

Note generali sul laboratorio interattivo DNA:

All'atto della prenotazione dell'attività avete ricevuto un link che vi farà accedere a una **pagina Web**, nella quale troverete:

- **link e informazioni per il collegamento** con data e ora
- **questo documento**, contenente eventuali aggiornamenti di cui, se ci invierete una mail di richiesta, vi segnaleremo la pubblicazione
- eventuali **informazioni e materiale aggiuntivi** per il lab interattivo
- **link per altre attività online** associate
- **indirizzo email** a cui rivolgere richieste di aggiornamenti, chiarimenti, approfondimenti e accesso ad altre attività post-Festival

In linea con il tema dell'edizione 2021 del Festival, "Mappe", questa attività offrirà una visione di insieme di percorsi della ricerca per lo studio di problemi e sistemi complessi. Per cercare di fornire, nei 50 minuti dell'incontro, un'idea rigorosa ma chiara delle combinazioni di metodologie sperimentali e modelli interpretativi richieste da questi percorsi, l'attività è stata articolata in:

- interventi che illustrano aspetti, metodi e applicazioni rilevanti per la tematica del progetto
- laboratorio sperimentale interattivo previsto in diverse fasi (approfondimento in calce)
- attività online da condurre durante o dopo gli interventi, al fine di integrare gli elementi illustrati con informazioni aggiuntive e verificare le conoscenze acquisite

Ecco nei dettagli il percorso complessivo dell'attività:

1) Nei giorni precedenti l'incontro:

- Dovreste procurarvi il materiale per realizzare la parte sperimentale e approfondire i concetti di base indicati di seguito nella parte del documento dedicata al laboratorio interattivo*
- Dovreste scaricare dalla pagina Web dell'attività e utilizzare eventuali aggiornamenti di questo documento e/o altri materiali aggiuntivi per il lab* e altre parti** dell'attività
- Dovreste eseguire a scuola o, laddove possibile, a casa, gli esperimenti indicati di seguito e negli eventuali documenti integrativi*
- Potrete contattarci prima dell'incontro via email, all'indirizzo indicato nella pagina Web dell'attività, per eventuali problemi o chiarimenti

2) Il giorno dell'incontro:

- vi preparerete come indicato di seguito in questo documento e nell'eventuale materiale aggiuntivo o di aggiornamento*
- vi forniremo indicazioni di base sulla teoria, sulle problematiche, sulle applicazioni della tecnica illustrata
- eseguiremo ulteriori esperimenti e discuteremo in diretta degli esperimenti realizzati prima dell'incontro e/o di quelli realizzati nel corso dello stesso
- vi forniremo indicazioni su ulteriori attività da eseguire e/o materiale da studiare, reperibili alla pagina Web dell'attività
- seguirete interventi da vari istituti della Rete campana del CNR su aspetti, laboratori, apparecchiature, metodi e applicazioni rilevanti per la tematica generale dell'attività

3) Successivamente all'incontro:

- Potrete approfondire le esperienze sperimentali realizzate e/o eseguire le ulteriori attività indicate durante l'incontro***
- Collegandovi all'apposito link indicato nella pagina Web dell'attività potrete partecipare a giochi e altre attività online che avranno anche lo scopo di verificare/approfondire gli argomenti trattati durante l'incontro (il link sarà attivato all'inizio o dopo l'incontro)
- Per chiarimenti e/o accessi a ulteriori attività e materiali, potrete contattarci via mail agli indirizzi indicati nella pagina Web

Note:

* La mancata esecuzione di questi passaggi impedirà o ridurrà considerevolmente la parte sperimentale e interattiva del laboratorio

** La mancata esecuzione di questi passaggi ridurrà la fruibilità delle attività di ricerca illustrate nell'incontro

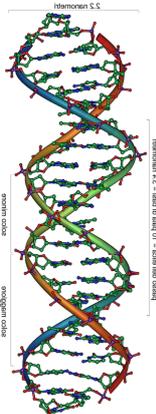
*** La mancata esecuzione di questi passaggi ridurrà la fruibilità e diminuirà l'efficacia ed i risultati delle attività online

Laboratorio interattivo: II DNA

Cos'è il DNA

Il DNA, acido deossiribonucleico, è la molecola depositaria delle informazioni genetiche in tutti gli organismi viventi.

Chimicamente è una molecola polimerica a doppia catena antiparallela, orientata, complementare, spiralizzata, le cui unità sono chiamate nucleotidi. Ogni nucleotide è formato da una **base azotata**, uno **zucchero con 5 atomi di Carbonio** (il D-2-deossiribosio) e un **gruppo fosfato**. Le basi azotate sono quattro: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T).



Il DNA è formato da due lunghe **catene polinucleotidiche** unite e stabilizzate mediante legami a idrogeno che si generano tra le basi azotate e altre interazioni di tipo idrofobico; esse sono avvolte nello spazio intorno a un asse virtuale, in senso destrorso, in modo da formare una doppia elica. Ciascuna base di una catena è appaiata sempre con una corrispondente base sull'altra catena, nelle coppie A-T e G-C. Il **preciso ordine di successione delle basi azotate determina**

l'ordine di successione degli amminoacidi nelle proteine codificate dal DNA, secondo una regola che viene designata "codice genetico".

Dove si trova?

Nelle cellule eucariotiche il DNA si trova all'interno del nucleo e di alcuni particolari organelli cellulari, come i mitocondri e i cloroplasti, mentre nelle cellule batteriche è localizzato in una specifica regione cellulare. Per poter restare in uno spazio microscopico come quello del nucleo

delle cellule, la doppia elica di DNA deve super-avvolgersi in maniera estremamente precisa e ben strutturata: infatti, se il contenuto di DNA di una singola cellula fosse completamente disteso, sarebbe lungo ben 2 metri.

Come si estrae?

Per realizzare l'estrazione del DNA in casa o nei laboratori scolastici sono sufficienti pochi materiali di uso comune e alcune sostanze non pericolose e di facile reperibilità. Utilizzeremo quindi piccoli contenitori graduati, sale da cucina, sapone liquido per stoviglie e alcol denaturato. Questo esperimento permetterà di visualizzare a occhio nudo il DNA come un **flocculo**, ovvero un precipitato biancastro dall'aspetto viscoso e filamentoso.

Per realizzare questa prova sperimentale si potrà partire da differenti tipologie di campioni biologici, ovvero si potrà utilizzare frutta (particolarmente adatti banane, kiwi o fragole), ortaggi (ad esempio spinaci o broccoli), carne (ad esempio fegato di pollo), pesce o molluschi (ad esempio pezzetti di alici o merluzzo o cozze), ma anche cellule di mucosa boccale.

Per estrarre il DNA dalle cellule è essenziale demolire le membrane cellulari e nucleari che sono costituite principalmente da molecole denominate fosfolipidi. E' poi necessario allontanare dal DNA varie sostanze presenti nelle cellule come i lipidi e le proteine. Infine, per poterlo visualizzare bisogna farlo precipitare.

Vediamo dunque passo per passo la procedura sperimentale che utilizzeremo.

Materiali e sostanze da procurare:

- piccoli contenitori di plastica o di vetro possibilmente con chiusura ermetica (come ad es. piccoli barattoli di miele o confettura di frutta dal volume di circa 15 ml)
- forchetta e piattino di plastica
- imbuto
- garza o carta da filtro (dimensioni 10x10 cm)
- siringa monouso da 5 ml senza ago
- stuzzicadenti o paletta del caffè
- sale fino da cucina
- detersivo liquido per piatti
- alcol denaturato
- colorante blu alimentare (opzionale)

Protocollo sperimentale:

Mezz'ora prima di iniziare l'esperienza, porre in freezer l'alcol denaturato.

Preparare al momento dell'uso la soluzione per lisare le cellule: in un contenitore, possibilmente graduato, introdurre un cucchiaino di sale fino da cucina (5 g circa), 10 ml di detersivo per stoviglie e 90 ml di acqua.

Estrazione di DNA da frutta/ortaggi/carne/pesce

- **DISGREGAZIONE dei tessuti vegetali o animali:**

Il primo passaggio essenziale per estrarre il DNA da campioni biologici animali o vegetali è la disagregazione dei tessuti, ovvero la rottura meccanica dei tessuti.

- **LISI delle cellule:**

Al tessuto schiacciato e sminuzzato va aggiunto un ugual volume di soluzione di lisi, mescolando delicatamente fino a ottenere una miscela omogenea. La presenza nella soluzione di lisi del detergente liquido provoca la rottura delle membrane cellulari e il rilascio del contenuto intracellulare e nucleare: quindi questo processo permette di liberare il DNA, e ciò rende la miscela piuttosto viscosa. La presenza del sale neutralizza le cariche negative del DNA (facilitandone quindi l'aggregazione) e ne allontana le molecole di acqua.

- **ELIMINAZIONE dei detriti cellulari per FILTRAZIONE:**

Per eliminare i detriti cellulari dalla miscela ottenuta, la si filtra su carta da filtro o su garza. Il filtrato va recuperato e eventualmente rifiltrato per procedere a una eliminazione più fine dei detriti cellulari e di eventuali pezzi di tessuto non disagregati.

- **PRECIPITAZIONE del DNA:**

Un piccolo volume del filtrato (3 ml) viene prelevato con la siringa e trasferito in un contenitore stretto e trasparente. Mantenendo inclinato il contenitore, si aggiungono lentamente 2 volumi (6 ml) di alcol freddo. Se si ha cura di non agitare il contenitore, le due fasi (acquosa e alcolica) non si miscelano, in quanto l'alcol ha una densità minore di quella dell'acqua.

- **VISUALIZZAZIONE del DNA:**

Le molecole di DNA, insolubili in alcol, precipitano formando un ammasso biancastro che si forma all'interfaccia delle due fasi e successivamente si sposta completamente nella fase alcolica.

- **RECUPERO del DNA:**

Le molecole di DNA precipitate possono essere recuperate con l'ausilio di uno stuzzicadenti



Estrazione di DNA da cellule della mucosa della bocca.

Per estrarre il DNA dalle cellule della mucosa della bocca, va preparata una soluzione di acqua e sale (3 g di sale fino da cucina, ovvero un cucchiaino da caffè, in 10 ml di acqua naturale) e utilizzarla per fare dei gargarismi per 1 minuto, ovviamente senza ingoiarla!

- La soluzione salina contenente ora saliva e cellule della mucosa boccale va recuperata in un contenitore e ad essa va aggiunta una goccia di detergente liquido per piatti.
- A questo punto è necessario mescolare delicatamente per circa 5 minuti cercando di evitare di produrre bolle.

- Prelevare con una siringa circa 2 ml e trasferirli in un piccolo contenitore pulito.
 - Aggiungere lentamente e delicatamente 2 volumi (4 ml) di alcol denaturato freddo inclinando il contenitore per non far mescolare la fase acquosa con quella alcolica.
 - Dopo qualche minuto sarà possibile osservare all'interfaccia acqua/alcol la formazione di una struttura biancastra e dall'aspetto filamentoso: il DNA. Si tratta naturalmente di migliaia di molecole di DNA raggruppate insieme: una singola molecola sarebbe infatti troppo piccola per essere visualizzata a occhio nudo, e per osservarla sarebbe necessario un microscopio elettronico.
 - Se l'estrazione è stata realizzata con cura, dopo qualche altro minuto le molecole di DNA, si struttureranno sempre più, risalendo completamente nella fase alcolica.



Note aggiuntive:

Effettuando gargarismi vigorosi con la soluzione salina preparata, il numero di cellule della mucosa boccale che si recupereranno sarà maggiore e il risultato dell'esperimento sarà più evidente. L'aggiunta di detersivo liquido alla soluzione salina permette di rompere le membrane cellulari e rilasciare il DNA in soluzione. Le varie sostanze presenti nelle cellule restano nella fase salina, mentre il DNA a contatto con l'alcol, precipita.

Inoltre, nel cavo orale sono presenti anche diversi microrganismi, quali batteri e funghi, che popolano la nostra bocca. Chiaramente, il DNA estratto non sarà quindi puro, ma si tratterà di una miscela di DNA del donatore e degli organismi suoi ospiti! Inoltre, il DNA estratto con questa semplice e rapida metodica risulterà anche parzialmente degradato.

Nei **laboratori di ricerca** le procedure per estrazione e isolamento del DNA fanno ovviamente particolare attenzione a prevenire la sua degradazione e a evitarne la contaminazione. Sono procedure che fanno uso di diverse sostanze, non di uso comune e talvolta anche pericolose, come ad esempio una miscela di fenolo e cloroformio (metodica di estrazione in fase liquida).

L'estrazione del DNA può essere realizzata anche mediante l'utilizzo di appositi kit commerciali che velocizzano la procedura e permettono di ottenere un DNA particolarmente puro e non degradato.