



Modello didattico Colombo

anno scolastico 2011-2012

Estrazione del DNA dalla frutta

1. Introduzione

L'obiettivo di questa esperienza è quello di osservare la molecola degli acidi nucleici, una volta separata dall'involucro cellulare in cui è contenuta all'interno della cellula.

Il campione biologico di partenza da cui estrarremo il DNA potrebbe essere di vario tipo, ma, per la facile reperibilità e la semplicità di lavorazione, useremo della frutta, in particolare della polpa di banana.

Questa esperienza si articola in tre fasi:

a) Demolizione della struttura cellulare: in questa prima fase dobbiamo trattare la polpa della frutta in modo da disgregare la struttura cellulare.

E' necessario liberare il DNA e l'RNA dall'involucro nucleare. Per permettere al DNA di uscire dalla cellula e di srotolarsi senza perdere la struttura ad elica, occorre sia demolire pareti e membrane cellulari, che allontanare le proteine attorno alle quali il filamento di DNA si avvolge e si ripiega ripetutamente su se stesso.

b) Digestione delle proteine: il DNA all'interno del nucleo è legato ed associato a proteine che contribuiscono a determinarne la struttura: gli istoni. Per isolarlo occorre distruggere queste proteine.

c) Precipitazione del DNA: una volta ottenuto il DNA libero in soluzione lo separeremo sfruttando la sua proprietà di precipitare in etanolo. Un soluto precipita quando non riesce più a stare in soluzione, cioè a mescolarsi in modo omogeneo con le molecole del solvente. Il DNA non è solubile in etanolo, quindi l'aggiunta di etanolo fa sì che il DNA precipiti, cioè si addensi in una gelatina trasparente o biancastra.

2. Materiali

- 100 g di frutta a polpa morbida (es: banana, kako, kiwi)
- soluzione di estrazione:
NaCl (cloruro di sodio) (3 g),
detergente per i piatti (10 ml),
H₂O distillata,
carta da filtro.
- soluzione digestiva:
succo di ananas (1 ml per 5 ml di estratto cellulare),
etanolo puro freddo (6 ml per 6 ml di estratto + succo di ananas)
- provette da 15 ml possibilmente di vetro trasparente
- 2 becker da 150-200 ml
- cilindro graduato da 100 ml
- cilindro graduato da 10 ml
- pipette da 10 ml
- termostato a 60° C

- ghiaccio e relativi contenitori
- contenitori e cucchiaini per tagliare e pestare la frutta
- imbuto

3. Procedimento

a) Demolizione della struttura cellulare

1. Pesare 3 g di cloruro di sodio e metterli nel cilindro graduato da 100 ml (il cloruro di sodio, NaCl, dissociato negli ioni Na^+ e Cl^- , agirà sugli istoni, le proteine legate al DNA. La presenza di cariche elettriche denatura la struttura delle proteine cambiandone la disposizione spaziale)
2. Preparare 10 ml di detergente e versarli nel cilindro con il cloruro di sodio (il detergente agirà sulle membrane cellulari, sia sulla membrana esterna della cellula, la membrana plasmatica, sia sulla membrana del nucleo, all'interno del quale è contenuto il DNA)
3. Aggiungere acqua distillata fino ad un volume di 100 ml e agitare bene per sciogliere il sale
4. Prendere circa 100 g di polpa di banana e schiacciarla con una forchetta
5. Versare la poltiglia nel becker da 250 ml
6. Aggiungere la soluzione di estrazione
7. Mettere il becker nel termostato a 60°C (in alternativa si può utilizzare acqua riscaldata su un fornello elettrico, avendo cura di controllare la temperatura con un termometro al fine di mantenere una temperatura costante) per 15 min (l'alta temperatura facilita la rottura delle membrane e disattiva gli enzimi che attaccano il DNA. In condizioni normali infatti, in caso di rottura della cellula, vengono immediatamente attivati questi enzimi che demoliscono la molecola del DNA) **(NON NECESSARIO)**
8. Raffreddare il preparato in ghiaccio (è necessario accelerare il raffreddamento con l'utilizzo del ghiaccio poiché l'alta temperatura, protratta per troppo tempo, può causare la rottura dei legami che caratterizzano la molecola del DNA) **(NON NECESSARIO)**
9. Filtrare con imbuto e filtro il preparato in un becker pulito

b) Digestione delle proteine

1. Prelevare 5 ml di filtrato e porlo in una provetta da almeno 15 ml
2. Aggiungere 1 ml di succo d'ananas ed agitare bene (nel succo d'ananas è contenuta la bromelina, sostanza che demolisce le proteine e che libererà definitivamente il DNA dagli istoni)
3. Attendere pochi minuti in modo che la bromelina agisca sulle proteine degradandole

c) Precipitazione del DNA

1. Prendere 6 ml di etanolo freddo (è sufficiente porre l'alcol in freezer per un'ora)
2. Versare l'etanolo freddo molto lentamente e lungo il bordo della provetta facendo in modo che etanolo e soluzione non si mescolino (l'etanolo è più leggero dell'acqua quindi "galleggerà" sopra la soluzione, si hanno quindi due fasi: in alto l'etanolo più leggero, in basso l'estratto cellulare con il DNA in soluzione)
3. Sul momento si formano bollicine di gas (l'abbassamento della temperatura determinato dall'etanolo freddo causa la liberazione dei gas contenuti nell'estratto cellulare, prima disciolti) dopodiché, una volta esaurito questo fenomeno, sarà possibile osservare nell'interfaccia acqua-alcol una sostanza trasparente che si forma e che va via via aumentando: questa sostanza rappresenta il DNA.

4. Risultati

Il DNA precipitato nell'etanolo appare come una "medusa" (viene detto infatti Jellyfish, termine inglese che significa appunto medusa) trasparente e ben visibile ad occhio e che aumenta con il passare del tempo.

Il DNA è molto solubile in acqua (per questo nell'estratto cellulare non è visibile) ma quando entra in contatto con l'etanolo, nel quale non può esistere disciolto, precipita, cioè si condensa in una sostanza gelatinosa visibile a occhio nudo. Questo accade nel punto di contatto tra l'estratto

cellulare e l'etanolo e la quantità di DNA precipitato aumenta perché il DNA disciolto nell'estratto cellulare viene trascinato in alto verso l'etanolo dalle bollicine dei gas disciolti nella soluzione che vengono liberati per effetto della bassa temperatura.