

Estrazione di **DNA** dalle cellule della **mucosa boccale**

Obiettivo Purificare il DNA genomico umano a partire da campioni di cellule della mucosa boccale.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Acqua deionizzata sterile
- Puntali sterili
- Provette sterili da 1.5 ml
- Becher da 50 ml sterili
- Becher da 250 ml sterili
- NaCl 0.9% sterile
- Chelex 100 5%
- Pennarelli indelebili



Strumenti

- Micropipette
- Bagno termostato a 100°C
- Centrifuga da banco



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

40 minuti



Procedimento

- 1.** Predisporre il materiale necessario per effettuare la purificazione del DNA e marcare il materiale con il codice identificativo dei campioni (ad es. iniziali nome e cognome della persona che fornirà il materiale biologico di partenza). In particolare contrassegnare:
 - tre serie di provette sterili da 1.5 ml (ogni serie è formata da tante provette quanti campioni di DNA genomico da purificare);
 - una serie di becher da 50 ml sterili;
 - una serie di becher da 250 ml sterili.
- 2.** Trasferire 500 μ l di soluzione Chelex 100 al 5% nella prima serie di provette da 1.5 ml. Utilizzare una micropipetta P1000 così che le beads della resina non ostruiscano il puntale (in alternativa utilizzare una P200 i cui puntali sono stati tagliati in punta).
- 3.** Trasferire 10 ml di soluzione di NaCl 0.9% sterile nella serie di becher da 50 ml sterili.
- 4.** Raccogliere le cellule effettuando un energico gargarismo per 30 secondi con i 10 ml di NaCl contenuti nel becher da 50 ml sterile.
- 5.** Espellere la soluzione salina, ricca di cellule della mucosa boccale, dentro il becher da 250 ml sterile, precedentemente marcato con il codice identificativo. Mescolare.
- 6.** Trasferire 750 μ l di soluzione salina con sospensione di cellule dal becher nella seconda serie di provette da 1.5 ml sterili, rispettando il codice identificativo. Ripetere l'operazione, così da avere come volume finale nella provetta 1.5 ml.
- 7.** Centrifugare i campioni per 2 minuti a 13.000 rpm.
- 8.** Verificare che il pellet di cellule sia ben visibile ad occhio nudo (dovrebbe essere grande come la punta di un fiammifero). Se il pellet è poco visibile, eliminare il surnatante e ripetere i passaggi 6 e 7 per aumentare il materiale biologico di partenza.
- 9.** Eliminare il surnatante, lasciando circa 100 μ l di soluzione salina a coprire il pellet di cellule. Chiudere saldamente il coperchio della provetta.

- 10.** Mescolare per inversione finché tutto il pellet di cellule sia completamente risospeso nella soluzione salina.
- 11.** Trasferire la sospensione cellulare dalla seconda alla prima serie di provette (contenente la soluzione Chelex 100 al 5%), avendo cura a cambiare il puntale ad ogni trasferimento per non contaminare i campioni. Mescolare per inversione. Non pipettare per risospingere le due soluzioni, dal momento che le beads presenti nel Chelex 100 potrebbero intasare il puntale della micropipetta.
- 12.** Incubare i campioni per 10 minuti a 100°C. Passati 5 minuti, togliere i campioni dal bagno termostato e agitarli con la punta delle dita per risospingerli. Porli nuovamente a 100°C per altri 5 minuti.
- 13.** Mescolare per inversione e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm. Alla fine della centrifugazione le beads di Chelex 100 saranno sul fondo, mentre il DNA genomico nel surnatante.
- 14.** Trasferire 50 µl di surnatante in una provetta dal 1.5 ml pulita, precedentemente marcata con il codice identificativo corrispondente. Prestare attenzione a non trasferire le beads di Chelex 100, che potrebbero interferire con analisi successive del campione di DNA (ad es. PCR).
- 15.** Nel caso ci fosse qualche bead, procedere nuovamente con i punti 13 e 14.
- 16.** Conservare il DNA genomico purificato a 4°C per successive analisi.

Note

- Questo protocollo consente di ottenere in modo rapido DNA genomico di alta qualità utilizzabile per applicazioni successive come digestioni enzimatiche e PCR.
- Il DNA genomico può essere valutato qualitativamente tramite caricamento su gel d'agarosio e quantitativamente tramite lettura di un'aliquota allo spettrofotometro, che consente di valutarne la concentrazione e la purezza.
- Chelex 100 è una resina composta da copolimeri di stirene e di divinil-benzene, che agisce come agente chelante. Durante l'incubazione ad alta temperatura, quando le cellule vengono lisate, le beads della resina legano gli ioni magnesio Mg^{2+} che generalmente fungono da cofattori enzimatici per le nucleasi che degradano il DNA. Le beads della resina al momento della lisi delle cellule, che avviene ad alta temperatura, catturano gli ioni magnesio, limitando la degradazione del DNA. Il passaggio successivo di centrifugazione consente di separare le beads e la maggior parte dei detriti cellulari nel pellet e di avere disciolto nel surnatante il DNA.
- La soluzione al 5% di Chelex 100 si prepara aggiungendo 5 g di resina a 100 ml di acqua distillata sterile. Mescolare e conservare la soluzione a 4°C (buttarla quando si notano segni di contaminazione o crescita di funghi/batteri). Per questa attività sperimentale è stata utilizzata la resina Chelex 100 di BioRad, numero di catalogo: 143-2832.
- Essendo una sospensione di beads e liquidi, quando si pipettano le soluzioni di Chelex 100, ricordarsi che le beads devono essere distribuite uniformemente nella soluzione: questo si ottiene, mescolando la soluzione prima di ogni prelievo.
- Durante l'incubazione ad alta temperatura, i tappi delle provette potrebbero aprirsi a causa della pressione interna. Prestare attenzione.