

## **GENOMA**

depositario delle informazioni biologiche necessarie alla costruzione e mantenimento di un organismo vivente.

Fatte le dovute eccezioni (es. gameti) tutte le cellule di uno stesso organismo hanno lo stesso ed identico GENOMA.

INSIEME DI ISTRUZIONI

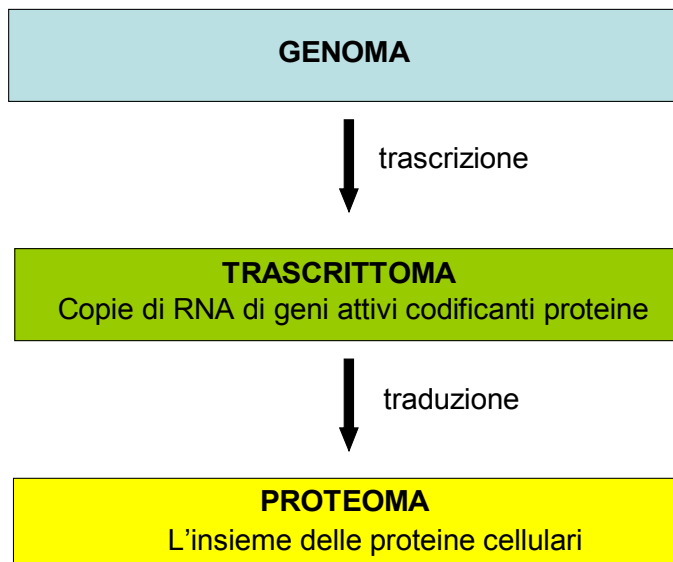


Interpretate ed eseguite  
ESPRESSIONE GENICA

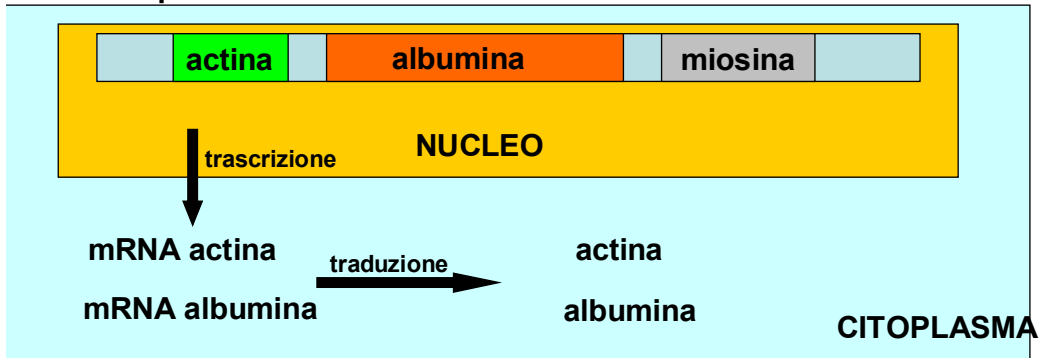


IDENTITA' E FUNZIONALITA' DI UNA CELLULA

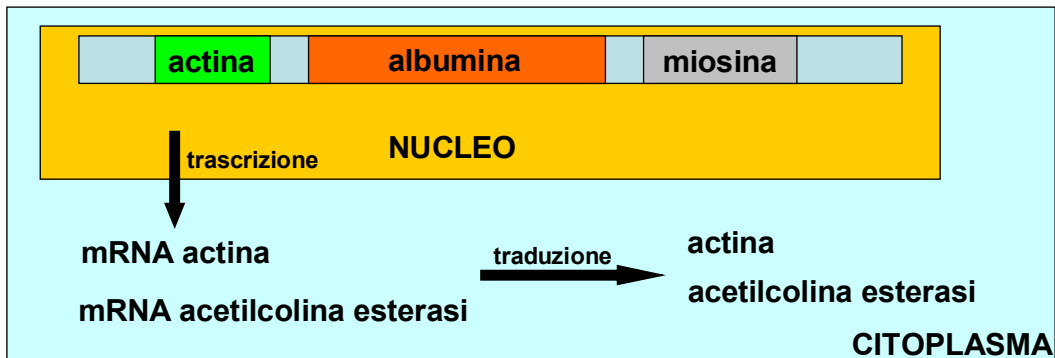
## **ESPRESSIONE GENICA**



### Cellula epatica



### Cellula nervosa



Actina: subunità monomerica dei microfilamenti citoscheletrici

Acetilcolina esterasi: enzima che idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina

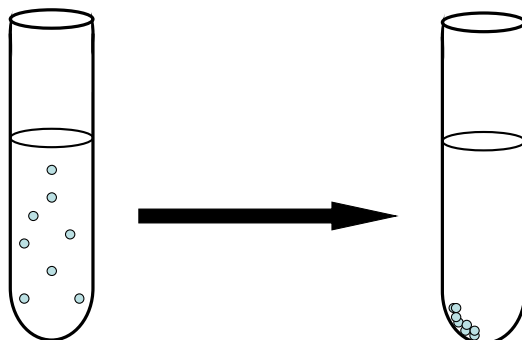
Albumina: mantenimento dell'equilibrio idrico

## ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI (DNA-RNA)

Possibili fonti:

- Tessuto (omogenizzazione)
- Coltura di cellule eucariotiche (su piastra o in sospensione)
- Coltura di cellule batteriche (in sospensione)

Raccolta delle cellule mediante centrifugazione





## MISCELA COMPLESSA

- DNA
- RNA
- PROTEINE
- LIPIDI
- CARBOIDRATI

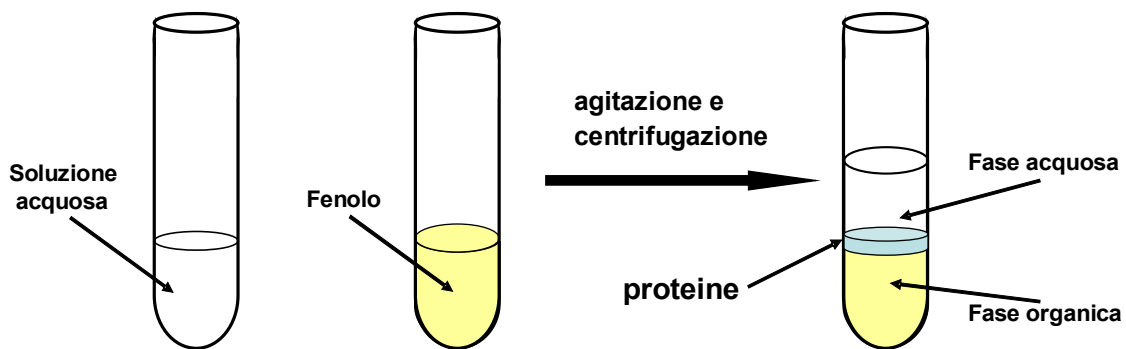
- Trattamento opzionale con:
- RNasi (enzima termostabile), distrugge l'RNA
  - Proteasi K, distrugge le proteine

## FENOLO/CLOROFORMIO

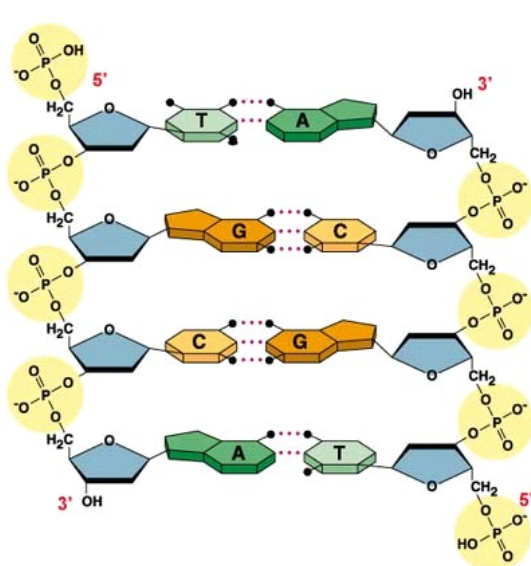
(FARE UN FENOLO)

FENOLO: liquido che non si miscela con l'acqua

CLOROFORMIO: aiuta il fenolo nella separazione dall'acqua



## PRECIPITAZIONE A FREDDO CON ALCOL E SALI



Acidi nucleici  $\xrightleftharpoons{\text{interazione elettrostatiche}}$  H<sub>2</sub>O

**Sali:** i cationi interagendo con i gruppi ne neutralizzano la carica diminuendo l'idrofilicità della molecola

**Alcol:** ha una costante dielettrica inferiore dell'acqua, agevolando l'interazione tra i cationi ed i gruppi fosfato

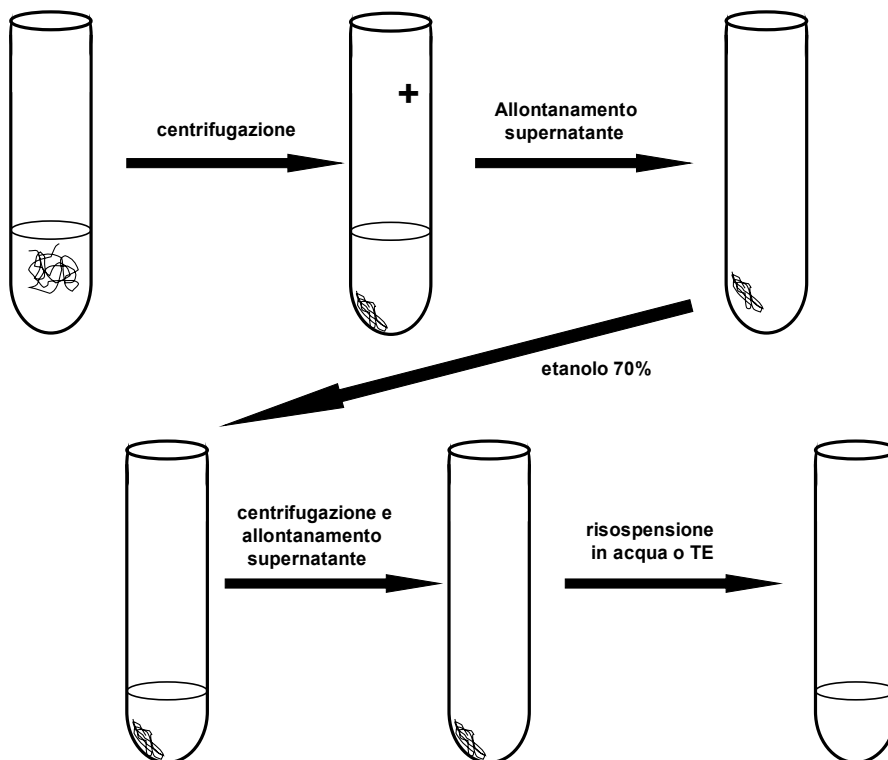
**Temperatura:** agevola la precipitazione

## PRECIPITAZIONE A FREDDO CON ALCOL E SALI

- Na<sup>+</sup>
  - K<sup>+</sup>
  - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
  - Li<sup>+</sup> (per RNA)
- ETANOLO (2,5 volumi della soluzione acquosa)  
oppure
  - ISOPROPANOLO (0,6 volumi della soluzione acquosa)

Liberazione sicura dal fenolo e concentrazione del campione

## PRECIPITAZIONE A FREDDO CON ALCOL E SALI



## ESTRAZIONE DNA PLASMIDICO

Metodo della lisi alcalina

La **lisi** si basa sull'uso di: **SDS/NaOH (pH 12)** in presenza di RNase A

DNA genomico	Durante la lisi si frammenta e denatura
DNA plasmidico	Più piccolo e resistente subisce solo una parziale denaturazione

**Neutralizzazione** con **Potassio acetato (pH 5,5)**

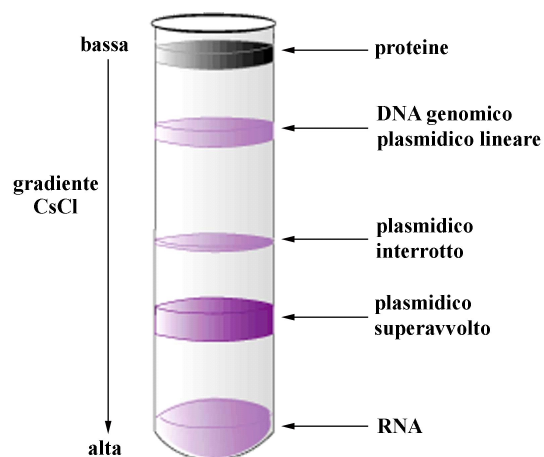
DNA plasmidico: rinatura correttamente (se la lisi non è protratta per un tempo eccessivamente lungo) rimanendo solubile in soluzione.

L'alta concentrazione dei sali determina la precipitazione del KDS e di tutte le proteine, il DNA genomico e gli altri costituenti cellulari intrappolati nei complessi sale-detergente.

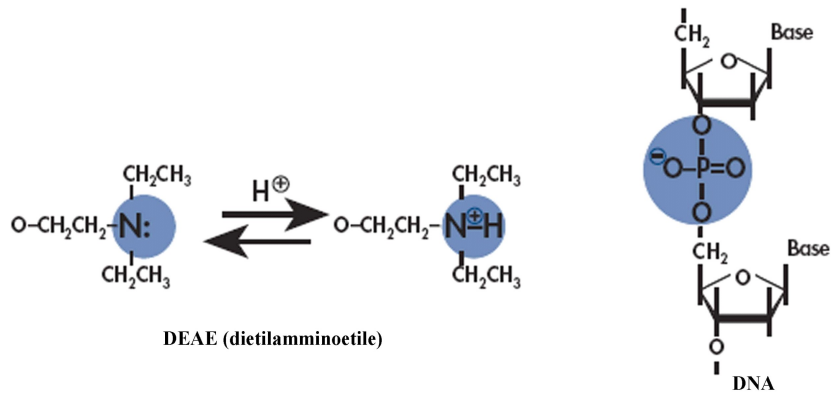
**CETRIFUGAZIONE:** per liberare la soluzione (contenente il DNA plasmidico) Da tutte le componenti cellulari insolubili.

Metodo per separare gli acidi nucleici

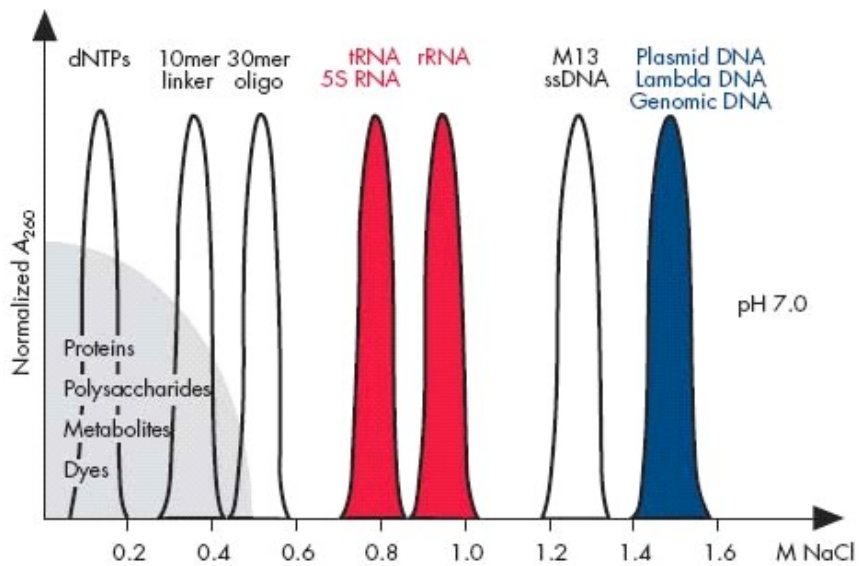
Centrifugazione all'equilibrio in gradiente di densità di Cloruro di Cesio/EtBr

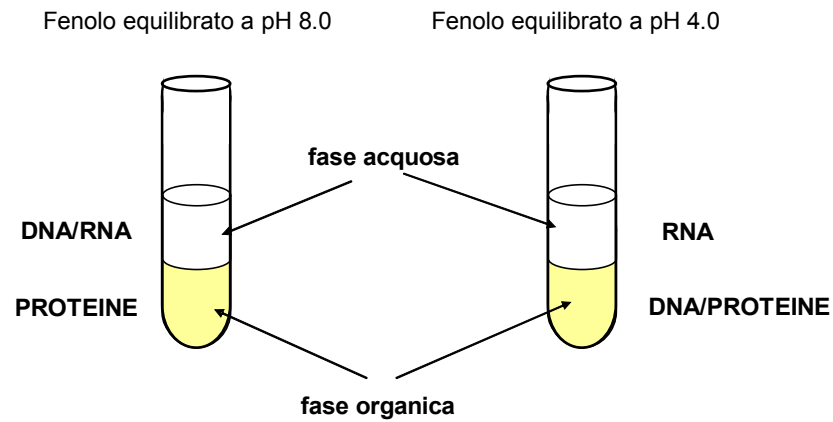


## CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



## LAVAGGI ED ELUIZIONE





## ESTRAZIONE RNA

Evitare l'attacco delle **RNasi** liberate dalla lisi cellulare e/o introdotte mediante contaminazione

**Inattivazione:** Eparina, PVS, Rnasina

**Distruzione** simultanea alle altre proteine durante l'estrazione

<b>SDS</b> denaturante	<b>Proteasi K</b> enzima proteolitico
---------------------------	--

<b>Fenolo</b>	<b>Guanidina isotiocianato</b> (agente caotropico) distrugge le cellule.
---------------	---

## QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA

Concetrazone: assorbanza a **260 nm** in una cuvetta di quarzo

**1 O.D.** corrisponde ad una concetrazone di **DNA** a doppio filamento di  
**50 µg/ml**

**1 O.D.** corrisponde ad una concetrazone di **RNA** di  
**40 µg/ml**

Qualità del preparato (contaminazione proteica)

$$A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$$