

ESTRAZIONE DNA DA CELLULE DI PROTISTI

Prima di cominciare:

- Accendere l'incubatore e impostare la temperatura a 56 °C.
- Preparare la soluzione "Buffer AL + Carrier": 100 µl Buffer AL + 1 µl Carrier (conservare in ghiaccio). Calcolare il volume necessario della soluzione "Buffer AL + Carrier" in base al numero di campioni da processare (100 µl per ogni campione). Allo scopo di evitare errori di "pipettamento", nel calcolare il volume necessario della suddetta soluzione considerare un campione in più.

Procedura:

- Prelevare con la pipetta un numero di cellule di protisti (~ 50-100) e trasferirle in una provetta sterile (volume max: ~ 30 µl).
- Aggiungere il "Buffer ATL" fino ad arrivare ad un volume di 100 µl e mescolare i contenuti vortexando per 10 sec.
- Aggiungere 10 µl di "Proteinase K".
- Aggiungere 100 µl di soluzione "Buffer AL + Carrier" e mescolare i contenuti vortexando per 15 sec.
- Incubare a 56 °C per 10 min.
- Centrifugare brevemente la provetta in modo da rimuovere le eventuali gocce dalla superficie interna del tappo.
- Aggiungere 100 µl di etanolo assoluto, mescolare i contenuti vortexando per 15 sec. e incubare a temperatura ambiente per 3 min.

- Centrifugare brevemente la provetta in modo da rimuovere le eventuali gocce dalla superficie interna del tappo.
- Trasferire il contenuto della provetta (~ 310 μ l) in una colonnina contenente una membrana di gel di silice e provvista di provetta di raccolta (evitando di toccare le pareti interne della colonnina), chiudere il tappo e centrifugare a 6.000 *g* per 1 min.
- Trasferire la colonnina in una nuova provetta di raccolta (buttando la provetta di raccolta contenente il liquido passato attraverso la colonnina), aggiungere 500 μ l di “Buffer AW1” (evitando di toccare le pareti interne della colonnina), chiudere il tappo e centrifugare a 6.000 *g* per 1 min.
- Trasferire la colonnina in una nuova provetta di raccolta (buttando la provetta di raccolta contenente il liquido passato attraverso la colonnina), aggiungere 500 μ l di “Buffer AW2” (evitando di toccare le pareti interne della colonnina), chiudere il tappo e centrifugare a 6.000 *g* per 1 min.
- Trasferire la colonnina in una nuova provetta di raccolta (buttando la provetta di raccolta contenente il liquido passato attraverso la colonnina) e centrifugare alla velocità massima per 3 min., allo scopo di asciugare completamente la membrana della colonnina.
- Trasferire la colonnina in una provetta sterile (buttando la provetta di raccolta contenente il liquido passato attraverso la colonnina), aggiungere 50 μ l di H₂O al centro della membrana della colonnina e incubare a temperatura ambiente per 5 min.
- Centrifugare alla velocità massima per 1 min., buttare la colonnina e conservare il DNA così ottenuto a – 20 °C.

Principi del metodo:

Il protocollo è basato sulle proprietà di legame selettivo di una particolare membrana di gel di silice contenuta in una colonnina.

Le cellule vengono lisate in condizioni altamente denaturanti a temperatura elevata (56 °C), in presenza di "Proteinase K" e di "Buffer ATL".

Il "Buffer AL" è aggiunto al lisato allo scopo di permettere il legame ottimale del DNA alla membrana.

Il "Carrier" viene aggiunto al "Buffer AL" per aumentare l'efficacia di legame del DNA alla membrana, nel caso di estrazione di DNA da piccole quantità di campione (come, ad esempio, nel caso di DNA da estrarre da poche cellule).

Il lisato viene trasferito alla colonnina ed il DNA viene assorbito sulla membrana di gel di silice in essa contenuta quando il lisato viene fatto passare attraverso di essa per centrifugazione.

Le condizioni di concentrazione salina e di pH assicurano che le proteine e gli altri contaminanti, che possono inibire la PCR e le successive reazioni enzimatiche, non siano trattiene sulla membrana, ma vengano efficientemente portati via dai "Buffer AW1" e "AW2".