





PRELIEVO DELLA MUCOSA BUCCALE



ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO TOTALE

Nella provetta contenente il cotone si aggiungono 300 μ l di TAMPONE DI ESTRAZIONE (necessario per la rottura delle membrane cellulari) contenente:

- 100 mM Tris/HCl pH 8,00, un tampone che stabilizza il PH della soluzione
- 100 mM NaCl, che stabilizza la salinità della soluzione e attiva la proteinasi K
- 100 mM EDTA pH 8,00, un chelante che elimina i cationi bivalenti, substrato di azione per eso e endonucleasi
- 2% SDS, un detergente anionico (sodio dodecil solfato) che solubilizza i lipidi delle membrane

Si aggiungono 7,5 μ l di proteinasi K (20 mg/ml), un enzima proteolitico (una peptidasi), usato per la lisi delle proteine, che elimina anche le eso e endonucleasi e gli istoni, rendendo disponibile il DNA.



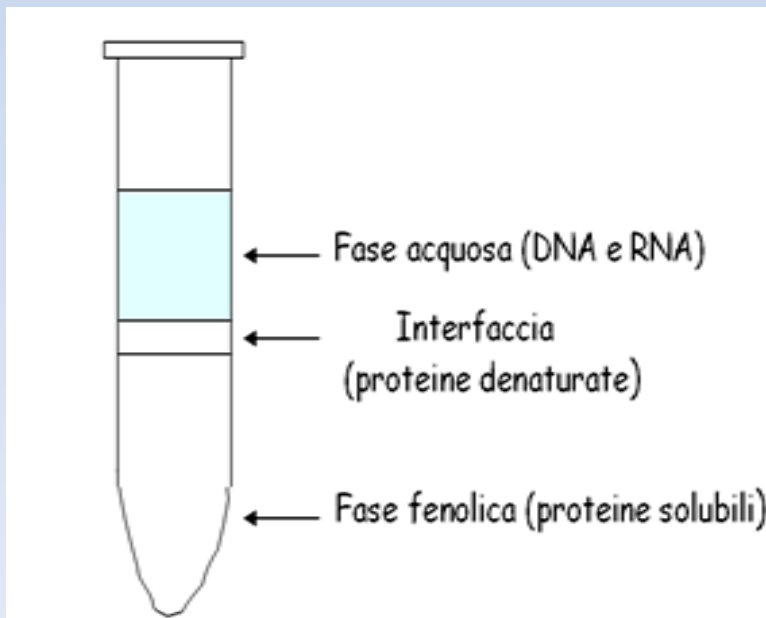
Successivamente le provette vengono sigillate con il parafilm e incubate a 56°C (temperatura di attivazione della proteinasi K) per tutta la notte.

Al termine dell'incubazione si elimina il cotone e si aggiungono 300 μ l di fenolo/cloroformio/alcool isoammilico (25:24:1). Questa tecnica è utilizzata per separare la fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, dalle altre componenti cellulari.

Il fenolo è un solvente dei lipidi e un denaturante delle proteine, mentre il cloroformio, un composto volatile costituito da una parte idrofoba e una idrofilica, solubilizza ed elimina il fenolo dalla soluzione impedendogli di legarsi alla componente idrofoba del DNA.

Si agitare fino a ottenere un'emulsione lattacea e si centrifuga a 13000 rpm per 5 minuti.

Al termine della centrifugazione si potrà osservare nella parte superiore della provetta la fase acquosa, in cui sono presenti il DNA e le altri componenti idrofiliche, e nella parte inferiore le componenti idrofobiche solubili nella fase fenolica; le proteine denaturate dal fenolo formano invece uno strato bianco nell'interfaccia tra la fase fenolica inferiore (fase organica) e la fase acquosa superiore.

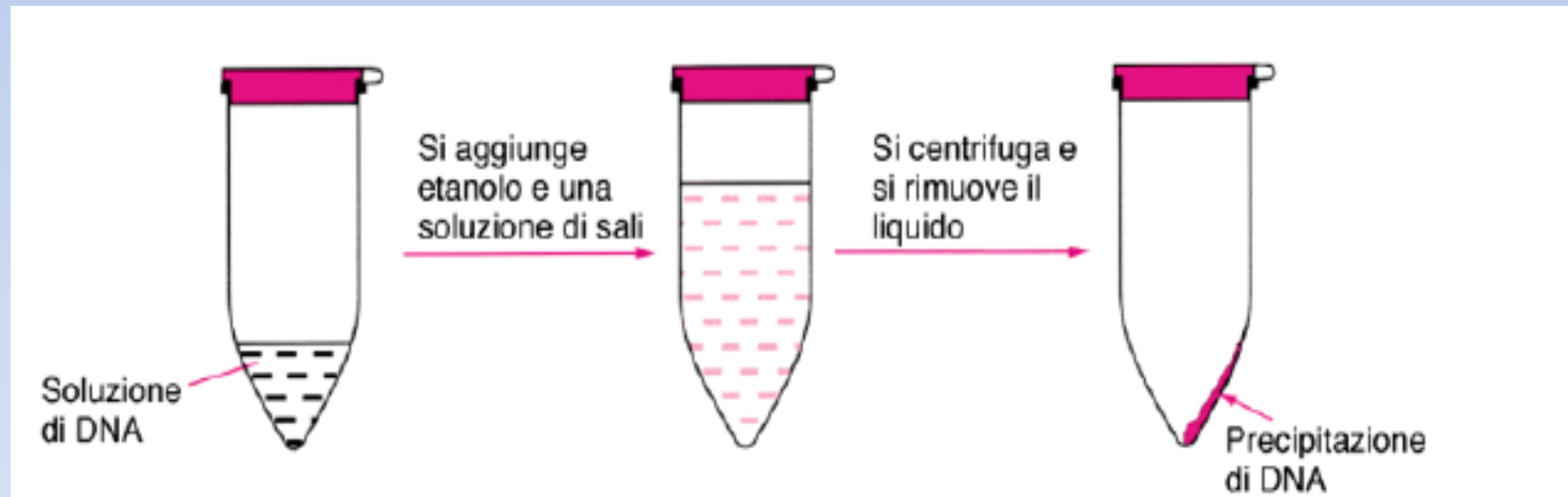


Si trasferisce la fase acquosa, circa 500 μl , in una nuova provetta .

Si aggiungono 50 μl (un decimo di volume) di ammonio acetato 5 M e 1000 μl (il doppio del volume) di etanolo assoluto freddo. Si mescola e si lascia a -20°C per 20 minuti.

Il gruppo ammonio, carico positivamente, si lega al DNA carico negativamente facilitandone la precipitazione, mentre l'etanolo permette la precipitazione del DNA in quanto rompe i legami idrogeno che permettono al DNA di restare in soluzione

Centrifugare a 14000 rpm per 15 minuti avendo cura di posizionare tutte le provette nella stessa maniera. Al termine della centrifugazione il pellet sarà precipitato sul fondo della provetta e si può quindi aspirare la fase liquida.



Si esegue un secondo lavaggio in etanolo aggiungendo 200 μ l di etanolo 80 %. Dopo averle agitate, le provette vengono poste di nuovo in centrifuga, orientandole tutte nella stessa direzione, e si centrifuga a 14000 rpm per 15 minuti. Dopo aver centrifugato si elimina la fase liquida senza toccare il pellet che ha sedimentato sul fondo della provetta

Si elimina ogni traccia di etanolo mediante evaporazione. Infine, si risospendero il pellet in 50 μ l di acqua bidistillata sterile.

