



Cassetta degli attrezzi per
l'estrazione del DNA MiniLab
Guida per lo Studente

Cat# M3015

Versione 082721-IT

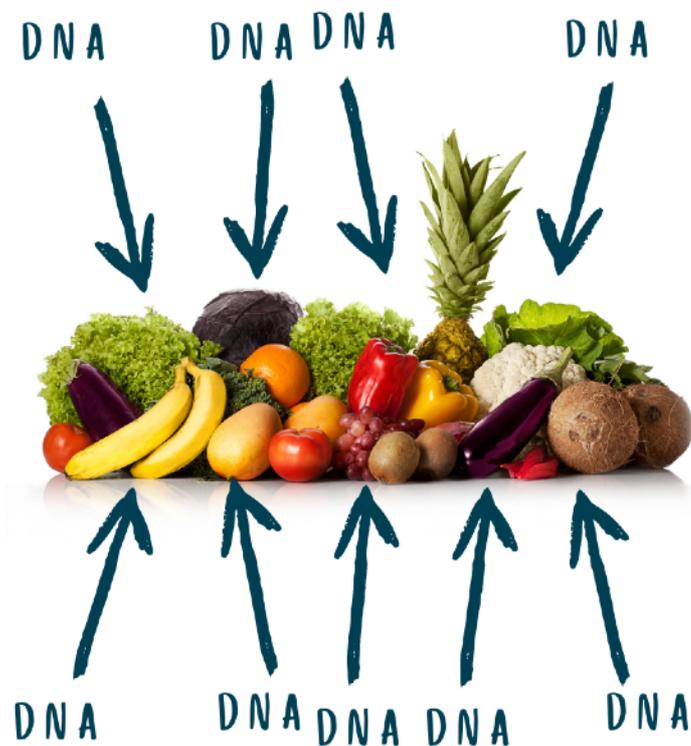


Tabella dei contenuti

Sicurezza del laboratorio	2
Introduzione	3
Domande Pre-Lab	4
Parte I: Esplora l'estrazione del DNA	5
Parte II: Sviluppa il tuo protocollo	6
Parte III: Raffina il tuo approccio	7
Parte IV: Attività di Estensione (Opzionale)	8

In questo MiniLab basato sull'indagine, gli studenti estrarranno il DNA dal germe di grano e visualizzeranno la concentrazione del DNA usando il colorante fluorescente GelGreen e il lettore di fluorescenza a luce blu MiniOne Winston. Gli studenti svilupperanno e perfezioneranno il proprio protocollo di estrazione del DNA variando le concentrazioni e le proporzioni dei reagenti e altre variabili. Attraverso questa attività pratica, gli studenti impareranno come la scienza progredisce attraverso esperimenti controllati e un po' di tentativi ed errori.

Questo MiniLab contiene abbastanza materiale per far eseguire gli esperimenti a **10** gruppi.

Sicurezza del laboratorio

1. Indossare camici da laboratorio, guanti e protezioni per gli occhi come richiesto dal protocollo distrettuale.
2. Usare con cautela tutte le apparecchiature elettriche come le macchine per PCR e le unità di elettroforesi.
3. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato materiali biologici e prodotti chimici.

Introduzione

I protocolli per l'estrazione del DNA possono variare da molto semplice a molto complesso a seconda del tessuto e dell'applicazione. Uno stelo vegetale duro può aver bisogno di essere fisicamente rotto prima che il DNA possa essere rilasciato dalle cellule, mentre altre cellule possono aver bisogno di un semplice trattamento chimico per rompere le membrane cellulari. In questo laboratorio basato sull'indagine progetterai esperimenti per testare l'efficacia di vari reagenti e procedure per estrarre il DNA dal germe di grano, la parte embrionale del seme di grano che è comunemente usata come integratore alimentare. Come attività di estensione puoi usare i principi che hai scoperto per estrarre il DNA da frutta e verdura che hai in cucina.

Guida ai reagenti

Tween-20: Questo è un detergente delicato che viene usato per rompere le pareti delle cellule. Tutte le cellule sono circondate da una membrana a doppio strato lipidico. I lipidi sono simili, nelle loro proprietà chimiche, al grasso o all'unto, e il sapone aiuta a sciogliere la membrana nello stesso modo in cui aiuta a sciogliere il grasso sulle pentole. Tween-20 è fornito come soluzione all'1% in acqua.

Tampone di bicarbonato: Questa è una soluzione alcalina (pH ~9.6) che viene usata per solubilizzare le proteine all'interno della cellula e nella membrana. Le cellule sospese nella soluzione alcalina sono spesso riscaldate come parte di un protocollo di estrazione del DNA. Questo tampone è fornito come soluzione da 0,1 M.

GelGreen: Questo è un composto che si lega al DNA a doppio filamento. Non è fluorescente in soluzione. Quando è legato al DNA a doppio filamento, diventa verde fluorescente quando viene illuminato con luce blu. In questo modo, è un indicatore della presenza di DNA a doppio filamento nella tua soluzione. Utilizzare GelGreen diluito 1:5.000 in acqua.

Altre variabili: Variabili come la temperatura o il tempo di incubazione del germe di grano con la soluzione di estrazione potrebbero influenzare la quantità di DNA estratto. Riesci a pensare ad altre variabili che potrebbero influenzare l'estrazione del DNA?

Domande pre-laboratorio:

1. Usa internet o il tuo libro di testo di biologia per cercare dove si trova il DNA nelle cellule eucariotiche. Quali componenti della cellula dovranno essere perturbati per separare il DNA dal resto dei componenti della cellula?

2. GelGreen è una molecola che è fortemente fluorescente quando è legata al DNA a doppio filamento ma non può passare attraverso la membrana plasmatica. Questa molecola assorbe la luce blu (il colore dei LED nel Winston Fluorescence Reader) ed emette luce verde (che è visibile attraverso il cappuccio fotografico arancione). Come potete usare GelGreen e il lettore di fluorescenza MiniOne Winston per determinare se avete estratto con successo il DNA dalle cellule del germe di grano?

3. Guarda la Guida ai reagenti e alle altre variabili. Se dovessi sceglierne uno e uno solo da questa lista da usare nella tua procedura di estrazione del DNA, quale sarebbe e perché?

Parte I: Esplora l'estrazione del DNA

Tempo stimato: 20 min

Nel tuo primo esperimento, confronterai l'efficacia dei reagenti usati per l'estrazione del DNA. Segui la procedura qui sotto, prestando particolare attenzione al passo 3. Questo è il punto in cui modificherai la procedura negli esperimenti che progetterai in seguito.

1. Etichetta quattro provette da microcentrifuga con i numeri da 1 a 4.
2. Per ottenere la stessa quantità di germe di grano in ogni provetta useremo il tappo delle provette da 0,65 mL per misurare il germe di grano. Riempi il tappo della provetta con il germe di grano usando le dita. Capovolgi la provetta sul tappo per chiudere il germe di grano all'interno della provetta.
3. Utilizzare una pipetta di trasferimento o una micropipetta a volume regolabile per aggiungere 200 μ L delle soluzioni seguenti alla provetta indicata e agitare la provetta per mescolare il liquido con il germe di grano.

Tabella 1:

Tubo #	Reagente(i) nella provetta	Classifica della fluorescenza (1 è il più forte, 4 il più debole)
Tubo 1	200 μ L di acqua	
Tubo 2	200 μ L Tween-20 (1%)	
Tubo 3	200 μ L Tampone bicarbonato (0,1 M)	
Tubo 4	200 μ L di acqua +	

Per la provetta 4, aggiungi 200 μ L di acqua, ma cambia un'altra variabile, come il tempo che lasci riposare prima di passare alla fase successiva, quanto a lungo la agiti, o la temperatura a cui viene tenuta, o un'altra variabile a tua scelta.

4. Lasciar riposare le provette sul banco in un portaprovette per un minuto.
5. Usa una pipetta di trasferimento o una micropipetta a volume regolabile per rimuovere 100 μ L del liquido sopra il germe di grano, chiamato surnatante. Fai attenzione a non disturbare il germe di grano sul fondo. Aggiungere il surnatante a una provetta da microcentrifuga pulita etichettata con gli stessi numeri usati sopra.
6. Usare una pipetta di trasferimento o una micropipetta a volume regolabile per aggiungere 100 μ L della soluzione GelGreen a ciascuna provetta con il surnatante. Tappare le provette e capovolgere alcune volte per mescolare.
7. Posiziona la provetta nel lettore di fluorescenza Winston e metti il cappuccio fotografico sopra. Usa la fotocamera del tuo cellulare per documentare la fluorescenza nelle provette.
8. Confronta visivamente la luminosità della fluorescenza nelle provette. Quali sono le più luminose? Cosa ti dice questo sulla concentrazione di DNA nella soluzione? Quali reagenti o variabili pensi abbiano avuto il maggior effetto sulla quantità di DNA estratto? Registra le tue risposte nella Tabella 1.

Parte II: Sviluppa il tuo protocollo

Tempo stimato: 20 min

Nella Parte 1, hai probabilmente identificato uno o più fattori che influenzano la quantità di DNA che puoi estrarre dal germe di grano. Scegli un reagente o una variabile da investigare più in dettaglio. Se sei interessato a uno dei reagenti potresti provare a variare la concentrazione facendo una diluizione seriale della soluzione stock. Se sei interessato al calore o al tempo, potresti variare sistematicamente la temperatura o il tempo di incubazione del germe di grano nella soluzione che hai scelto di aggiungere.

Di nuovo, testerai quattro condizioni in quattro provette. Guarda l'elenco dei reagenti e delle variabili di cui sopra e considera quali vorresti confrontare in un esperimento di estrazione del DNA. Progetta il tuo esperimento nello spazio sottostante, poi segui la procedura generale di cui sopra per estrarre il DNA dal germe di grano e confronta la concentrazione di DNA tra le provette. Registra ciò che hai intenzione di aggiungere a ciascuna delle provette e qualsiasi altra variabile rilevante (ad esempio il tempo di incubazione o la temperatura).

Quali variabili manterrai uguali tra i tubi?

Quale variabile cambierai tra i tubi?

Quale sarà il tuo trattamento di controllo? (Cioè, con quale tubo confronterai gli altri tubi?)

Usa lo spazio qui sotto per schematizzare il tuo esperimento:

Come influisce il cambiamento della variabile sulla concentrazione di DNA che hai estratto?

Quale livello della variabile sceglieresti per una concentrazione ottimale di DNA estratto?

Parte III: Raffina il tuo approccio

Tempo stimato: 20 min

Nelle parti 1 e 2 hai identificato le variabili che influenzano l'estrazione del DNA e potresti esserti avvicinato all'identificazione delle condizioni ottimali per estrarre il DNA dal germe di grano. Nella Parte 3, il tuo compito è quello di risolvere una domanda che ti rimane. Forse hai scoperto che un tempo di incubazione più lungo produce concentrazioni maggiori di DNA in acqua. Qui potresti verificare se un tempo di incubazione più lungo dà anche una migliore estrazione in una soluzione di Tween-20. Forse hai determinato che il riscaldamento del campione dà una migliore estrazione del DNA in acqua. Qui si potrebbe verificare se questo è vero quando si usa il tampone bicarbonato.

Di nuovo, usa le domande qui sotto per pianificare il tuo esperimento, poi segui la procedura generale per estrarre il DNA dal germe di grano e confronta la concentrazione di DNA tra le provette.

Quali variabili manterrai uguali tra i tubi?

Quale variabile cambierai tra i tubi?

Quale sarà il vostro trattamento di controllo?

Usa lo spazio qui sotto per schematizzare il tuo esperimento:

Sulla base dei tuoi risultati nelle parti 1 - 3, qual è il miglior protocollo per estrarre il DNA dal germe di grano? Descrivi la soluzione che aggiungeresti alla provetta con il germe di grano e qualsiasi altro trattamento che applicheresti alla provetta.

Parte IV: Attività di Estensione (Opzionale)

In questa attività opzionale, userete i principi che avete imparato nelle parti 1-3 per estrarre il DNA dalla frutta o dalla verdura di casa vostra. Questo esperimento sarà leggermente diverso dalle estrazioni del germe di grano perché invece di visualizzare la concentrazione di DNA in soluzione con il GelGreen fluorescente, faremo precipitare e "spooling" il DNA. Dimostreremo l'estrazione del DNA usando materiali poco costosi che potete trovare in casa.

(Spooling del DNA, metodo per ottenere DNA sotto forma di bobina su una bacchetta).

Nota: se state usando fagioli secchi dovrete metterli in ammollo per reidratarli. Potete metterli in ammollo in acqua a temperatura ambiente per una notte o in acqua calda per un paio d'ore. Saprete che sono reidratati quando potrete facilmente togliere le bucce. Le bucce dovrebbero essere rimosse dai fagioli prima di fare l'estrazione.

1. Prepara 100 mL della tua "soluzione di estrazione". Ecco alcuni consigli su come prendere i principi che hai imparato nelle parti 1-3 e applicarli a questo nuovo esperimento:

- Al posto del Tween-20, si può mescolare acqua con detergente liquido.
- Puoi fare il tuo tampone di bicarbonato mescolando il bicarbonato di sodio con l'acqua.
- Per precipitare e far precipitare il DNA dovremo aggiungere una piccola quantità di sale alla miscela. Il sale neutralizza le cariche negative sulla spina dorsale del DNA e permette ai filamenti di DNA di raggrupparsi e precipitare.

2. Scegliete un frutto o un vegetale da cui estrarre il DNA. Abbiamo scoperto che fragole, kiwi, cipolle e fagioli secchi funzionano bene.

3. Mettete la frutta o la verdura che avete scelto in un sacchetto di plastica con chiusura lampo. Usa una fragola con il gambo e le foglie rimosse, un paio di fette di kiwi o la quantità equivalente di un altro frutto o verdura fresca. Se usi i fagioli, rimuovi le bucce, metterne circa 10 nel sacchetto di plastica e schiacciali con un mattarello o il fondo piatto di una tazza.

4. Versare circa 25 mL di soluzione di estrazione nel sacchetto. Schiacciate **delicatamente** la frutta o la verdura con le mani fino a quando tutti i pezzi grossi saranno spariti. Se stai usando il detersivo, fai attenzione a creare meno bolle possibili. *Suggerimento: se si desidera, il sacchetto può essere immerso in una pentola di acqua calda per riscaldare la reazione. Usare pinze da cucina per maneggiare il sacchetto quando è caldo.*

5. Posizionare il colino a maglie sopra un becher o un bicchiere di plastica o di vetro trasparente e versare il contenuto del sacchetto nel colino per separare i solidi dai liquidi. Quando tutto il liquido è defluito, metti da parte il colino.
6. Versare delicatamente 10 mL di alcool isopropilico lungo il lato della tazza o del becher in modo da formare uno strato che galleggia sopra il liquido di estrazione.
7. Tieni la tazza o il becher all'altezza degli occhi ed esamina l'interfaccia tra i due liquidi. Dovresti vedere una sostanza bianca filamentosa. Questo è il DNA! Avvolgi con attenzione il DNA intorno a una bacchetta o a un bastoncino di legno e tiralo fuori dal liquido. Questo si chiama "spooling" del DNA. Se lo desideri, puoi salvare il DNA in una provetta da microcentrifuga.
8. Opzionale: ripeti questo esperimento di estrazione del DNA cambiando una singola variabile come abbiamo fatto con gli esperimenti sul germe di grano. Come influisce questa variabile sulla quantità di DNA che puoi raccogliere? Prova a variare la concentrazione del detergente o del sale, il tempo che passi a schiacciare la frutta o la verdura con la soluzione di estrazione, o la temperatura con la quale riscaldi il sacchetto.



 theminione.eu

 +39 02 359 80841

 info@theminione.eu

FastTaq, GreenGel e PrepOne sono marchi di Embi Tec. GelGreen è un marchio di Biotium.
MiniOne è un marchio registrato di C.C. IMEX. Brevetti in corso.