

INGEGNERIA GENETICA

Isolamento e purificazione del DNA genomico:

Il primo passo di qualunque tecnica di biologia molecolare consiste nell'isolare e purificare gli acidi nucleici (DNA e RNA).

1. Il materiale biologico di partenza;
2. Ottenere un estratto cellulare (rottura parete e/o membrana);
3. Purificazione del DNA dall'estratto cellulare;
4. Concentrazione del DNA.

1) Per prima cosa è necessario procurarsi il materiale biologico da un campione che può essere:

-una coltura di cellule batteriche o eucariotiche: separazione dal mezzo di

coltura mediante centrifugazione.

-campione di tessuto (fresco o congelato a -20°C o a -195°C in azoto liquido per evitare la degradazione da parte di enzimi presenti nelle cellule, che vengono così inattivati): frazionamento ed omogeneizzazione del tessuto.

2) Per ottenere l'ESTRATTO CELLULARE è necessario procedere alla lisi delle cellule, affinché queste rilascino i loro componenti cellulari. In funzione dei diversi tipi cellulari, vengono utilizzati metodi diversi:

CELLULE BATTERICHE	CELLULE ANIMALI(tessuto)
<p>È necessario rompere la parete batterica mediante trattamento con:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Il LISOZIMA idrolizza il legame glicosidico del peptidoglicano (è presente nell'albumina dell'uovo, nelle lacrime, come difesa degli occhi contro le infezioni batteriche); • l'EDTA (acido etilen-diammino-tetraacetico) è un agente chelante che sequestra i cationi bivalenti (Mg^{2+}) necessari per la stabilizzazione delle membrane (e per l'attività di molti enzimi tra cui la DNasi); • l'SDS (detergente anionico: sodio dodecil solfato) solubilizza i lipidi delle membrane e lega le proteine alterandone la struttura secondaria. 	<p>Non hanno una parete. Per un campione di tessuto è necessaria un iniziale trattamento a -20°C o in azoto liquido in modo da disgregarlo e una successiva OMOGENIZZAZIONE che è realizzata mediante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metodi meccanici: <ul style="list-style-type: none"> ✓ omogenizzatore a pestello (potter); ✓ Vibrazioni ultrasoniche; ✓ Congelamento/scongelamento; • l'EDTA è un agente chelante che sequestra i cationi bivalenti necessari per la stabilizzazione delle membrane (e per l'attività di molti enzimi tra cui la DNasi); • Le membrane delle cellule animali sono solubilizzate con detergenti blandi quali SDS.

3) Purificazione del DNA dall'estratto cellulare -> eliminare le proteine dal lisato. La centrifugazione ci permette di separare il particolato dal DNA+lisato. Per la purificazione si può procedere in due modi differenti.

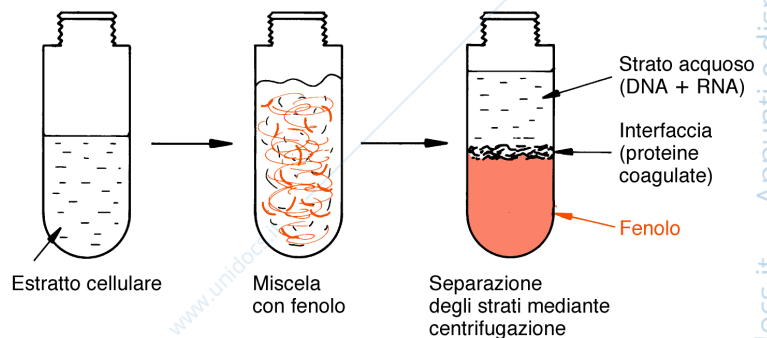
Uso di ENZIMI PROTEOLITICI:

- **PRONASI**: miscela di almeno 4 enzimi proteolitici di cui due endopeptidasi (serina- e metallo-proteasi) e due esopeptidasi (carbossi e ammino-petidasi).
- **PROTEINASI K**: è chiamata così per il suo potere di idrolizzare la cheratina (K), è una endopeptidasi di origine fungina. La rimozione degli ioni Ca^{2+} determina la perdita dell' 80% della sua attività enzimatica, ma l'attività residua è comunque sufficiente a degradare le proteine che contaminano gli acidi nucleici. Pertanto la digestione può essere condotta in presenza di EDTA, necessario per inattivare le DNasi.

Utilizzo RNAsi in modo da eliminare RNA.

Otteniamo per centrifugazione 3 fasi:

- 1) SUPERIORE: contiene la soluzione di acidi nucleici;
- 2) INTERFASE: proteine denaturate;
- 3) INFERIORE: fase fenolica contenente lipidi e proteine ricche di aminoacidi idrofobici.



4) CONCENTRAZIONE DEL DNA

Prendiamo la fase superiore e la trasferiamo su una eppendorf. A questo punto la soluzione di acidi nucleici è trattata con ALCOLI per essere concentrata. (le proteine sono insolubili in alcol e co-precipiterebbero se non fossero state rimosse in precedenza).

- Soluzione di acidi nucleici+2 volumi di ETANOLO ASSOLUTO+ CATIONI MONOVALENTI (Na^+ , K^+ , NH_4^+).

Si lascia precipitare il tutto a $-80^{\circ}C$.

- Per la precipitazione può essere utilizzato anche ISOPROPANOLO (volumi minori, tuttavia è meno volatile e più difficilmente rimovibile).

LAVAGGIO DEL PELLET: Dopo centrifugazione, il pellet di acido nucleico è lavato in etanolo 70% e ri-centrifugato. Tale lavaggio rimuove i sali precipitati.

RISOSPENSIONE DEL DNA: Il pellet dopo essiccazione è risospeso in adeguato tampone a bassa forza ionica, in genere TE (Tris-EDTA) a pH 7.6-8.0, alla concentrazione desiderata.

PURIFICAZIONE DEL DNA da TESSUTI VEGETALI

L'estrazione del DNA è difficile perché contengono grandi quantità di CARBOIDRATI che non vengono rimossi con l'estrazione fenolica.

CTAB -> (Cetil-Trimetil-Ammonio Bromuro) è un detergente e forma un complesso insolubile con gli acidi nucleici. Il precipitato viene raccolto tramite ricentrifugazione e risospeso in una soluzione di NaCl 1M che causa la dissociazione del complesso.

Successivamente devo precipitare la soluzione DNA+RNA per eliminare il CTAB aggiungendo etanolo+Sali (2 volumi) o 0,7 volumi di isopropanolo.

Centrifugo+lavaggio in etanolo

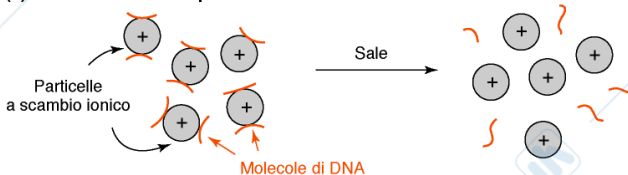
In questa soluzione abbiamo sia DNA che RNA quindi trattare con RNasi perché precipita anche l'RNA.

La soluzione viene risospesa e riprecipitata con il medesimo procedimento discusso nei punti precedenti.

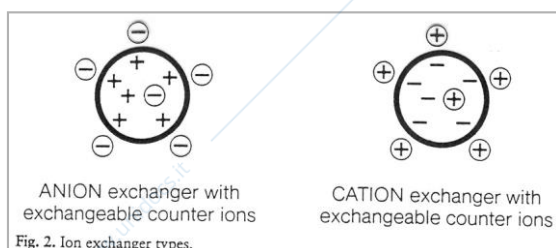
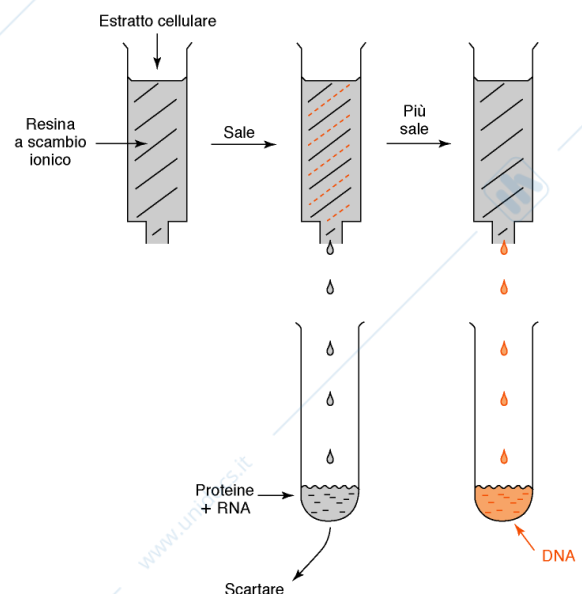
Esistono numerose tecniche alternative per la purificazione del DNA

1. Cromatografia a scambio ionico: si separano le molecole di interesse in base alla loro carica. La matrice della colonna consiste di una resina dotata di carica negativa (Cromatografia a scambio cationico) o positiva (Cromatografia a scambio anionico) e le molecole caricate sulla matrice saranno o meno adsorbite dalla resina a seconda della loro carica complessiva e delle condizioni di pH e forza ionica del campione. Le molecole trattenute dalla colonna vengono poi rilasciate quando si modificano in modo opportuno le caratteristiche del tampone. Nella purificazione di acidi nucleici, carichi negativamente, è utilizzata solo la cromatografia a scambio anionico (ad esempio, DEAE cellulosa).

(a) Attacco del DNA alle particelle a scambio ionico

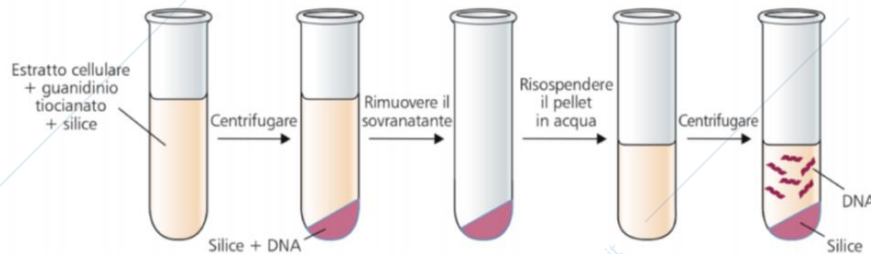


(b) Purificazione del DNA mediante cromatografia a scambio ionico



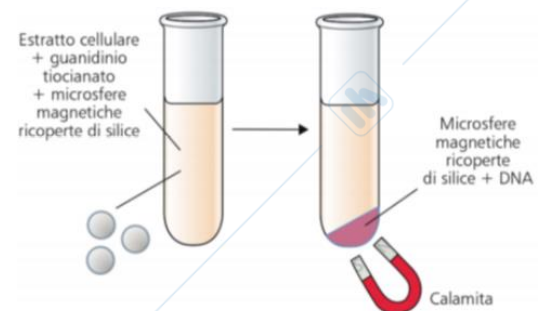
2.METODO DEL GUANIDINIO TIOCIANATO+ PARTICELLE DI SILICE

Questo composto denatura e dissolve tutte le sostanze biochimiche eccetto gli acidi nucleici e lo si può quindi utilizzare per provocare il rilascio del DNA praticamente da qualunque tipo di cellula o di tessuto. Inoltre, in presenza di guanidinio, il DNA si lega con forza a particelle di SILICE. Dopo aver lavato via i contaminanti con una soluzione di lavaggio, si recupera il DNA aggiungendo acqua che destabilizza le interazioni fra le molecole di DNA e la silice.



3.BIGLIE MAGNETICHE

Alcuni metodi commerciali utilizzano particelle magnetiche che agiscono come fase solida attorno a cui precipita l'acido nucleico in particolari condizioni e non necessitano quindi di alcun passaggio di centrifugazione e filtrazione. Infatti, dopo una fase iniziale di lisi, non è prevista digestione con proteinasi K, ma si fa avvenire il legame tra le molecole di DNA e le biglie magnetiche. Si attiva una piastra magnetica che attira a se le biglie caricate con il DNA, mantenendole sul fondo del tubo, in modo da poter aspirare agevolmente il surnatante contenente i contaminanti. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a vari lavaggi rapidi per eliminare ulteriori contaminanti e Sali. Il DNA eluito dalle biglie utilizzando opportuni buffers, viene risospeso per essere utilizzato.



ANALISI QUANTITATIVA DEL DNA ESTRATTO

L'assorbanza del DNA è un indice che ci può aiutare a quantificare il DNA estratto. Le basi puriniche e pirimidiniche assorbono radiazioni con un picco d'intensità massimo di 260nm.

Sperimentalmente si è notato che 50 µg/ml di DNA a doppia elica hanno un assorbimento (λ 260) di ~ 1.0 (in cuvette di quarzo di 1 cm di lato) (40 µg/ml per l'RNA) e viene definita "costante fissa". Basandosi sulla legge di Lambert-Beer otteniamo la seguente relazione.

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = \frac{A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}}{1 \text{ Unità assorbimento}} \times \text{fattore di diluizione}$$

Per il DNA a doppia elica abbiamo quindi:

$$1 \text{ OD}_{260} = [50 \mu\text{g/ml}] \rightarrow 50 \times A_{260} = \text{concentrazione di DNA nel campione} (\mu\text{g/ml})$$

230nm->carboidrati complessi
280nm->fenolo, proteine ar.
320nm->assorbimento di fondo

La purezza del DNA si ricava dai rapporti tra le Assorbanze a 260, 280 e 230 nm. Il rapporto A260/A280 ci permette di valutare la contaminazione da proteine. Buone preparazioni hanno un rapporto 260:280 compreso tra 1.8-2.0.

SOUTHERN BLOT

A questo punto non possiamo sapere se il nostro DNA sia integro o meno e quindi è necessario effettuare una migrazione su gel elettroforesi. Il DNA è negativo a causa della presenza del gruppo P e quindi migra verso + (valutare fronte di corsa ed eventualmente scambiare elettrodi). Come agente intercalante può essere utilizzato il Cyber safe (crea mutazioni) o l'etidio di bromuro).

La velocità di migrazione dipende dalla lunghezza-dimensione del DNA e dalla concentrazione del gel. Il voltaggio è 5 volt/cm. Se è presente bromuro di etidio nella soluzione la velocità può variare perché è variata parzialmente la conformazione del DNA.

NB: Se il DNA è integro si muove molto poco dai pozzetti di partenza!!

Oppure effettuiamo un'analisi automatizzata al NanoDrop.

ELETTROFORESI SU GEL

Il gel viene posto nelle apposite vaschette elettroforetiche riempite in seguito del tampone di corsa. Tale tampone è lo stesso e alla stessa concentrazione di quello usato per polimerizzare l'agarosio. Uno dei tamponi più utilizzati è il TAE (Tris-acetato + EDTA). Questo nel tempo perde capacità tamponante perché si ha la separazione di cariche agli elettrodi. Viene quasi sempre utilizzato a una concentrazione 1X. Il Tris contenuto nel tampone è un sale molto usato nei laboratori. Tampona tra pH 7 e pH 8, un range in cui il DNA si mantiene molto bene. L'EDTA, invece, è un chelante che sequestra ioni Mg^{2+} presenti in soluzione e che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi). Il suo potere tamponante è nullo rispetto a quello del Tris. Prima di caricare il gel si aggiunge al campione un colorante con velocità di migrazione nota in modo da seguire istante per istante l'andamento dell'elettroforesi. Tale colorante è chiamato Loading buffer (LB). Il principio di funzionamento dell'elettroforesi consiste nel movimento di particelle cariche negativamente, DNA, RNA o proteine (saturate con Sodio-dodecilsolfato, SDS), in un campo elettrico verso il polo positivo (anodo). La separazione, come detto prima, avviene in base alle dimensioni e quindi alla massa della molecola. La distanza di migrazione è maggiore per molecole piccole le quali sono trattenute meno dalla maglia polisaccaridica formata dal gel. Nell'esecuzione della corsa elettroforetica, si deve applicare una differenza di potenziale proporzionale alla distanza tra gli elettrodi. In particolare si applica un voltaggio di 3-5V/cm (calcolato come distanza tra i due elettrodi). Solitamente si utilizza voltaggio costante per i gel di agarosio e un amperaggio costante per quelli di poliacrilammide. Il voltaggio applicato deve essere circa 5V/cm perché se fosse maggiore si rischierebbe di scaldare il tampone di corsa e quindi di danneggiare il DNA, l'RNA o le proteine, a seconda delle molecole con cui si sta lavorando. Per ovviare a questo vengono usate vaschette che contengono un'elevata quantità di tampone di corsa. Nel caso di voltaggio costante, l'amperaggio non deve essere un fattore limitante e quindi si posiziona il cursore dei mA (milli Ampère) al massimo. Nel caso invece di amperaggio costante avremo il cursore del voltaggio al massimo e quello dell'amperaggio settato sul valore desiderato. Importante è anche il tempo della corsa elettroforetica che è direttamente proporzionale alla risoluzione. Si può velocizzare il processo aumentando il voltaggio (o l'amperaggio) ma bisogna fare attenzione a non incorrere nei rischi detti precedentemente dovuti al calore prodotto per effetto Joule.