

3.1 Si puo vedere la DNA!!

Ciao di nuovo. Oggi ci accingiamo a estrarre il DNA e lo vedremo. Riesci a crederci? Visualizzare il DNA!

Il DNA è all'interno delle cellule, ben protetto dalla membrana nucleare, il citoplasma e membrana plasmatica. Quindi dobbiamo eliminare in sequenza tutti questi componenti e mantenere solo il DNA. Vi raccontiamo come è fatto nel laboratorio di virologia, ma le informazioni aggiuntive si vedrà che è possibile estrarre il DNA, ad esempio, da una pianta o da qualsiasi altra cella.

In alcuni campioni, avremo bisogno di isolare prima le cellule che ci interessa. Ad esempio, in un campione di sangue, avremo bisogno di eliminare i globuli rossi (o eritrociti), che, come sapete, non hanno nessun nucleo e pertanto essi mancano di DNA. Per effettuare questa operazione, è sufficiente diluire il sangue in acqua distillata così i globuli rossi scoppiare quando si riempiono di acqua. Dopo centrifugazione, avremo un sedimento di cellule nucleate.

Il passo successivo è quello di rompere le membrane cellulari e a disaggregare i componenti. Come le membrane sono formate da lipidi, si consiglia di utilizzare un detergente o un tensioattivo. Proteine, lipidi e RNA sono aggregati per mezzo di una soluzione ipersalina, o eliminati facendo uso delle proteasi e RNases che li distruggono. Con una qualsiasi di queste opzioni, quando abbiamo centrifugare il cellulare rimane vengono mantenute nel pellet mentre il surnatante contiene il DNA.

Buona. Abbiamo separato il DNA da altri componenti cellulari, ma esso è accompagnato da quantità residue di lipidi, proteine, sali, detergenti e altri reagenti. Per rimuoverli, una miscela di fenolo e cloroformio/alcool isoamilico è usato frequentemente. Dopo centrifugazione, possiamo vedere una fase organica inferiore che contiene proteine che sono degradate dal fenolo, e una fase acquosa superiore con il DNA conservato il cloroformio e l'alcool isoamilico mentre i lipidi soggiornano nell'interfaccia. Rimuovere con cautela la fase acquosa superiore, che contiene il DNA.

L'ultimo problema che incontriamo è come concentrare il DNA nel cloroformio. Il DNA si precipita con isopropanolo freddo, così con l'aggiunta di questo reagente e invertendo il tubo un paio di volte, possiamo vedere una sorta di materiale simile al cotone. Questo è precisamente il DNA. Quando abbiamo centrifugare DNA verrà mantenuto nel pellet che laviamo con etanolo per rimuovere tutte le tracce di isopropanolo e reagenti preventivo. Dopo l'asciugatura avremo il nostro campione di DNA è pronto a lavorare con esso. Bravoooo!

Questa procedura è utile quando si maneggiano i campioni, ma quando il volume dei campioni di gestire è alto, o ci sono piccole quantità di cellule nel materiale di partenza (e di conseguenza poco DNA), è più pratico utilizzare commerciale mini-colonne quel DNA isolato e purifie ad alte prestazioni. Vi sono inoltre colonne per isolare e purificare il RNA.

Quando noi abbiamo purificato l'acido nucleico, di solito è dissolto in un adeguato buffer o in doppia acqua distillata. Possiamo stimare la sua concentrazione in uno spettrofotometro, valutando il rapporto tra il assorbanza a 260 nm e a 280 nm. DNA puro avrà un'assorbanza maggiore o uguale a 1.8, mentre se ci sono proteine residue, il valore sarà più basso.

Abbiamo già il nostro DNA, Ora lavoriamo con esso! Vediamo nel seguente video.

Grazie per la vostra attenzione.