenti	2
1.5	Procedura	3
1.6	Conclusioni	5

1 Miniprep - Preparazione di DNA plasmidico tramite lisi alcalina

1.1 Introduzione - Contesto

Questa procedura, sviluppata negli anni '70, si è diffusa rapidamente grazie alla sua capacità di fornire DNA plasmidico puro e pronto per numerose applicazioni, come la clonazione, la trasformazione batterica o il sequenziamento. I plasmidi, piccoli anelli di DNA autonomamente replicanti, sono i veicoli ideali per trasportare geni di interesse e manipolare l'informazione genetica a scopi sperimentali o industriali.

1.2 Obiettivo

L'esperimento mira a estrarre il DNA plasmidico in forma pura, separandolo da componenti cellulari come proteine, RNA e DNA genomico al fine di ottenere un campione adatto a successive analisi molecolari.

1.3 Strumentazione

- Micropipette e puntali sterili
- Provette Eppendorf (1.5-2 ml)
- Centrifuga da banco
- Vortex
- Congelatore o ghiaccio secco

1.4 Soluzioni e reagenti

- Soluzione I: per risospendere il pellet batterico (spesso contiene Tris, EDTA e glucosio)
- Soluzione II: per la lisi cellulare (NaOH e SDS, potente detergente)
- Soluzione III: tampone di neutralizzazione (acetato di potassio, a pH acido)
- Etanolo 100% o isopropanolo: per precipitare il DNA
- Etanolo 70%: per lavaggi finali
- Tampone TE (Tris-EDTA): per la risospensione del DNA plasmidico
- RNAasi (opzionale): per degradare eventuale RNA contaminante

1.5 Procedura

1. Raccogli circa 1,5 ml di coltura batterica fresca, cresciuta preferibilmente overnight.

- Centrifuga per 30 secondi a 12.000 rpm
- Capovolgi il tubo ed elimina il supernatante.

Accorgimento: È preferibile utilizzare una coltura batterica in fase esponenziale (12-16h e non oltre 24h) in quanto:

- Le cellule vitali presentano una maggiore concentrazione di plasmide.
- Una coltura stazionaria o in declino presenta una maggiore concentrazione di enzimi degradativi

2. Centrifuga e rimozione supernatante

Obiettivo: Separare le cellule dal terreno di coltura, concentrandole nel pellet.

- Centrifuga per 30 secondi a 12.000 rpm.
- Capovolgi il tubo ed elimina il supernatante.

3. Risospensione in Soluzione I

- Aggiungi 100 µl di Soluzione I al pellet batterico e mischia usando il puntale di una pipetta o un vortex.

Accorgimento: in questa fase le cellule sono ancora integre, quindi è possibile mixare vigorosamente senza rischiare di romperle; tuttavia, è preferibile evitare la formazione di bolle, poiché potrebbe impattare sugli step successivi.

Perché: la Soluzione I contiene un tampone (Tris) che stabilizza il pH, EDTA che chela i cofattori metallici delle nucleasi (proteggendo così il DNA) e glucosio che mantiene la tonicità e la stabilità delle cellule.

4. Lisi cellulare

Obiettivo: rompere la membrana cellulare e denaturare proteine e acidi nucleici, generando un lisato cellulare viscoso e biancastro.

- Aggiungi 200 µl di Soluzione II al campione e mescola delicatamente capovolgendo il tubo due o tre volte.

Accorgimento: mescola lentamente e con cautela; evita l'uso del vortex per non rompere meccanicamente le molecole di DNA plasmidico, che in questa fase sono particolarmente fragili.

Perché: l'SDS solubilizza le membrane e le proteine, mentre NaOH denatura DNA genomico e plasmidico.

5. Neutralizzazione rapida

Obiettivo: Neutralizzare la soluzione alcalina per permettere la rinaturazione selettiva del DNA plasmidico.

- Aggiungi 150 µl di soluzione III e mescola delicatamente capovolgendo due o tre volte la provetta, evitando l'uso del vortex.

Accorgimento: La Soluzione III contiene acetato di potassio a pH acido, che abbassa rapidamente il pH del lisato. Questo consente solo al DNA plasmidico (corto e superavvolto) di rinaturarsi selettivamente.

Criticità: Esegui questa operazione entro 2-3 minuti dall'aggiunta della Soluzione II. Un intervallo più lungo favorisce la rinaturazione anche del DNA genomico, riducendo la selettività e la purezza del DNA plasmidico.

6. Centrifugazione per separazione del surnatante

Obiettivo: Separare il pellet (residui cellulari, DNA genomico e proteine precipitate) dal surnatante contenente il DNA plasmidico.

- Centrifuga la provetta a massima velocità (14.000 rpm) per 5 minuti.
- Trasferisci il surnatante in una nuova provetta, evitando di disturbare il pellet.

Accorgimento: Non prelevare più di 500 µl di surnatante per facilitare le fasi successive di precipitazione con etanolo.

7. Precipitazione del DNA con etanolo/isopropanolo e incubazione a freddo

Obiettivo: Concentrare e isolare il DNA plasmidico dal surnatante, formando un pellet visibile.

- Aggiungi al surnatante 2 volumi di etanolo 100% oppure 0.6 volumi di isopropanolo.
- Capovolgi delicatamente la provetta per favorire il contatto del DNA con l'alcol.
- Incuba a -20°C per circa 20 minuti per facilitare la formazione del pellet.

Perché: L'alcol riduce la solubilità del DNA, favorendone la precipitazione e la formazione del pellet. L'isopropanolo può essere preferito perché richiede volumi minori, ma entrambi gli alcoli funzionano efficacemente.

Perché (basse temperature): Le basse temperature riducono la solubilità degli acidi nucleici negli alcoli, favorendo la formazione di un pellet più compatto e visibile.

8. Centrifugazione a 12000g per 5 minuti

Obiettivo: Separare i detriti cellulari dal surnatante contenente il DNA plasmidico.

- Centrifuga a 12.000g per 5 minuti.
- Osserva la formazione di un pellet bianco sul fondo della provetta.

Criticità: Un pellet mucillaginoso o vischioso può indicare contaminazione da polisaccaridi o RNA, che potrebbe compromettere la purezza del DNA plasmidico.

9. Rimozione del supernatante e lavaggio con etanolo 70% v/v

Obiettivo: Eliminare residui di sali e impurità idrosolubili dal pellet di DNA plasmidico per ottenere un campione più puro e privo di contaminanti.

- Rimuovi con cautela il supernatante.
- Aggiungi 500 µl di etanolo al 70% v/v e capovolgi delicatamente la provetta per lavare il pellet.

10. Rimozione completa dell'etanolo e asciugatura all'aria

Obiettivo: Eliminare completamente l'etanolo residuo dal pellet di DNA plasmidico per garantire un'adeguata risospensione.

- Rimuovi l'etanolo con cautela senza disturbare il pellet.
- Lascia il tubetto aperto all'aria per circa 10 minuti.

Criticità: Tracce residue di etanolo possono precipitare nuovamente il DNA plasmidico, rendendolo difficile da risospendere e quindi riducendo la resa finale.

11. Risospensione del DNA plasmidico in tampone TE pH 8.0

Obiettivo: Riprendere il pellet di DNA plasmidico dopo il lavaggio, solubilizzandolo in un tampone adatto alla conservazione e alla successiva manipolazione.

- Aggiungi circa 50 µl di tampone TE (Tris-EDTA) pH 8.0 al pellet di DNA plasmidico.
- Mescola delicatamente o pipetta su e giù per favorire la risospensione completa del DNA.

Perché: Il tampone TE protegge il DNA dalla degradazione grazie all'EDTA, che chela ioni metallici (ad esempio Mg^{2+}) necessari per l'attività delle DNasi. Il pH 8.0 è ottimale per la stabilità del DNA e la prevenzione dell'attività nucleasica.

12. Conservazione a 4 °C

Obiettivo: Conservare il DNA plasmidico in modo sicuro e stabile, minimizzando il rischio di degradazione.

Perché: Conservare il DNA a basse temperature rallenta l'attività enzimatica delle DNasi e altri enzimi potenzialmente contaminanti, proteggendo l'integrità del campione.

Perché (in acqua a -20 °C): In assenza di EDTA, le DNasi possono degradare il DNA anche a 4 °C; per questo, il DNA disciolto in acqua deve essere conservato a -20 °C per disattivare o rallentare drasticamente le nucleasi.

1.6 Conclusioni

L'esperimento di miniprep ha permesso di ottenere DNA plasmidico in forma pura, pronto per successive esperienze. La procedura, basata sulla lisi alcalina e la neutralizzazione selettiva, ha garantito la separazione del DNA plasmidico da contaminanti cellulari. Questo protocollo consente, se eseguito correttamente, di ottenere DNA plasmidico idoneo a clonazione, trasformazione batterica e sequenziamento.