

ESTRAZIONE DNA GENOMICO DA SANGUE CON KIT GENTRA PUREGENE

IL SANGUE DOVREBBE ESSERE TOLTO DAL FRIGO CIRCA 1 ORA PRIMA DI INIZIARE
L'ESTRAZIONE.

Lisi delle cellule e trattamento con RNasi

1. AGITARE IL SANGUE PER INVERSIONE ALCUNE VOLTE;
2. IN UNA FALCON DA 15 ml, DOPO AVERVI APPOSTO IL NUMERO DI LABORATORIO, AGGIUNGERE 1,5 ml DI SANGUE INTERO, CON L'UTILIZZO DI UNA PASTEUR USA E GETTA, E 4,5 ml DI RBC LYSIS SOLUTION. INVERTIRE LA FALCON PER ALCUNE VOLTE E INCUBARE PER 5 MINUTI A TEMPERATURA AMBIENTE. DURANTE L'INCUBAZIONE INVERTIRE ALMENO ALTRE DUE VOLTE;
3. CENTRIFUGARE A 2000 X g PER 5 MINUTI. ELIMINARE IL SUPERNATANTE LASCIANDO IL PELLETTA PRESENTE SUL FONDO ASSIEME A CIRCA 100 µl DI LIQUIDO RESIDUO;
4. AGGIUNGERE 1,5 ml DI CELL LYSIS SOLUTION (cui è stata preventivamente aggiunta l'RNasi) E PIPETTARE SU E GIU' PER ROMPERE LE CELLULE. CONTINUARE SINO ALLA COMPLETA DISSOLUZIONE DEL PELLETTA
5. INCUBARE I CAMPIONI A 37° C PER 15 MINUTI;

Precipitazione delle proteine

6. RIPORTARE IL CAMPIONE A TEMPERATURA AMBIENTE;
7. AGGIUNGERE 500 µl DI PROTEIN PRECIPITATION SOLUTION AL LISATO;
8. VORTEXARE ENERGETICAMENTE PER ALMENO 30 SECONDI PER MISCELARE IN MODO UNIFORME;
9. CENTRIFUGARE A 2000 x g PER 10 MINUTI. IL PRECIPITATO PROTEICO FORMERÀ UN PELLETTA DI COLORE MARRONE;

Precipitazione del DNA

10. PRELEVARE IL SUPERNATANTE LIMPIDO, CONTENENTE IL DNA, E PORLO IN UNA NUOVA FALCON DA 15 ml CONTENENTE 1,5 ml DI ISOPROPANOLO 100%;
11. MISCELARE IL CAMPIONE DELICATAMENTE PER INVERSIONE CIRCA 50 VOLTE, SINO A CHE IL DNA FORMERA' UN AGGREGATO VISIBILE;
12. CENTRIFUGARE A 2000 x g PER 3 MINUTI. IL DNA SARA' VISIBILE COME UN PELLETTA BIANCO SUL FONDO DELLA FALCON;
13. ELIMINARE IL SUPERNATANTE E METTERE LE FALCON CAPOVOLTE SU CARTA ASSORBENTE. AGGIUNGERE 1,5 ml DI ETANOLO 70% ED INVERTIRE LA FALCON DIVERSE VOLTE PER LAVARE IL PELLETTA DI DNA;
14. CENTRIFUGARE A 2000 x g PER 1 MINUTO. ELIMINARE DELICATAMENTE L'ETANOLO;
15. LASCIARE LE FALCON CAPOVOLTE SU CARTA ASSORBENTE PER CIRCA 8 MINUTI, SPOSTANDOLE RIPETUTAMENTE;

Idratazione del DNA

16. AGGIUNGERE 500 µl DI DNA HYDRATION SOLUTION. REIDRATARE INCUBANDO I CAMPIONI PER UN PAIO DI GIORNI A TEMPERATURA AMBIENTE.

Quantificazione allo spettrofotometro: 10 µl di DNA in 90 di acqua

Corsa elettroforetica: 1 µl di DNA + 9 µl di acqua e 2 µl di colorante

LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO (DNA)

N.B.: ACCERTARSI CHE LO SPETTROFOTOMETRO SIA ACCESO DA ALMENO 30 MINUTI PRIMA DI FARE LA LETTURA

1. PREPARARE TANTE EPPENDORF DA 1,5 ml QUANTI SONO I CAMPIONI DA LEGGERE;
2. PRELEVARE DA CIASCUN CAMPIONE 10 μ l DI DNA ED AGGIUNGERVI 90 μ l DI ACQUA (DILUIZIONE 10);
3. FARE LA LETTURA DEL BIANCO ALLO SPETTROFOTOMETRO, IMPIEGANDO 100 μ l DI ACQUA (LA STESSA UTILIZZATA PER LA DILUIZIONE);
4. EFFETTUARE LE LETTURE DEI VARI CAMPIONI, A 260 nm E A 280 nm;
5. CALCOLARE LE CONCENTRAZIONI EFFETTIVE UTILIZZANDO LA SEGUENTE FORMULA:

$(\text{LETTURA } 260 * \text{COEFF. DI DIL. (10)} * \text{COEFF. DI ESTINZIONE MOLARE (50)})/1000$

LA CONCENTRAZIONE OTTENUTA ESPRESSA IN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DOVRA' ESSERE MOLTIPLICATA PER I μl DI DNA DI CUI SI DISPONE.

PREPARAZIONE GEL DI AGAROSIO, PREPARAZIONE CAMPIONI E CORSA ELETTROFORETICA

- 1) PREDISPORRE IL SUPPORTO PER IL GEL E IL PETTINE PER LA FORMAZIONE DEI POZZETTI;
- 2) PREPARARE UN GEL DI AGAROSIO ALL'1%. IL GEL PICCOLO SI DILUISCE IN 25 ml MENTRE QUELLO GRANDE IN 50 ml;
- 3) PESARE L'AGAROSIO E METTERLO IN UNA BEUTA;
- 4) AGGIUNGERE IL TAMPONE PER SCIOLIERE L'AGAROSIO. FARE ATTENZIONE AD UTILIZZARE LO STESSO TAMPONE PRESENTE NELLA CAMERA ELETTROFORETICA (TBE O TAE 0,5 X), PRELEVANDOLO DALLA BOTTIGLIA CONTENENTE QUELLO SENZA EtBr;
- 5) SCIOLIERE IL TUTTO IN FORNO A MICROONDE PORTANDO AD EBOLLIZIONE E AGITANDO RIPETUTAMENTE SINO A CHE IL LIQUIDO NON DIVIENE TRASPARENTE;
- 6) LASCIARE DEGASSARE E RAFFREDDARE SOTTO IL GETTO DELL'ACQUA FREDDA;
- 7) AGGIUNGERE L'EtBr (1,5 ul PER I GEL DA 50 ml e 1 ul PER QUELLI DA 25 ml);
- 8) COLARE IL GEL, IN MODO CONTINUO E DECISO EVITANDO DI CREARE DELLE BOLLE;
- 9) LASCIARE RAFFREDDARE SINO A CHE IL GEL POLIMERIZZA. RIMUOVERE DELICATAMENTE IL PETTINE E IMMERGERE IL GEL NELLA CAMERA ELETTROFORETICA, ACCERTANDOSI CHE RIMANGA COMPLETAMENTE COPERTO DAL TAMPONE DI CORSA;
- 10) CARICARE I CAMPIONI PREPARATI NEL SEGUENTE MODO: 1 ul DI DNA, 9 ul DI ACQUA E 2 ul DI COLORANTE DI CARICAMENTO. AGGIUNGERE EVENTUALMENTE IL MARKER DI PESO MOLECOLARE NEL PRIMO POZZETTO.
- 11) AVVIARE LA CORSA ELETTROFORETICA ACCERTANDOSI CHE LA POLARITA' SIA DA - A + E CON UN VOLTAGGIO PARI A 50;
- 12) DOPO CIRCA 20-30 MINUTI IL GEL E' PRONTO PER LA VISIONE ALL'ULTRAVIOLETTO.