

# ESERCITAZIONE DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

## Protocollo per minipreparazione di DNA plasmidico

(GenElute HP Plasmid Miniprep Kit)

### Razionale

Questo metodo si basa sulla lisi delle cellule in condizioni alcaline con conseguente denaturazione del DNA, seguita da rapida rinaturazione. In questo modo il DNA batterico forma aggregati insolubili mentre il DNA plasmidico rimane in soluzione. Successivamente il DNA plasmidico viene purificato mediante assorbimento su membrana di silice in adeguate condizioni di forza ionica. Le membrane di silice legano selettivamente sia RNA che DNA a diverso peso molecolare. In condizioni di alta forza ionica la presenza di sali sottrae acqua alle molecole di DNA che in queste condizioni sperimentali viene "catturato" dalla membrana di silice, mentre i contaminanti passano senza legarsi. La particolare membrana che usiamo in questa purificazione permette di eluire, mediante l'uso di tamponi a concentrazione salina media, molecole quali RNA, proteine, carboidrati e piccoli metaboliti, mentre con un tampone a concentrazione salina più bassa, viene eluito solo il DNA plasmidico.

### Procedura

- Pellettare 3 ml di una crescita batterica O/N mediante centrifugazione a 12000g
- Risospendere (vortexare o spipettare) il pellet accuratamente con 200 µl di Resuspension Solution Buffer contenente RNase A (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNasi A).
- Aggiungere 200 µl di Lysis Buffer (Tampone di lisi alcalina: 200 mM NaOH, 1% SDS). Miscelare capovolgendo per 3-4 volte, non usare il vortex per evitare di frammentare il DNA cromosomale e incubare max 5 min a RT. Nota: questo passaggio provoca la denaturazione di DNA e proteine e la solubilizzazione delle membrane.
- Aggiungere 350 µl di Neutralization Buffer (Tampone di neutralizzazione: Potassio acetato, acido acetico, pH 4.8) Nota: questo passaggio consente la rinaturazione selettiva del solo DNA plasmidico. Invertire le provette 4-6 volte. Pellettare i detriti cellulari mediante centrifugazione a 12000g per 10 min. Il DNA plasmidico rimane in soluzione, mentre il sedimento, contenente pareti, complessi di DNA cromosomale e proteine denaturate viene scartato.
- Assemblare la genElute HP Miniprep binding Column in un tubo per micro centrifuga. Aggiungere 500µl di Column Preparation Solution e centrifugare a 12000g per 30 sec-1min allontanare il liquido

- Trasferire il lisato chiarificato alla colonna e centrifugare 30sec-1min a 12000g Eliminare il liquido che è filtrato attraverso la microcolonna (flowthrough)
- Aggiungere 500  $\mu$ l del Wash Solution1 alla colonna e centrifugare 30sec-1min a 12000g. Allontanare il flowthrough
- Aggiungere 750  $\mu$ l del Wash Solution 2 (al quale è stato aggiunto etanolo) alla colonna e centrifugare 30sec-1min a 12000g e allontanare il flowthrough
- Centrifugare a 12000g per 1 min e allontanare l'eccesso di etanolo
- Trasferire la colonna in un tubo nuovo ed eluire il DNA con 50  $\mu$ l di Elution buffer. Centrifugare a 12000 g per 1 min. Conservare il DNA in ghiaccio