

**Insegnamento: Tecnologie Biochimiche e Ricombinanti –  
Modulo: Tecnologie Molecolari e Ricombinanti**

**Libri di testo consigliati:**

*Dale J.W., von Schantz M., Plant N., Dai geni ai Genomi, EdiSES, 2013*

*Primrose S. et al., Ingegneria genetica. Principi e Tecniche, Zanichelli, 2004*



*La **Macchina** è la più evidente forma di **Magia** che possediamo, e le due sono più strettamente correlate di quanto comunemente si ritenga*

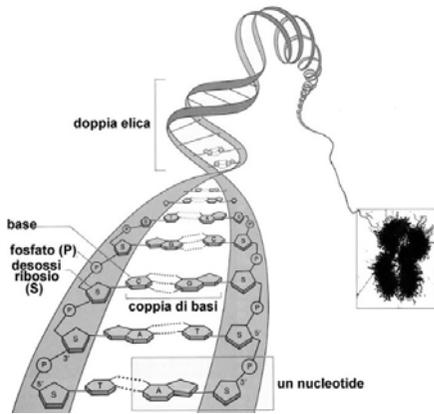
da una lettera di J.R.R Tolkien a Milton Waldman, 1951

# Estrazione di DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=2PK9hbqMKf8>



# Estrazione di DNA

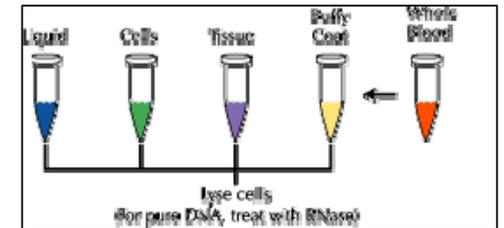


Gli acidi nucleici (**DNA/RNA**) possono essere estratti da qualsiasi cellula o tessuto.

L'estrazione di acidi nucleici è il primo passo nelle applicazioni di biologia molecolare.

Esistono numerosi **metodi di estrazione**, la scelta si effettua in base a:

- tipo di acido nucleico (**ssDNA**, **dsDNA**, RNA totale, mRNA, etc.)
- fonte (tessuti animali o vegetali, eucarioti, procarioti, virus)
- materiale di partenza (organo intero, tessuto, coltura cellulare, sangue, etc.)
- risultato desiderato (quantità, purezza, tempo richiesto/a disposizione)
- applicazione prevista post-estrazione (digestione con enzimi di restrizione, *Southern blotting*, PCR, clonaggio)



Una buona preparazione di DNA genomico è alla base della buona riuscita di qualunque successivo impiego di tecniche nell'ambito della biologia molecolare. Poiché il DNA è una molecola molto lunga, sottile, fragile e sensibile alle forze meccaniche, è molto difficile recuperarlo in forma intatta, per quanta cura si ponga nel maneggiarlo. Tuttavia, normalmente è sufficiente che durante la purificazione il DNA si mantenga in frammenti di 50-100 kilobasi (kb) per poter effettuare le analisi successive.

Nell'uomo il **DNA** è formato da circa **tre miliardi di nucleotidi**; ha una lunghezza di circa 1 m e per essere contenuto in una cellula piccola 10 micron, questo lunghissimo filamento deve necessariamente ripiegarsi su se stesso e formare strutture di complessità crescente che siano adatte a mantenerlo in forma compattata.

Accanto alle metodiche classiche utilizzate per l'estrazione del DNA come **l'estrazione Fenolo/Cloroformio** e il "**Salting Out**", esistono, svariati **kit commerciali** che hanno il pregio di accorciare notevolmente i tempi di purificazione, spesso però a scapito della resa finale.

## Estrazione di DNA

Accanto alle metodiche classiche utilizzate per l'estrazione del DNA come:

- ❑ **l'estrazione Fenolo/Cloroformio** e il
- ❑ **“Salting Out”**
- ❑ esistono, svariati **kit commerciali** che hanno il pregio di accorciare notevolmente i tempi di purificazione, spesso però a scapito della resa finale

## Estrazione di DNA mediante Fenolo/Cloroformio

1. La prima fase dell'estrazione prevede la **lisi delle cellule** con opportuni tamponi contenenti detergenti (SDS, Triton X-100) e con Proteinasi K, allo scopo di solubilizzare le membrane, complessare le proteine ed estrarre gli acidi nucleici.  
La proteinasi K ha la specifica funzione di digerire le proteine.

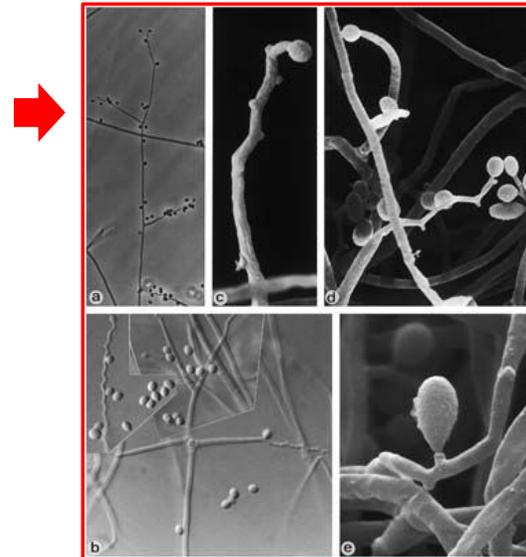
### PROTEINASI K

La Proteinasi K è una proteasi della famiglia delle subtilisine **isolata dal fungo** saprofita *Tritirachium album* ed è particolarmente adatta per digestioni che avvengono in tempi brevi.

Possiede un'alta attività, che aumenta ed è stabile all'aumentare della **temperatura** e risulta stabile anche all'aumentare della temperatura e dei valori di **pH**.

Per lavorare, questo enzima deve legare due **ioni calcio**, mentre il calcio libero in soluzione non è essenziale per l'attività enzimatica. Questo implica che l'attività della proteinasi K non è inibita dalla presenza dei chelanti degli ioni bivalenti come l'EDTA.

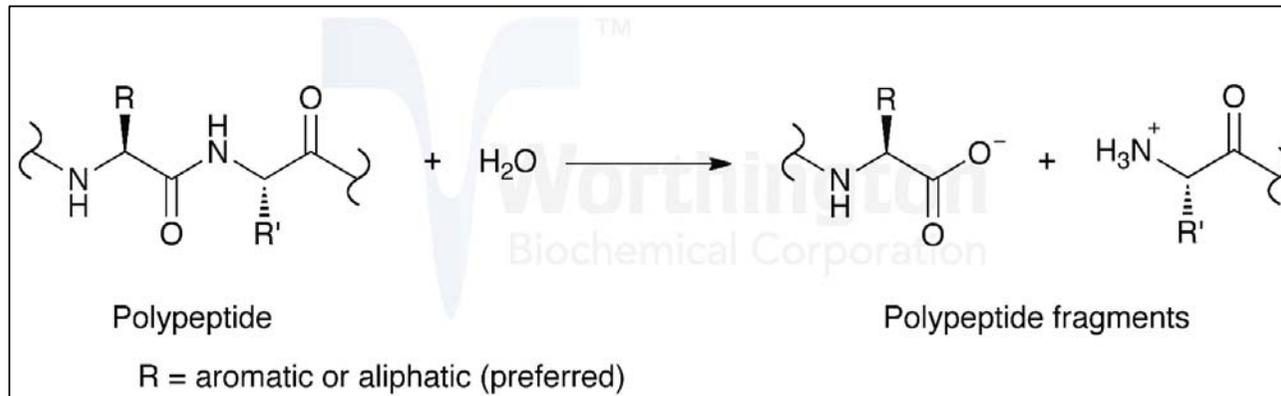
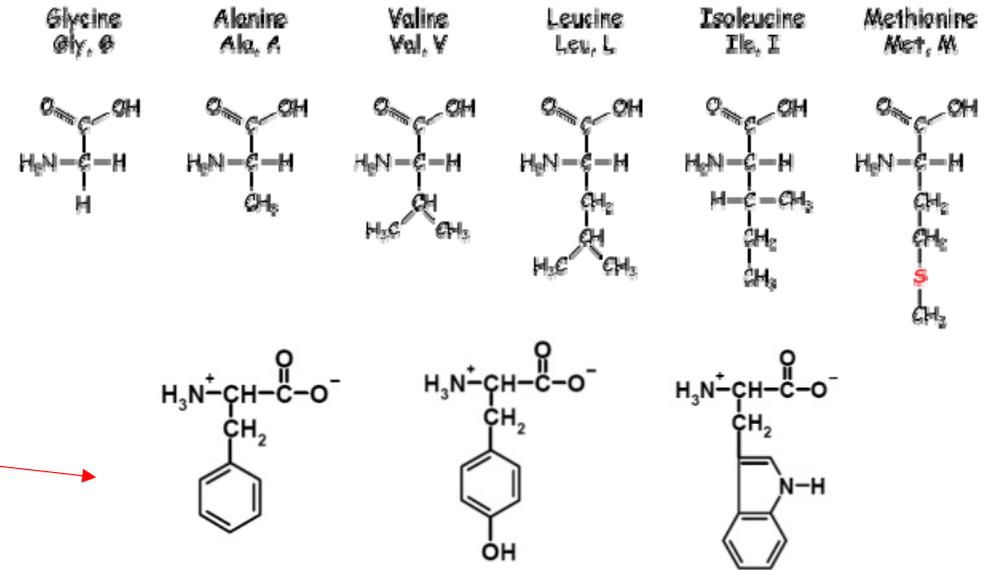
L'enzima fu scoperto nel 1974



# Proteinasi K

È comunemente usato per la ampia specificità.  
Il sito predominante di taglio è il legame peptidico  
adiacente:

- il gruppo alifatico carbossilico di....
- e aminoacidi aromatici (fenilalanina; tirosina; triptofano)  
con gruppi alfa-amminici boccati



# Proteinasi K

Proteinasi K è stabile in un ampio intervallo di pH (4–12; il pH ottimale è pH=8.0).

Proteinasi K non viene inibita da cloruro di guanidinio e il tiocianato di guanidinio, urea, Sarkosyl, Triton X-100, Tween 20, SDS, citrato, acido iodoacetico, EDTA o altri inibitori delle serin proteasi.

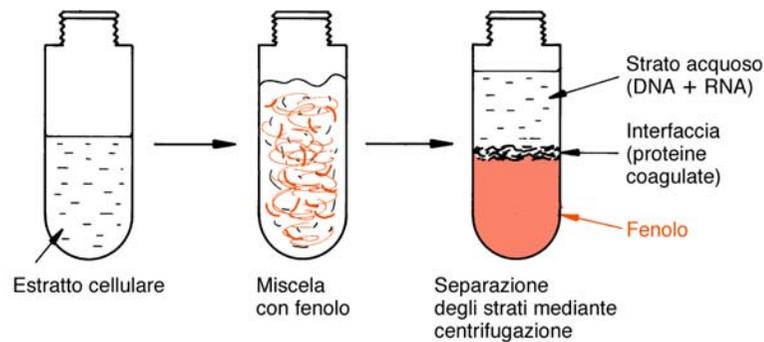
Un incremento della temperatura da 37°C a 50–60°C può aumentare l'attività dell'enzima, come l'aggiunta di 0,5-1% sodio dodecil solfato (SDS) o cloruro di guanidinio (GuHCl 3 M), tiocianato di guanidinio (1 M) ed urea (4 M). Le condizioni di cui sopra possono migliorare l'attività della proteinasi K rendendo i siti di rottura del substrato più accessibili.

**Temperature superiori ai 65 °C, l'acido tricloroacetico (TCA) o inibitori delle serin proteasi (AEBSF, PMSF o DFP) possono inibire l'attività.**

Buffer (pH = 8.0, 50°C, 1.25 µg/mL protease K, 15 min incubation)	Proteinase K activity (%)
30 mM Tris·Cl	100
10 mM Tris·Cl; 100 mM EDTA; 20 mM NaCl; 1% Sarkosyl	74
10 mM Tris·Cl; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.45% Tween 20; 0.5% Triton X-100	106
10 mM Tris·Cl; 100 mM EDTA; 0.5% SDS	120
10 mM Tris·Cl; 25 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.5% SDS	128
30 mM Tris·Cl; 10 mM EDTA; 1% SDS	203
30 mM Tris·Cl; 30 mM EDTA; 5% Tween 20; 0.5% Triton X-100; 800 mM (GuHCl)	313
36 mM Tris·Cl; 36 mM EDTA; 5% Tween 20; 0.36% Triton X-100; 735 mM GuHCl	301

## Estrazione di DNA mediante Fenolo/Cloroformio

2. La seconda fase prevede la duplice **estrazione Fenolo/Cloroformio**, che ci permette di separare una componente organica (inferiore) contenente proteine, da una fase acquosa (superiore) contenente gli acidi nucleici. All'interfaccia, le proteine denaturate e in parte dissolte dal fenolo, formano uno strato bianco.



3. La terza fase ci permette di eliminare l'RNA mediante trattamento con **RNasi**.

4. La quarta fase prevede la **precipitazione del DNA in etanolo assoluto in presenza di sali**: tale precipitazione in presenza di concentrazioni relativamente alte di ioni monovalenti (NaCl 100-500 mM) è indispensabile per concentrare le soluzioni di DNA ed eliminare i residui di Fenolo e Cloroformio.

5. La quinta fase prevede un breve **lavaggio in etanolo al 70%** che permette di rimuovere gran parte dei cationi monovalenti che possono interferire nell'attività di enzimi utilizzati nelle successive analisi molecolari.

## Estrazione di DNA mediante Salting Out

Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante soluzione di lisi e il trattamento con la Proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le **proteine presenti che vengono rimosse poi mediante precipitazione con i sali**.

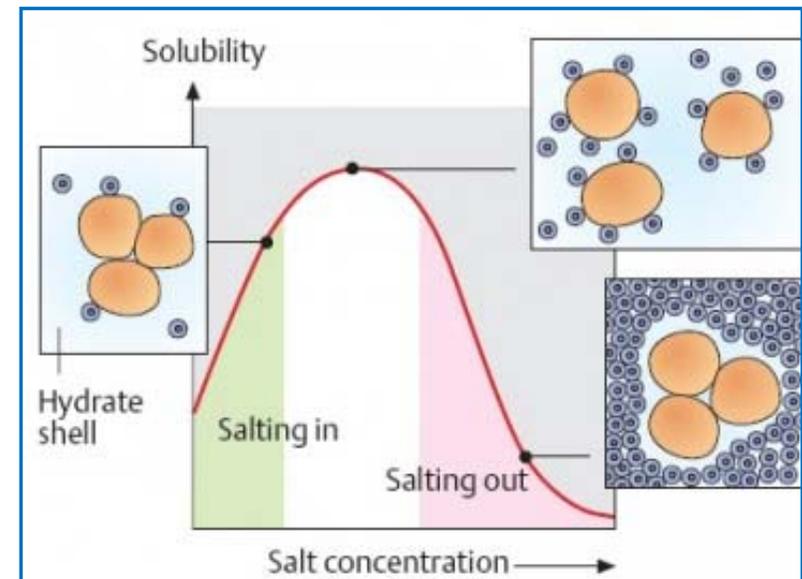
La precipitazione delle proteine mediante “salting out” è uno dei metodi più utilizzati e sfrutta il principio secondo il quale **la solubilità delle proteine in soluzione dipende** dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazioni salina (o forza ionica).

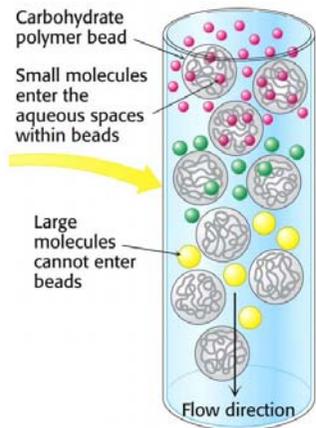
A basse concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine aumenta lentamente (salting in), mentre **ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente** (salting out) causando la **precipitazione** delle stesse.

Infine, mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA.

### PRINCIPIO DEL “SALTING OUT”.

La solubilità delle proteine dipende fortemente dalla concentrazione salina (forza ionica) della soluzione. Esse sono scarsamente solubili nell'acqua pura e la loro solubilità aumenta man mano che si instaurano delle interazioni tra gli ioni e la superficie delle proteine (**salting in**). Ad elevate concentrazioni di sali, a causa delle interazioni tra gli ioni salini e l'acqua diminuisce l'idratazione sulla superficie delle proteine, portando alla loro aggregazione ed precipitazione (**salting out**). Quindi, aggiungendo un sale come l'ammonio solfato  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  è possibile separare le proteine (che precipitano) da una miscela sfruttando la diminuzione della loro solubilità (frazionamento).





## Estrazione di DNA mediante kit commerciali

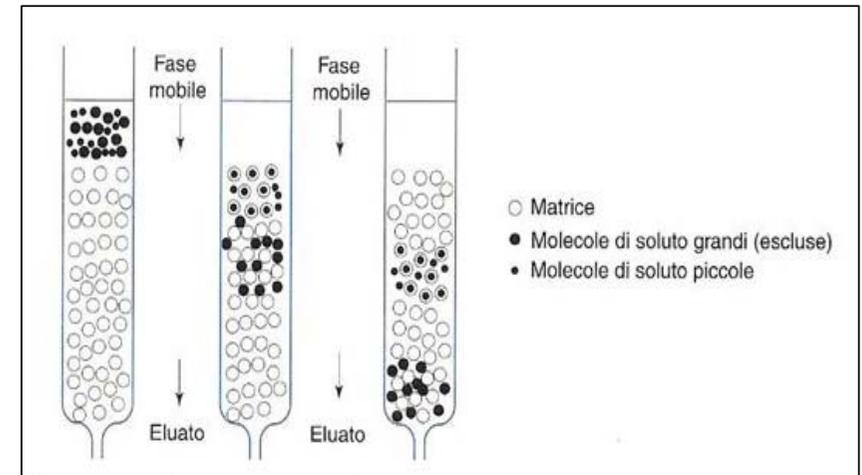
La maggior parte dei kit commerciali si basano sul principio della cromatografia

Per estrarre acidi nucleici in maniera efficiente è necessario scegliere il **kit adeguato**

- al campione utilizzato
- all'acido nucleico da estrarre
- alla tipologia di esperimenti che devono essere seguiti dopo estrazione
- al numero e la dimensione dei campioni da analizzare
- al tempo che si ha a disposizione

1. **Cromatografia per gel filtrazione**: si separano le molecole in base alle loro dimensioni. La matrice è costituita da particelle sferiche porose (**setaccio molecolare**: Polidestano "Sephadex", poliacrilamide "Sephacryl o Biogel", agarosio "Sephacrose"). E' il tipo di cromatografia più utilizzata e sono a disposizione colonnine di diversa grandezza pronte all'uso e sterili che permettono di purificare DNA a singolo o doppio filamento (oppure RNA).

**Le molecole più grandi delle dimensioni dei pori della matrice verranno eluite dalla colonna, mentre le molecole più piccole saranno tratteneute all'interno della matrice stessa**; per questo è raccomandabile che ci sia una **differenza di almeno 3 volte** tra le dimensioni dell'acido nucleico da estrarre e quelle delle contaminanti proteiche. Inoltre, la **dimensione dei pori** della matrice viene scelta in base al *range* di separazione e l'applicazione.



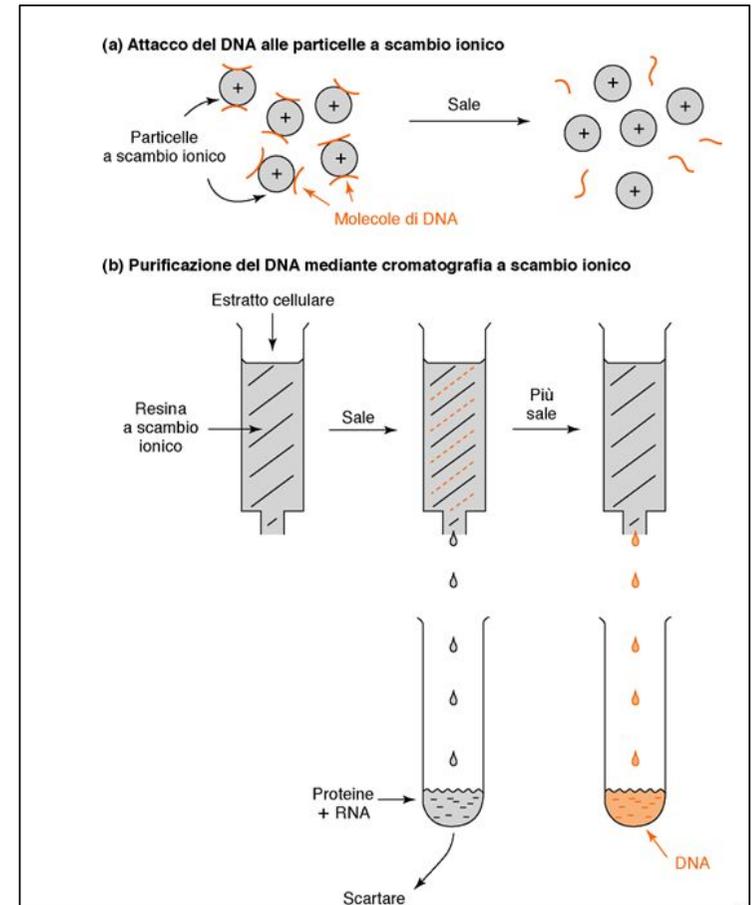
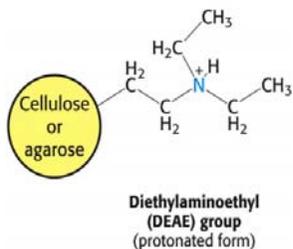
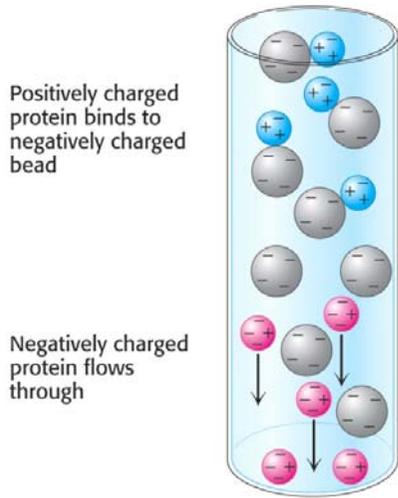
# Estrazione di DNA mediante kit commerciali

La maggior parte dei kit commerciali si basano sul principio della cromatografia

2. **Cromatografia a scambio ionico**: si separano le molecole di interesse **in base alla loro carica**. La matrice della colonna consiste di una resina dotata di carica negativa (Cromatografia a scambio cationico) o positiva (Cromatografia a scambio anionico) e le molecole cariche sulla matrice saranno o meno adsorbite dalla resina a seconda della loro carica complessiva e delle condizioni di pH e forza ionica del campione.

Le molecole trattenute dalla colonna vengono poi rilasciate quando **si modificano in modo opportuno le caratteristiche del tampone**.

Nella purificazione di acidi nucleici, carichi negativamente, è utilizzata solo la **cromatografia a scambio anionico** (ad esempio, **DEAE cellulosa**).



# Estrazione di DNA mediante kit commerciali

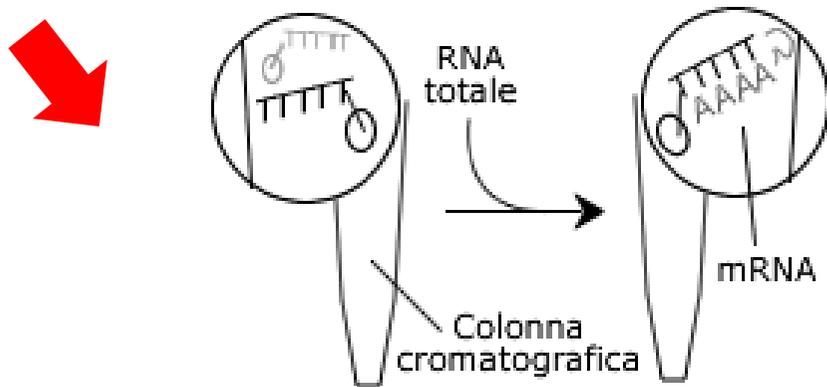
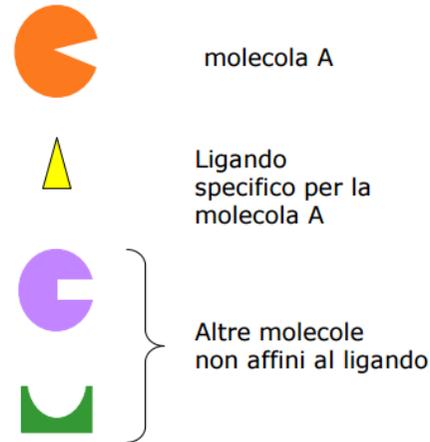
La maggior parte dei kit commerciali si basano sul principio della cromatografia

3. **Cromatografia per affinità**: si separano le molecole di interesse in base alla loro elevata affinità per un gruppo chimico o una macromolecola immobilizzata sulla matrice inerte della colonna.

Queste saranno captate e legate alla matrice e verranno rilasciate modificando il tampone

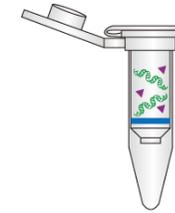
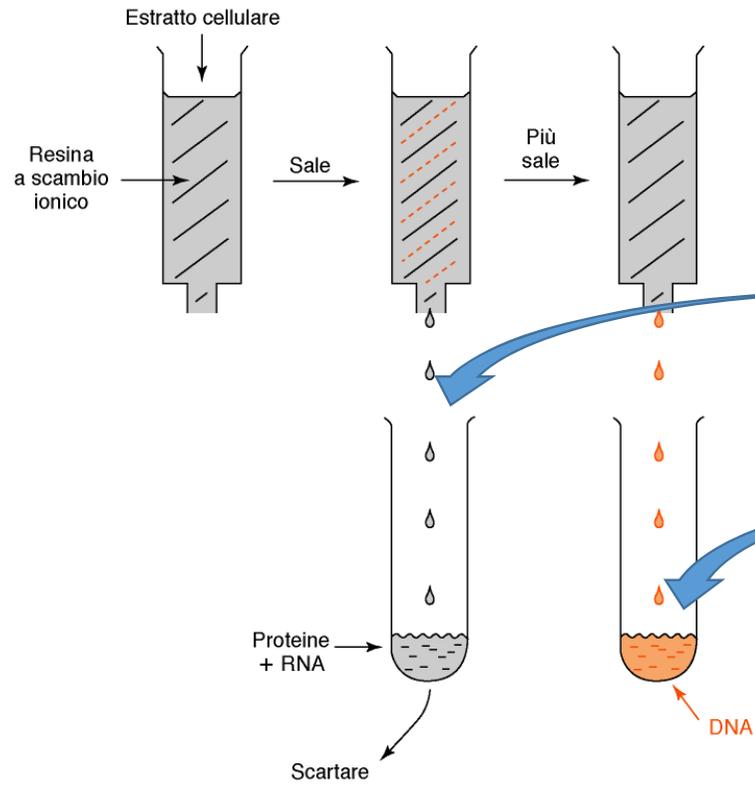
Molto usata per la purificazione dell'acido nucleico non DNA, bensì mRNA poliA+, usando colonne con oligo dT cellulosa

Fase stazionaria : granuli di resina coniugata al ligando  
Fase mobile: solventi acquosi  
( Uso comune: separazione di proteine)

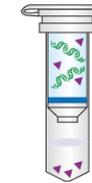


# Estrazione di DNA mediante kit commerciali

(b) Purificazione del DNA mediante cromatografia a scambio ionico



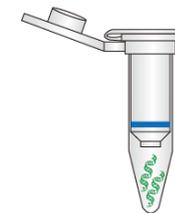
DF Buffer reaction



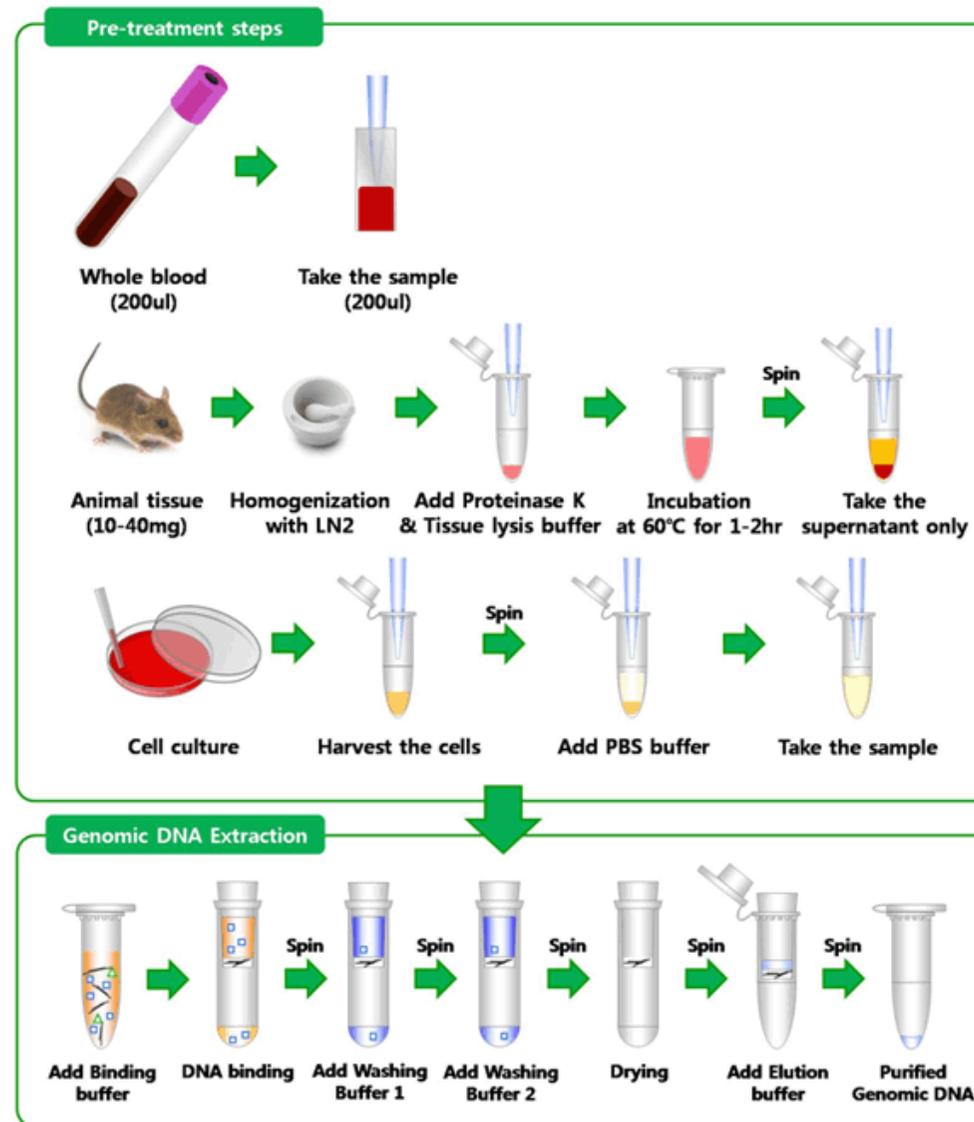
DNA Binding



Wash

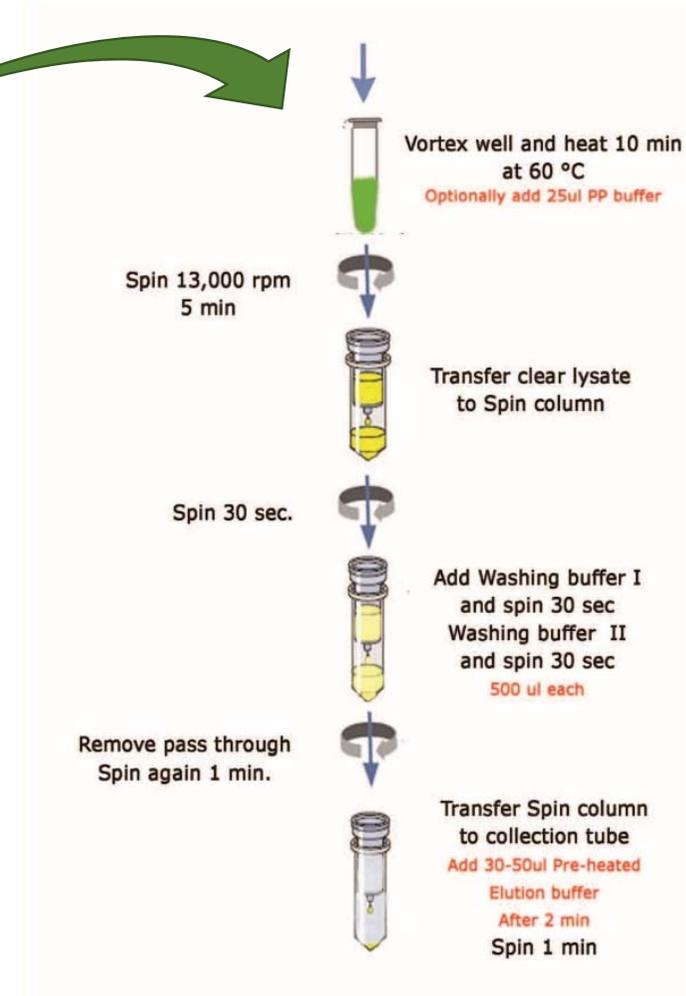
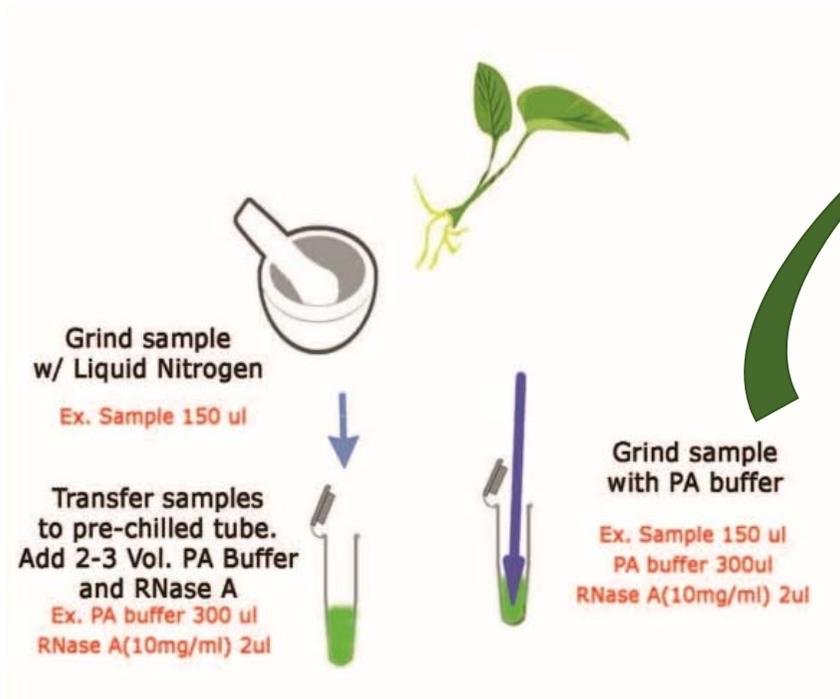


Elution



Attraverso varie centrifugate è possibile ottenere una riduzione dei tempi impiegati per l'estrazione

# Estrazione di DNA mediante kit commerciali



# 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. Per molti anni il grosso problema associato ai metodi classici di estrazione di acidi nucleici da tessuti vegetali è stato legato alla loro bassa resa partendo da grossi quantitativi di materiale fresco. Attualmente sono disponibili protocolli molto efficienti che garantiscono l'estrazione di grossi quantitativi di DNA partendo da piccole quantità di tessuto vegetale. La maggior parte di essi fa uso del cetyl trimetil ammonio bromuro, conosciuto come CTAB<sup>1</sup>. 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°C.

## 2- DISTRUZIONE DELLA PARETE CELLULARE

Le cellule vegetali presentano una parete cellulare per la cui rimozione spesso si ricorre al congelamento (-80°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.

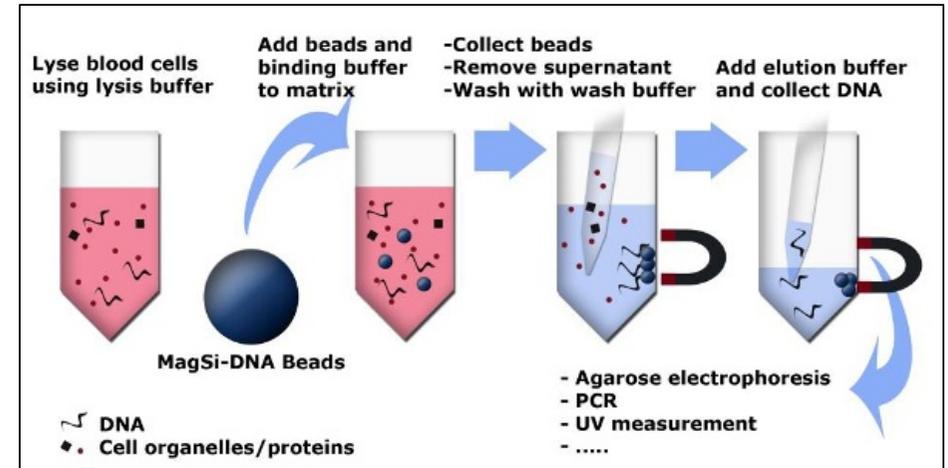
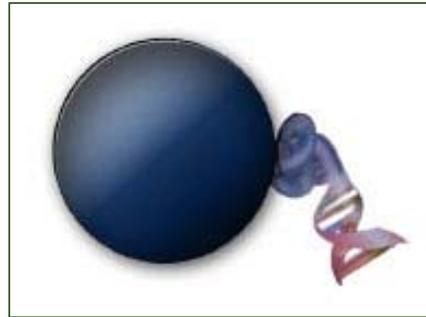
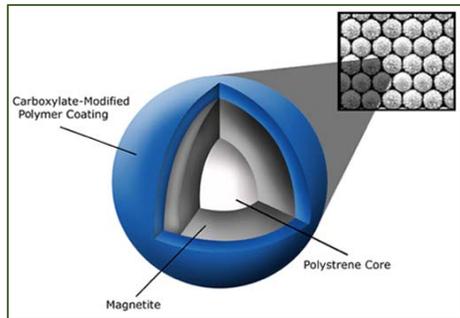
Le sostanze che generalmente prendono a far parte del tampone sono riportati di seguito. Per ciascuna di esse è indicata la funzione svolta durante questa prima fase di estrazione:

- **SDS (Sodio Dodecil Solfato:  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ )** surfattante<sup>2</sup> cationico in grado di rompere i legami no-covalenti nelle proteine e dunque di 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.

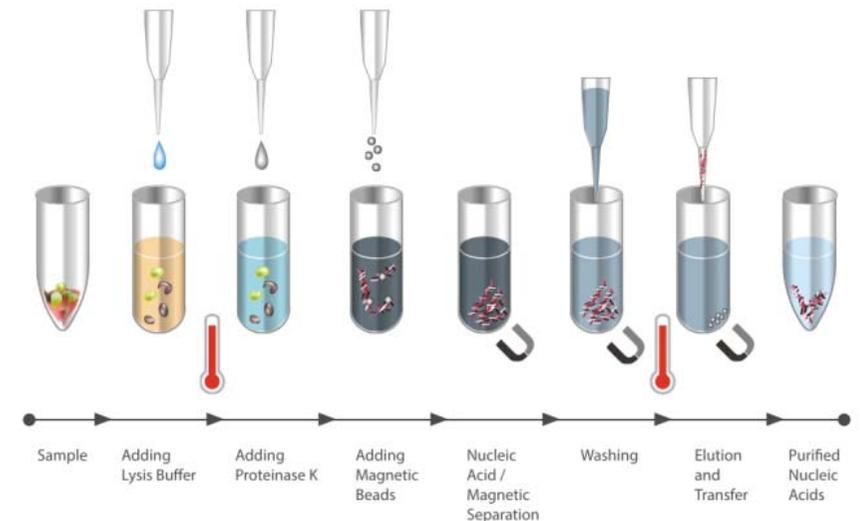
## 4- PRECIPITAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA

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).

## Estrazione di DNA mediante biglie magnetiche



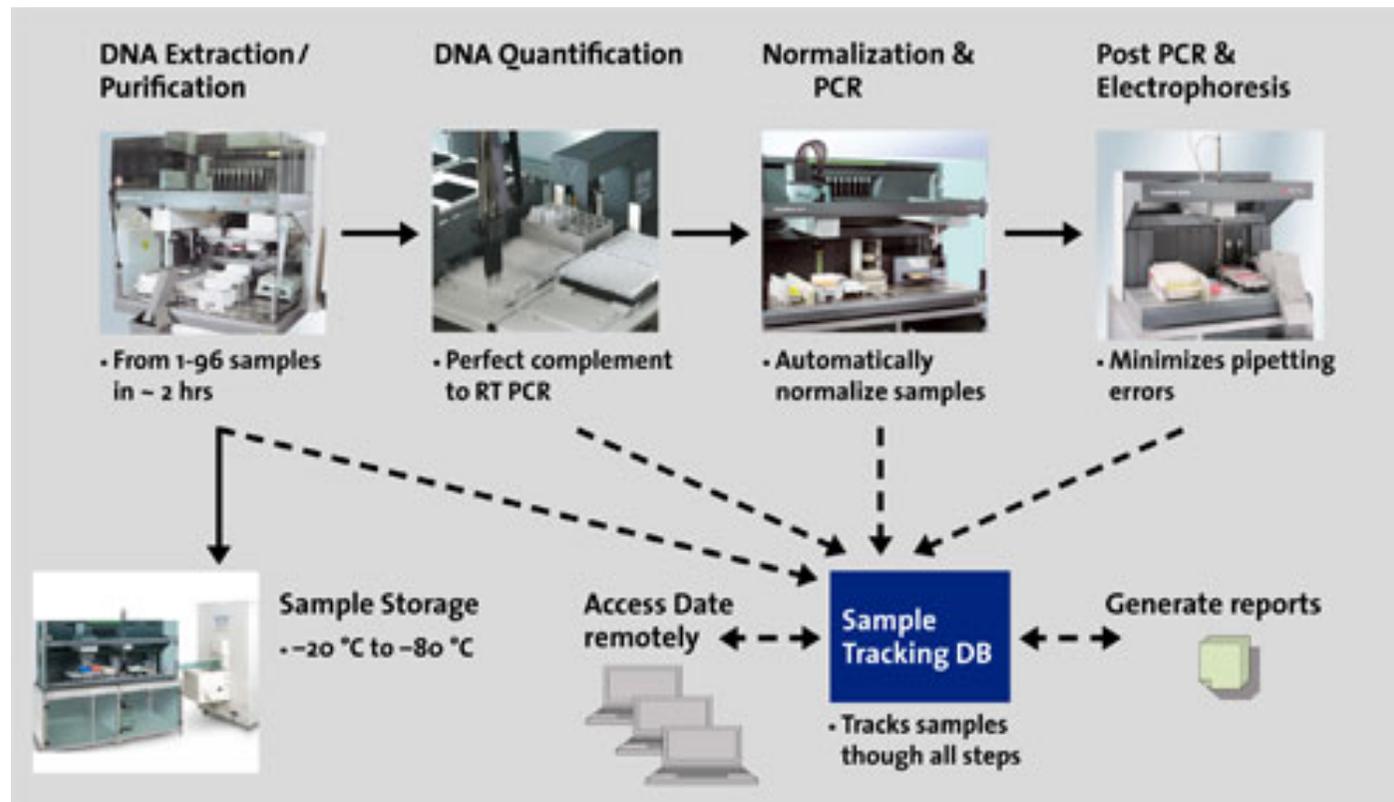
Alcuni metodi commerciali utilizzano particelle magnetiche che agiscono come fase solida attorno alla quale si lega l'acido nucleico e non necessitano quindi di alcun passaggio di centrifugazione e filtrazione. Infatti, dopo una fase iniziale di lisi, è prevista digestione con proteinasi K, quindi **si fa avvenire il legame tra le molecole di DNA e le biglie magnetiche (Magnetic silica beads)**. Si attiva una piastra magnetica, che attira a se le biglie caricate con il DNA, mantenendole sul fondo del tubo, in modo da poter aspirare agevolmente il surnatante contenente i contaminanti da buttare. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a vari lavaggi rapidi per eliminare ulteriori contaminanti e sali. Infine, il DNA eluito dalle biglie utilizzando opportuni buffers, viene risospeso per essere utilizzato.



## Estrazione di DNA automatizzata



## Estrazione di DNA automatizzata...ma non solo



# Quantificazione di acidi nucleici mediante analisi spettrofotometrica

La quantificazione di acidi nucleici viene comunemente eseguita per determinare **la concentrazione** di DNA (o RNA) presenti in soluzione, così come la loro **purezza**. Le reazioni che utilizzano acidi nucleici spesso richiedono una quantità sufficiente e un buon grado di purezza per ottenere prestazioni ottimali. **Gli acidi nucleici assorbono la luce ultravioletta in modo specifico.**

Esistono diversi metodi per stabilire la concentrazione di una soluzione di acidi nucleici:

- ❑ quantificazione spettrofotometrica all'UV
- ❑ analizzando la fluorescenza dopo eccitazione con lampada UV, in presenza di un colorante legante DNA.

In uno spettrofotometro, un campione viene esposto a luce UV con lunghezza d'onda di 260 nm, un foto-rilevatore misura la luce che passa attraverso il campione (diluito in una **cuvetta di quarzo**). Più luce viene assorbita dal campione, maggiore è la concentrazione di acido nucleico nel campione.

**Un'assorbanza (A) = 1 corrisponde ad una concentrazione di 50 ug/ml di DNA a doppio filamento**

Assorbanza: Legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} l \times M$$

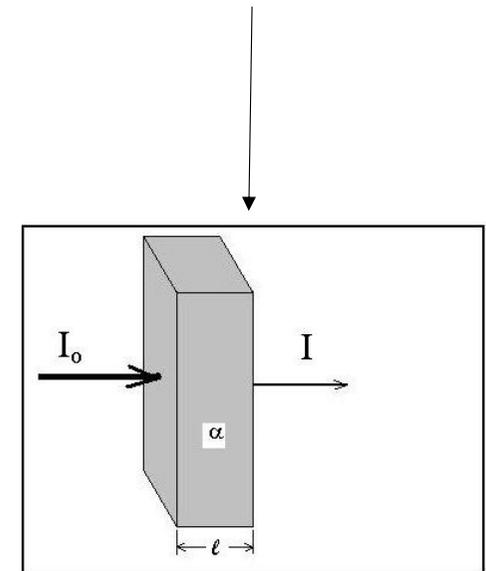
$\epsilon_{\lambda}$  rappresenta l'estinzione molare (l'assorbimento della luce da parte di una sostanza ad una determinata  $\lambda$ ), **M (=c, concentrazione)** è la molarità della soluzione ed **l** è il percorso geometrico.

Il valore  $\epsilon_{\lambda}$  è considerato costante per una data lunghezza d'onda (almeno a temperatura costante).

Inoltre, la costanza è garantita solo in un certo *range* di concentrazione.

The diagram shows the equation  $\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon l c$  with labels:  $\epsilon$  is labeled 'Greek letter, epsilon',  $c$  is labeled 'concentration of solution (mol dm<sup>-3</sup>)', and  $l$  is labeled 'length of solution the light passes through (cm)'. The entire equation is circled in red.

La Legge di Lambert-Beer:  
quantificazione della luce assorbita da una sostanza in soluzione è **DIRETTAMENTE PROPORZIONALE** alla sua concentrazione nella soluzione (considerando costante il percorso della luce che l'attraversa).

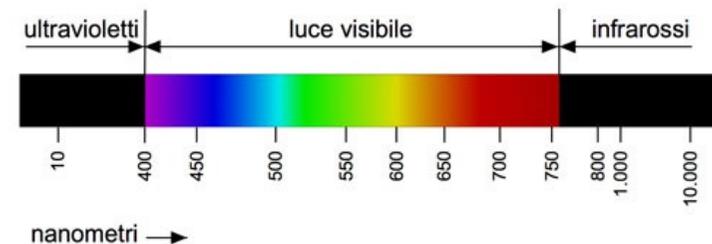


# Quantificazione degli acidi nucleici mediante analisi spettrofotometrica

E' frequente per i campioni di acidi nucleici essere contaminati con altre molecole (cioè proteine, composti organici, altro). Il rapporto tra l'assorbanza a 260 e 280 nm (**A<sub>260/280</sub>**) viene utilizzato per valutare la **purezza** di acidi nucleici. **Per il DNA puro, A<sub>260/280</sub> è ~ 1.8** e per puro **RNA A<sub>260/280</sub> è ~ 2**. Il rapporto A<sub>260/280</sub> viene comunemente utilizzato **per valutare la contaminazione di soluzioni di DNA da parte di proteiche**, poiché le proteine (in particolare, gli amminoacidi aromatici) assorbono la luce a 280 nm.

## Altri contaminanti comuni

- ❑ Contaminazione da fenolo, che è comunemente usato nella purificazione degli acidi nucleici, può alterare in modo significativo le stime di quantificazione. **Il Fenolo assorbe con un picco a 270 nm e un rapporto A<sub>260/280</sub> di 1.2.** rappresenta una contaminazione da fenolo e può contribuire in modo significativo alla sovrastima della concentrazione del DNA.
- ❑ Un assorbimento a 230 nm può essere causata dalla contaminazione da ioni fenolato, tiocianati, e altri composti organici. **Per un campione di RNA puro, l'A<sub>230: 260: 280</sub> dovrebbe essere circa 1: 2: 1, e per un campione di DNA puro, l'A<sub>230: 260: 280</sub> dovrebbe essere di circa 1: 1,8: 1.**
- ❑ Un assorbimento a **330 nm indica una contaminazione da particolato**. Il valore in un campione di acido nucleico puro deve essere zero.
- ❑ Valori negativi potrebbero indicare che una soluzione non corretta è stata usata come «bianco».



## Quantificazione di microvolumi di acidi nucleici: Spettrofotometro NanoDrop 2000c



# Quantificazione di microvolumi di acidi nucleici: Spettrofotometro NanoDrop 2000c

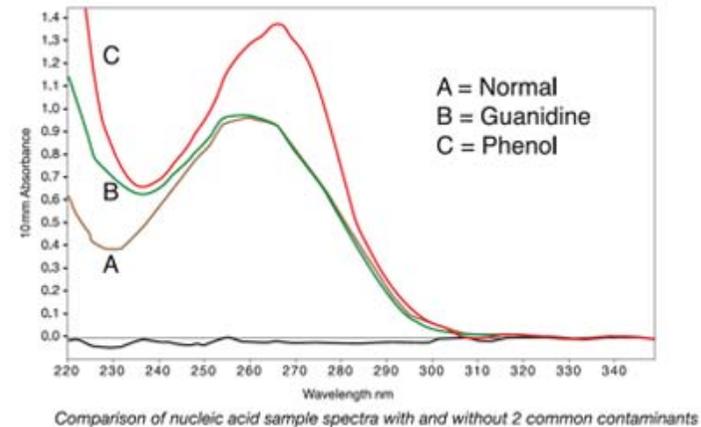
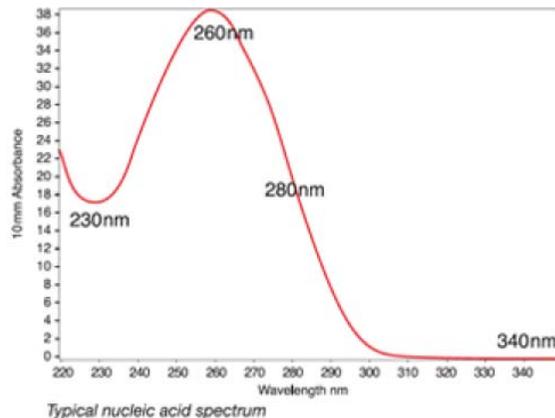
1. Inizialmente, pulire le superfici ottiche superiori e inferiori del sistema di ritenzione del campione pipettando 2 a 3  $\mu$ l di acqua deionizzata pulita sulla superficie ottica inferiore.
2. Chiudere il braccio di leva, assicurando che il piedistallo superiore entri in contatto con l'acqua deionizzata. Sollevare il braccio di leva e pulire entrambe le superfici ottiche con un fazzolettino secco, pulito, privo di lanugine.
3. Aprire il software NanoDrop e selezionare l'applicazione di acido nucleico. Utilizzare un piccolo volume, per eseguire una misurazione in bianco dispensando 1  $\mu$ l di tampone sulla superficie ottica inferiore. Abbassare il braccio di leva e selezionare "vuoto" nella domanda relativa alla presenza di di acido nucleico.
4. Una volta che la misurazione del bianco è stata fatta, pulire le superfici ottiche.
5. Scegliere la costante appropriata per la lettura del campione che deve essere misurato.

**Table 1. Typical nucleic acid concentration ranges for direct A260 absorbance measurements**

<b>Sample Type</b>	<b>Select Option</b>	<b>Constant Used to Calculate Concentration</b>
dsDNA	DNA-50	50
ssDNA	DNA-33	33
RNA	RNA-40	40
Oligo	Custom	15-150

# Quantificazione di microvolumi di acidi nucleici: Spettrofotometro NanoDrop 2000c

6. Dispensare **1 µl** di campione di acido nucleico sul piedistallo ottico inferiore e chiudere il braccio di leva. Poiché la misura è indipendente del volume, il campione deve solo fare da ponte tra le due superfici ottiche di misura.
7. Selezionare "Misura" nel software applicativo. Il software calcola automaticamente i rapporti di concentrazione di acido e di purezza nucleici. A seguito di misurazione del campione, esaminare **l'output spettrale**.
8. Il software calcola automaticamente i rapporti di concentrazione di acido e di purezza nucleici. A seguito di misurazione del campione, rivedere l'immagine spettrale **per valutare la qualità del campione**.
9. Tipico esempio di acido nucleico, ha un profilo molto caratteristico.
10. Le fonti comuni di contaminanti associate con specifiche tecniche di l'estrazione per isolamento degli acidi nucleici, **come fenolo/Trizol, possono causare spettri anomali tra 220 a 240 nm** e spostamenti dello spettro ai valori di 260 al 280 nm. Viceversa, residui di guanidina dall'estrazione possono contribuire ad un picco vicino a 230 nm e uno spostamento nel trogolo da 230 nm a circa 240 nm.



## Quantificazione di microvolumi di acidi nucleici: Spettrofotometro NanoDrop 2000c

11. Per valutare con precisione la qualità del campione, i rapporti 260/280 o 260/230 dovrebbero essere analizzati in combinazione con la qualità complessiva dello spettro. Gli acidi nucleici puri in genere producono un rapporto di 260/280 di  $\sim 1,8$  e un rapporto di 260/280 di  $\sim 2.0$  rispettivamente per DNA e RNA. Questo rapporto dipende dal pH e forza ionica del tampone utilizzato per effettuare le misurazioni del bianco e del campione. Soluzioni acide faranno diminuire il rapporto di 0.2-0.3, mentre una soluzione basica farà aumentare il rapporto di 0.2-0.3. Significativamente diversi rapporti di purezza possono indicare la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono fortemente vicino ai 280 nm.
12. Lo Spettrofotometro NanoDrop può anche essere utilizzato per quantificare le proteine utilizzando assorbanza diretta o test colorimetrici. Per garantire una corretta formazione e riproducibilità della «goccia», sono consigliati per i campioni di proteine volumi di 2 microlitri.

