

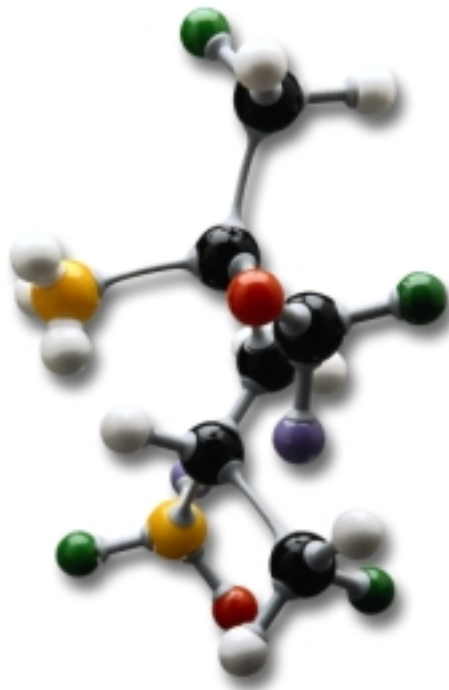


**IS**

science centre immaginario scientifico

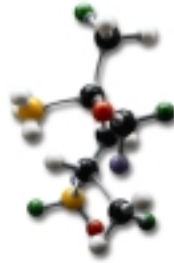
scienza come gioco

# i segreti del DNA



scienza come gioco

# i segreti del DNA



## indice

---

- Estrazione del DNA da batteri 2
- Elettroforesi di DNA 4
- Modello di DNA 6

parole  
chiaveBatteri  
Enzimi  
Incubazione  
Centrifugazione

# Estrazione del DNA da batteri

Lo scopo di questa prova è di permettere agli studenti di osservare e toccare il DNA estratto da batteri di *Escherichia coli* mediante l'utilizzo di strumenti di laboratorio.

fonti: Università degli Studi di Trieste,  
Dipartimento di Biochimica, Biofisica  
e Chimica delle Macromolecole



## SVOLGIMENTO

Prendere due provette Eppendorf contenenti i batteri di *Escherichia coli* e risospendere i campioni in 100  $\mu\text{l}$  di tampone TE contenente EDTA (l'EDTA, acido etilendiamminotetracetico, è un composto chelante che ha la funzione di sequestrare i metalli pesanti rendendoli solubili). Il tampone ha lo scopo di mantenere costante il pH della soluzione e creare le condizioni ottimali che, insieme alla temperatura, consentono di avere il massimo rendimento enzimatico.

Aggiungere 5  $\mu\text{l}$  di enzima (lisozima) in ogni provetta e incubare per 10 minuti a 37°C tenendo il campione nel palmo della mano. Nel batterio il DNA è circolare ed è libero nel citoplasma (essendo il batterio privo di nucleo). Il batterio di *Escherichia coli* ha una parete batterica costituita da tre strati. Il più esterno e il più interno sono fatti di lipidi, mentre al centro c'è uno strato di peptidoglicano. Il lisozima ha la caratteristica di agire in modo specifico intervenendo sulla parete batterica rompendola.



## MATERIALI

- Micropipetta P20
- Micropipetta P200
- Puntali per micropipette
- Provette Eppendorf
- Centrifuga
- Stuzzicadenti
- Batteri (*Escherichia coli*)
- Soluzione tampone TE, contenente EDTA
- Lisozima
- Detergente SDS



## REPERIBILITÀ

Per l'acquisto della strumentazione di laboratorio e dei campioni rivolgersi a ditte specializzate.



- Terminato il periodo di incubazione, aggiungere 5  $\mu\text{l}$  di SDS (sodio dodecil solfato) in ogni provetta. Si tratta di un detergente che serve a sciogliere le membrane cellulari e consentire la liberazione del DNA dalle cellule batteriche.
- Centrifugare a 8000 rpm (rotazioni per minuto) per 10 minuti, ricordandosi di bilanciare il campione in centrifuga. In questa maniera si separa il DNA dalla membrana lisata e da tutti gli altri scarti. Lo troveremo sul fondo della Eppendorf.
- A questo punto, con l'aiuto di uno stuzzicadenti, è possibile toccare il DNA che ha assunto una consistenza simile a quella dell'albume di un uovo.

## OSSERVAZIONI

- Il batterio Escherichia coli utilizzato ha una dimensione di circa 2  $\mu\text{m}$ , quindi nel fondo di una provetta Eppendorf ne possiamo avere alcuni miliardi. Il suo DNA ha una lunghezza di 20  $\mu\text{m}$ , quindi dieci volte più grande della cellula in cui è contenuto.
- Il lisozima è una sostanza che si trova sia nelle lacrime che nella saliva e serve per proteggere l'occhio e la bocca dalle aggressioni esterne dei batteri.
- Dopo ogni utilizzo, il puntale della micropipetta va rimosso e eliminato.
- I campioni vanno inseriti nella centrifuga in posizioni opposte rispetto all'asse di rotazione. Il piattello della centrifuga, infatti, deve risultare bilanciato nel corso della rotazione.

parole  
chiave

Elettroforesi  
Bandeggio  
Gel  
Tampone  
Buffer  
Raggi UV

# Elettroforesi di DNA

Viene spiegata la tecnica dell'elettroforesi quale mezzo per poter separare segmenti di DNA in base alle loro dimensioni (peso molecolare).

fonti: Università degli Studi di Trieste,  
Dipartimento di Biochimica, Biofisica  
e Chimica delle Macromolecole



## MATERIALI

- Micropipetta P20
- Micropipetta P200
- Puntali per micropipette
- Provette Eppendorf
- Cella elettroforetica
- Alimentatore da 125 V
- Transilluminatore
- Soluzione tampone ETE
- Gel di agarosio
- Un campione noto di DNA (per esempio marker di fago  $\lambda$ )
- Soluzione tampone TE, contenente EDTA
- Loading buffer



## REPERIBILITÀ

Per l'acquisto della strumentazione di laboratorio e dei campioni rivolgersi a ditte specializzate.



## SVOLGIMENTO

Prendere due provette Eppendorf e inserire in ognuna 2  $\mu$ l di campione di DNA e diluirli in 10  $\mu$ l di tampone TE contenente EDTA per mantenere costante il pH della soluzione. Aggiungere a questo punto 3  $\mu$ l di loading buffer, un colorante che consente di seguire la corsa del DNA sul gel di agarosio. Con 5  $\mu$ l del preparato così ottenuto, caricare i pozzetti nel gel e collegare alla cella elettroforetica l'alimentatore facendo attenzione a posizionare il polo positivo dalla parte opposta ai pozzetti. Lasciare correre il DNA per almeno venti minuti, dopodiché spegnere l'alimentatore e trasferire il gel sul transilluminatore e accenderlo. Spegnendo le luci della sala, si osservano le varie bande del DNA che si trovano a distanze diverse dal pozzetto di partenza.



## OSSERVAZIONI

- L'elettroforesi su gel di agarosio separa frammenti di DNA in base alla loro dimensione. Il principio di base è quello di un setaccio molecolare attraverso il quale le molecole di DNA vengono fatte passare sotto l'azione di un campo elettrico. Frammenti di lunghezza minore sono meno ostacolati nella loro corsa attraverso le maglie del gel, per cui si muovono a velocità maggiore rispetto a frammenti più lunghi. Alla fine di una corsa elettroforetica, quindi, i frammenti più piccoli si troveranno nella parte bassa del gel mentre i frammenti più grossi saranno localizzati nella parte prossima al punto di caricamento.
- Il gel comunemente usato per questo tipo di separazione è fatto di agarosio con aggiunta di etidio bromuro, una molecola che riesce a intercalarsi nel DNA ed essendo fluorescente lo rende visibile con la luce UV al transilluminatore. Essendo l'etidio bromuro cancerogeno, il gel va maneggiato con i guanti esclusivamente dall'insegnante.
- Il DNA è carico negativamente, quindi è fondamentale collegare l'alimentatore con il polo positivo all'estremità opposta ai pozzetti, per avere una corretta separazione.
- Il loading buffer (colorante blu contenente glicerolo, per renderlo più denso e pesante in modo da facilitare il caricamento del campione nel pozzetto), serve per seguire la corsa del DNA lungo il gel. Infatti il DNA è "trasparente". La molecola del colorante è molto piccola, corre più veloce del campione e quindi consente di valutare quando è possibile interrompere la corsa.
- Questa tecnica può essere usata per indagini forensi. Se sul luogo di un crimine si trova del sangue oppure un capello, è possibile estrarne il DNA e confrontarlo con quello dei sospettati. Qualora si trovi una corrispondenza precisa tra le bande di DNA di uno dei sospettati e quelle del campione rinvenuto sul luogo del delitto, si può risalire all'identità del colpevole.
- L'elettroforesi può essere sfruttata anche per i test di paternità. In questo caso il DNA del bambino (quindi le bande che si osservano sul gel), deve corrispondere al 50% con quello della madre e al 50% con quello del vero padre.

parole chiave

Basi azotate  
Complementarietà  
Nucleotidi  
Enzimi di restrizione

# Modello di DNA

Lo scopo di questa attività è quello di coinvolgere i ragazzi nella costruzione di un modello tridimensionale di DNA in modo da comprenderne la struttura e l'azione degli enzimi di restrizione.

fonti: LIS e autori vari



## MATERIALI

- 144 mollette di plastica lunghe 7 cm e larghe 1 cm, di 4 colori diversi
- 36 cannuccie di plastica lunghe 20 cm, con foro da 0,5 cm (da tagliare in pezzi di 4,5 cm)
- Cordoncino animato lungo 11 m da cui tagliare 12 pezzi lunghi 45 cm e 2 pezzi lunghi 280 cm
- 72 cartoncini rettangolari spessi 1 mm di dimensioni 4,5 x 2 cm
- 12 fogli plastificati numerati con sopra riportata la sequenza delle basi



## REPERIBILITÀ

Il cordoncino animato è una sorta di filo di ferro rivestito che si acquista nei negozi di attrezzature per il giardinaggio. Gli altri materiali si trovano in cartoleria e in drogheria.

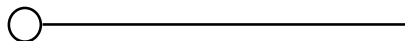


## PREPARAZIONE

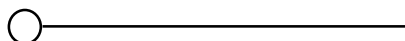
Si consiglia di far costruire agli allievi solo metà della molecola di DNA, mentre l'altra metà deve essere preparata prima dell'attività utilizzando i due tratti di cordoncino lunghi 280 cm.

- Dapprima realizzare un'asola a una delle due estremità di ogni tratto di filo.

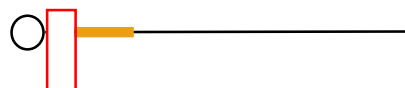
**filamento a:**



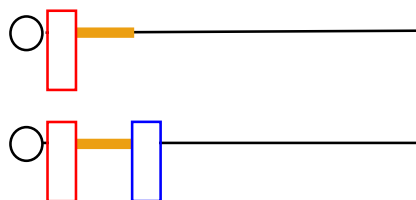
**filamento b:**



- Prendere quindi il **filamento a** e inserire una molletta di plastica (base azotata) attraverso il foro della molla di ferro fino a farla incastrare nell'asola.



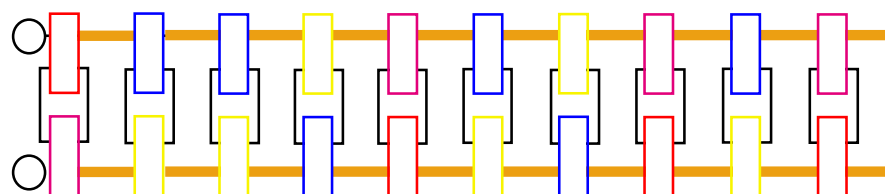
- Proseguire inserendo un pezzo di cannuccia da 4,5 cm (zucchero + fosfato) e quindi un'altra molletta. Procedere in questo modo fino a infilare 36 mollette e altrettante cannucce (la sequenza dei colori può essere scelta a piacere).



- Il cordoncino animato deve essere avvolto due volte attorno all'ultima cannuccia in modo da impedire la fuoriuscita dei pezzi inseriti.

Lo stesso procedimento deve essere ripetuto per il **filamento b**, facendo però attenzione ad inserire le mollette con la sequenza "complementare" a quella del **filamento a**. Per esempio, se i colori delle mollette sono rosso (Guanina), rosa (Citosina), giallo (Adenina) e blu (Timina), a ogni molletta rossa del **filamento a** deve corrispondere una molletta rosa del **filamento b** e viceversa. Lo stesso vale per le mollette gialle e quelle blu.

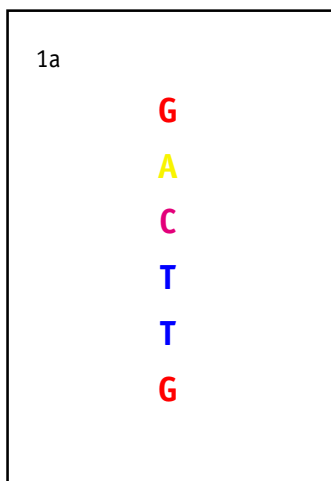
- Concludere collegando le mollette "complementari" con i cartoncini rettangolari che simulano i legami idrogeno tra le basi azotate.





**SVOLGIMENTO**

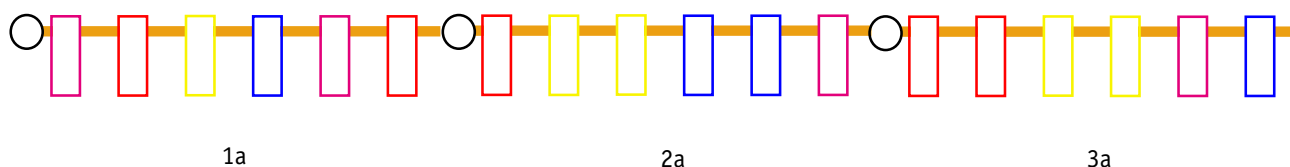
- Consegnare a ogni coppia di ragazzi un sacchetto contenente il seguente materiale:
  - un foglio plastificato riportante la sequenza delle basi da realizzare
  - un tratto di cordoncino lungo 45 cm dove è stata già realizzata una piccola asola a una delle due estremità
  - sei pezzetti di cannuccia lunghi 4,5 cm
  - sei mollette di colore corrispondente alle lettere (basi azotate) indicate sul foglio plastificato. In alto a sinistra del foglio si trovano un numero e una lettera che indicano rispettivamente la posizione del pezzo costruito e il filamento a cui appartiene.



Si possono utilizzare le seguenti sequenze:

- 1a CGATCG
- 2a GAATTC
- 3a GGAACT
- 4a TCTATC
- 5a GAATTC
- 6a CCGGAT
- 1b GCTAGC
- 2b CTTAAG
- 3b CCTTGA
- 4b AGATAC
- 5b CTTAAG
- 6b GGCCTA

Con questo materiale ogni coppia deve costruire un pezzo di filamento della lunghezza di sei basi azotate, che deve essere collegato in serie con gli altri seguendo la numerazione riportata sul foglio plastificato:



L'estremo libero del **filamento 1a** va infilato nell'asola del **2a** e si fissa attorcigliandolo su se stesso un paio di volte; si continua in questo modo fino a collegare il pezzo **6a**. Si ripete l'operazione per il **filamento b** per poi collegare le mollette (basi azotate) dei due filamenti con i cartoncini rettangolari.

- Collegare le estremità libere del tratto di DNA realizzato in precedenza con le asole del pezzo appena costruito ottenendo così il modello finale della lunghezza di circa 4 metri. Reggendo il DNA per i due estremi e arrotolandolo al centro è possibile ottenere la struttura tridimensionale della molecola.
- Una volta terminata la costruzione del modello tridimensionale, lo si srotola e si introduce il concetto di enzima di restrizione. Questa categoria di enzimi agisce come una sorta di forbice, tagliando il DNA solo in punti precisi e cioè dove riconosce una sequenza specifica di basi. In questo modo si possono ottenere frammenti di DNA di diverso peso molecolare che poi possono essere separati tramite elettroforesi e analizzati. Uno degli enzimi di restrizione più utilizzati in laboratorio si chiama **ECO RI** e riconosce la sequenza di basi: **GAATTC**. Ogni volta che trova questa sequenza taglia il DNA. Gli allievi devono pertanto trovare (riconoscendo i colori) questa sequenza che è stata messa appositamente nelle scheda **2a** e **5a**, tagliare il modello in modo da ottenere tre pezzi di DNA di lunghezza diversa e simulare a questo modo l'azione dell'enzima.



## OSSERVAZIONI

La molecola di DNA è molto complicata e contiene trentamila geni, cioè almeno trentamila "ricette" diverse per costruire altrettante proteine. È formata da nucleotidi, pacchetti di molecole costituiti da una molecola di acido fosforico, una di zucchero (il desossiribosio) e una base azotata. Le basi azotate sono Adenina, Timina, Citosina e Guanina e di solito vengono indicate con le iniziali: A, T, C, G. Sono le quattro lettere (a differenza delle ventuno del nostro alfabeto) con cui sono state scritte le istruzioni dell'intera enciclopedia della vita (genoma).

Un gene è una porzione di DNA che contiene la ricetta per costruire una proteina.

In generale gli enzimi sono proteine dotate di attività catalitica, in grado cioè di accelerare una reazione chimica e di ritrovarsi inalterate alla fine del processo. Ne esistono molti tipi diversi con compiti molto differenti l'uno dall'altro. Vengono classificati in base al tipo di reazione catalizzata nelle categorie: ossidoriduttasi, transferasi, idrolasi, liasi, isomerasi, ligasi.