

## ESTRAZIONE DI DNA VEGETALE DA TESSUTO FOGLIARE FRESCO

L'estrazione degli acidi nucleici da tessuto vegetale rappresenta la premessa indispensabile per qualsiasi tipo di manipolazione genetica. Tale procedura, pur nella sua semplicità, rappresenta un ottimo esempio di studio del comportamento chimico-fisico delle macromolecole in soluzione.

In generale, tutti i metodi di estrazione del DNA si basano su fasi essenzialmente simili che possono essere così schematizzate:

1. Raccolta e conservazione del materiale vegetale;
2. Distruzione della parete cellulare;
3. Lisi cellulare e precipitazioni di proteine, carboidrati e lipidi;
4. Rimozione dell'RNA;
5. Precipitazione e purificazione del DNA.

### 1- RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL MATERIALE VEGETALE:

Il materiale vegetale da raccogliere deve rispondere agli importanti requisiti di sanità e pulizia ai fini di una buona resa qualitativa dell'estrazione. Le giovani foglie sono gli organi maggiormente utilizzati per l'estrazione del DNA genomico. Queste, immediatamente dopo il prelievo, sono ripulite di ogni residuo, lavate in acqua, asciugate e poste in contenitori contenenti azoto liquido.

Alla raccolta può non seguire necessariamente l'estrazione del materiale genetico. Esso può essere conservato in condizioni che riducono al minimo la sua degradazione. La liofilizzazione è un ottimo metodo di conservazione. Infatti, la non idratazione del DNA rende quest'ultimo meno suscettibile alle sollecitazioni meccaniche. Un altro valido sistema è quello della crioconservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2- DISTRUZIONE DELLA PARETE CELLULARE

Le cellule vegetali presentano una parete cellulare per la cui rimozione spesso si ricorre al congelamento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) dei tessuti vegetale e alla loro macinazione manuale mediante mortai e pestelli pre-raffreddati in azoto liquido. Un altro metodo utilizzato è quello dell'omogenizzazione tramite appositi omogenizzatori.

### 3- LISI CELLULARE

Il tessuto polverizzato od omogenizzato risultante dalla precedente operazione è trasferito in un nuovo tubo in cui è aggiunto un tampone di estrazione che ha il compito di promuovere la lisi cellulare mediante la denaturazione delle proteine, l'immobilizzazione di queste ultime e dei carboidrati ed il rilascio degli acidi nucleici in soluzione. I quantitativi di tampone da aggiungere al tessuto polverizzato od omogenizzato sono basati sul rapporto peso-volume, per cui si aggiungerà un ml di tampone per ogni grammo di tessuto vegetale.

Le sostanze che generalmente prendono a far parte del tampone sono riportati di seguito. Per ciascuna di esse è indicata la funzione svolta durante questa prima fase di estrazione:

- SDS (Sodio Dodecil Solfato:  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) surfattante<sup>1</sup> cationico in grado di rompere i legami no-covalenti nelle proteine e dunque di

---

<sup>1</sup>Deriva dalle parole SURFace ACTive AgeNT. Sono composti chimici basati su molecole in grado di intervenire sulla tensione superficiale (tensioattivi). Le molecole di questi prodotti, disciolte in acqua,

denaturarle, facendo perdere loro la conformazione nativa. Inoltre, la componente anionica dell'SDS lega la catena peptidica (uno ione SDS ogni due residui aminoacidici). Questo conferisce una carica negativa alla proteina proporzionale alla sua massa (circa 1,4 g SDS/g proteina). Questa carica negativa è significativamente maggiore alla carica elettrica originale. La repulsione elettrostatica che si viene a creare dal legame dell'SDS causa la denaturazione della proteina ad una struttura filiforme;

- Tris-HCl: ha lo scopo di mantenere il DNA deprotonato e solubile in acqua a pH leggermente basico (8.0);
- EDTA (acido EtilenDiamminoTetraAcetico:  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ): agente chetante in grado di immobilizzare i cationi bivalenti come  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$  che sono necessari per la stabilità della membrana e sono cofattori di enzimi ad attività DNAsica. In tal modo si garantisce l'indebolimento della membrana cellulare e la protezione del DNA da eventuali degradazioni enzimatiche;
- NaCl: viene aggiunto per aumentare la forza ionica del tampone.

#### 4- PRECIPITAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA

La procedura prevede l'utilizzo di due volumi e mezzo di isopropanolo al 96%. La soluzione così preparata viene incubata per tutta la notte a 4°C. L'aggiunta di isopropanolo determina delle modificazioni strutturali degli acidi nucleici tale da indurre la loro aggregazione e la conseguente precipitazione. La soluzione è centrifugata a 4°C a 14000 rpm per 5 minuti, l'isopropanolo allontanato ed il pellet asciugato a temperatura ambiente per 20 minuti e risospeso in TE (Tris-HCl, EDTA).

### **PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI DNA DA FOGLIA (METODO DI EDWARDS *et. al.*, 1991)**

1. Raccogliere una foglia piccola dalla pianta e porla in un tubo sterile da 1,5 ml;
2. Macerare il tessuto a T ambiente per 15 sec. senza il **BUFFER DI ESTRAZIONE<sup>1</sup>**;
3. Aggiungere 400 µl di **BUFFER DI ESTRAZIONE<sup>1</sup>** e miscelare mediante vortex per 5 sec;
4. Centrifugare i campioni a 13.000 rpm per 1 min;

---

agiscono sulle formazioni oleose presenti, inglobandole in unità strutturali, dette micelle. Ciò è possibile grazie alla polarità delle loro molecole, che sono caratterizzate da un'estremità idrofila (affine all'acqua) e da un'estremità idrofobica (affine alle sostanze oleose, quelle che non sono solubili). Legandosi alle formazioni oleose, queste creano uno strato esterno idrofilo rendendole solubili in acqua.

5. Trasferire 300  $\mu$ l ~ del surnatante in un tubo sterile da 1,5 ml;
6. Aggiungere 300  $\mu$ l di isopropanolo, miscelare delicatamente mediante inversione;
7. Centrifugare i campioni a 13.000 rpm per 5 min;
8. Seccare il pellet allontanando il surnatante e aspettando l'evaporazione dell'isopropanolo;
9. Risospendere il pellet in 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile e conservare a 4°C;

#### <sup>1</sup>**BUFFER DI ESTRAZIONE**

Tris HCl - 200 mM

NaCl - 200 mM

EDTA (acido etilendiamminotetracetico) - 25 mM

SDS - 0.5%