

Colorazione del DNA nei lieviti

a cura di V. Soglio

Nei laboratori di ricerca opportuni composti fluorescenti sono comunemente impiegati per mettere in evidenza strutture o molecole all'interno della cellula. Essi consentono una marcatura specifica e, in quanto fluorescenti, emettono luce quando vengono colpiti da luce a una data lunghezza d'onda. In questo protocollo si descrive come colorare il DNA delle cellule di lievito utilizzando il DAPI o 4',6-diamidino-2-fenylindole, una molecola che si lega fortemente agli acidi nucleici dopo essere entrata per diffusione attraverso la parete e la membrana cellulari. Per realizzare questo protocollo è necessario disporre di un microscopio a fluorescenza.

Obiettivo

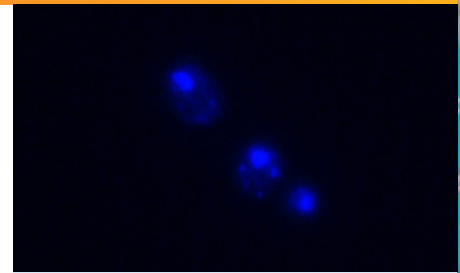
Evidenziare il DNA in cellule di lievito colorate con il DAPI.

Procedimento

1. Trasferire 500 μ l di acqua deionizzata in una provetta e stemperarvi le cellule di lievito raccolte toccando con uno stuzzicadente una colonia cresciuta su una piastra.
2. Centrifugare per 2 minuti a 13000 rpm.
3. Usando una micropipetta impostata su 100 μ l eliminare il surnatante. Fare attenzione a non rimuovere o toccare le cellule raccolte sul fondo della provetta.
4. Aggiungere 500 μ l di etanolo assoluto freddo e agitare picchiettando la provetta con le dita.
5. Trasferire 10 μ l della sospensione appena preparata in una nuova provetta contenente 80 μ l di acqua deionizzata.
6. Centrifugare per 2 minuti a 13000 rpm.
7. Usando una micropipetta impostata su 20 μ l eliminare il surnatante. Fare attenzione a non rimuovere o toccare le cellule raccolte sul fondo della provetta.
8. Risospendere le cellule nel volume di surnatante rimasto nella provetta.
9. Prelevare 6 μ l e trasferirli su un vetrino portaoggetto.
10. Aggiungere 2 μ l di DAPI 0,02 mg/ml e mescolare usando il puntale.
11. Coprire con il vetrino coprioggetto e osservare le cellule al microscopio a fluorescenza usando la luce ultravioletta: i nuclei appaiono come strutture tondeggianti colorate di blu (figura 1).

Osservazioni

- Il DAPI legato alla doppia elica del DNA viene eccitato dalla luce ultravioletta (il massimo assorbimento è alla lunghezza d'onda di 358 nm) ed emette luce blu (la massima emissione è a 461 nm).
- L'aggiunta di etanolo consente di fissare le cellule e aumentare la permeabilità della parete e della membrana al DAPI. Usando cellule vive si ottengono colorazioni meno intense.
- Data la specificità di legame DAPI-DNA, questa colorazione consente di evidenziare il nucleo della cellula come una struttura tondeggiante blu, ma



Tempo previsto

20 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Piastra con colonie di lievito
- ✓ Provette da 1,5 ml
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Etanolo assoluto freddo (conservato in freezer)
- ✓ DAPI 0,02 mg/ml (diluire 50 volte la soluzione madre 1 mg/ml)
- ✓ Vetrini porta e coprioggetto

Strumentazione

- ✓ Centrifuga da banco
- ✓ Micropipette e relativi puntali
- ✓ Microscopio ottico a fluorescenza



permette anche di marcare i mitocondri. Questi organelli sono dotati anch'essi di DNA e sono distinguibili ad alto ingrandimento (100x) come tanti puntini blu (figura 2, frecce).

- Il DAPI utilizzato per la realizzazione dell'esperimento è un prodotto commerciale che può essere acquistato in polvere da ditte come Sigma-Aldrich, Invitrogen e Roche Applied Science. Per preparare la soluzione madre 1 mg/ml è sufficiente sciogliere 1 mg di DAPI in 1 ml di acqua.

Le immagini riportate di seguito mostrano le stesse cellule di lievito osservate con luce bianca (a sinistra) e con luce ultravioletta (a destra).

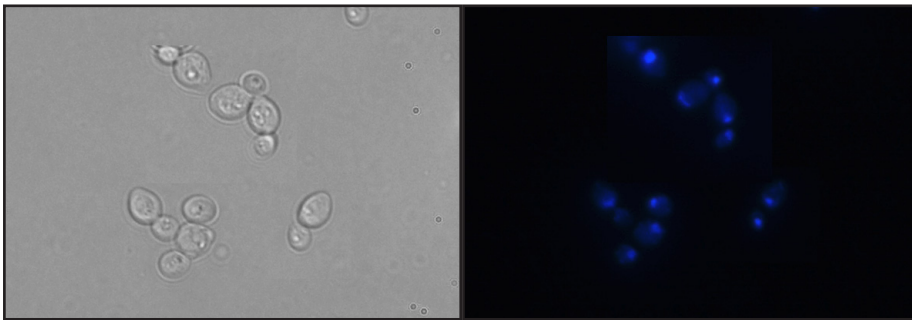


Figura 1 (63x)

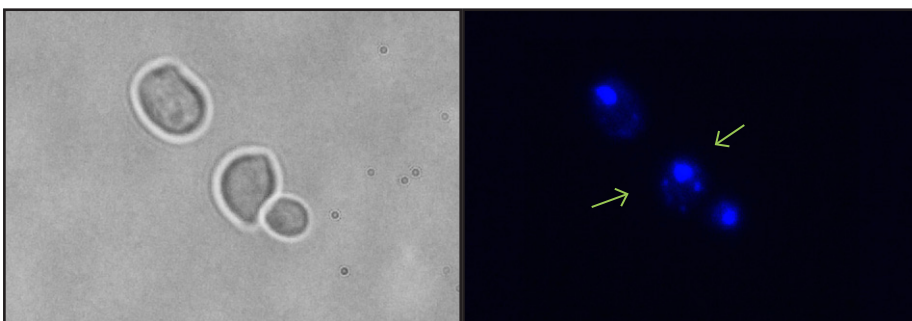


Figura 2 (100x)
Nell'immagine a destra si notano anche i mitocondri, indicati dalle frecce.

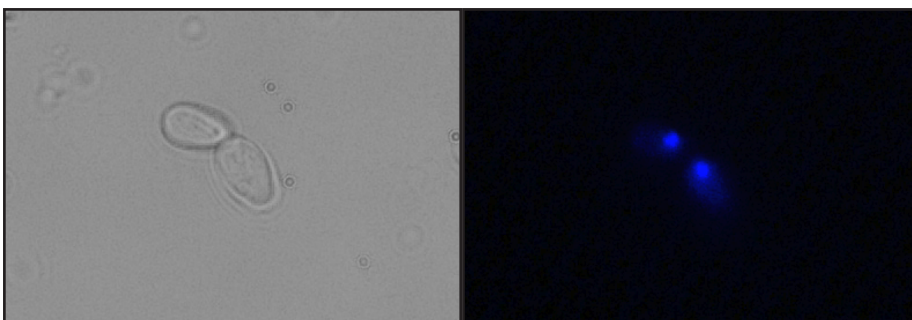


Figura 3 (100x)
Cellule in coniugazione.