

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. RIPIANTARE 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 ISOPROPRANOLO 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