

Passaggi di purificazione	Note
4. Per 500 µL di campione, aggiungere 20 µL (1/25° di volume) di PT-L2P alla provetta per microcentrifuga e mescolare vortexando per qualche secondo.	<ul style="list-style-type: none"> • Il campione diventerà torbido a causa della precipitazione di impurità e inibitori.
5. Incubare in ghiaccio per 10 minuti.	<ul style="list-style-type: none"> • Si può effettuare anche un'incubazione a temperatura ambiente, ma sarà un po' meno efficace nel rimuovere le impurità.
6. Centrifugare a temperatura ambiente per 5 minuti a 15.000 giri/min.	<ul style="list-style-type: none"> • Un periodo di centrifugazione più lungo (fino a 15 minuti) potrebbe essere utile a ridurre la torbidità (elevata A₃₂₀) della soluzione finale di DNA.
7. Utilizzando la punta di una pipetta, trasferire delicatamente il surnatante limpido in una provetta per microcentrifuga pulita. Scartare il pellet contenente impurità.	<ul style="list-style-type: none"> • Il pellet contiene impurità torbide. • Se urtata o agitata accidentalmente, la provetta deve essere nuovamente centrifugata.
8. A 500 µL di supernatante aggiungere 600 µL di etanolo dal 95% al 100% a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente per inversione 10 volte.	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la miscelazione con etanolo, il DNA precipiterà. In base alla quantità di DNA presente nel campione, esso potrà apparire come grumo di fibre di DNA o come precipitato fine. • Anche se non dovesse essere visibile alcun grumo, il DNA sarà recuperato seguendo attentamente i passaggi successivi.
9. Lasciare il campione in verticale a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire al DNA di precipitare completamente.	<ul style="list-style-type: none"> • L'incubazione a -20°C non è consigliata in quanto, oltre al DNA, potrebbe fare precipitare anche le impurità.
10. Posizionare la provetta nella microcentrifuga con un determinato orientamento. Centrifugare a temperatura ambiente per 2 minuti a 15.000 giri/min.	<ul style="list-style-type: none"> • Ad esempio, inserire ogni provetta nella microcentrifuga con la cerniera del cappuccio rivolta in direzione opposta rispetto al centro del rotore. Dopo la centrifugazione, la posizione del pellet è individuabile (anche se troppo piccolo per essere facilmente visibile), sarà in cima alla provetta, sotto alla cerniera.
11. Rimuovere delicatamente il supernatante con la punta di una pipetta e scartarlo. Fare attenzione a non agitare il pellet di DNA.	<ul style="list-style-type: none"> • Questo pellet contiene DNA. La perdita del pellet comporta la perdita del DNA. • Ruotando la provetta in modo tale che il pellet sia sulla parete superiore, sarà possibile muovere senza problemi la punta di una pipetta lungo la parete inferiore e rimuovere tutto il supernatante. • Il supernatante può contenere delle impurità e deve essere rimosso il più possibile. • Un'eccessiva essiccazione del pellet può rendere più difficile la dissoluzione del DNA.

Passaggi di purificazione	Note
12. Lavaggio con etanolo: facendo attenzione, aggiungere 250 µL di etanolo 70%. Lasciare in verticale a temperatura ambiente per 1 minuto. Rimuovere completamente l'etanolo senza agitare il pellet.	<ul style="list-style-type: none"> • È importante rimuovere tutto l'etanolo dal campione. Un eventuale residuo di etanolo può influire sull'efficacia dell'analisi. • Fare attenzione a non agitare il pellet di DNA. • Il pellet di DNA potrebbe essere di piccole dimensioni. • Se il pellet si dovesse staccare, centrifugare il campione per 5 minuti a 15.000 giri/min. • Dopo aver rimosso l'etanolo 70% la provetta può essere centrifugata a impulsi per consentire la rimozione dell'etanolo residuo.
13. Aggiungere 100 µL di soluzione TE (v. pagina 1) per dissolvere il pellet di DNA. Vortexare per almeno 5 secondi.	<ul style="list-style-type: none"> • Se si desidera una concentrazione più elevata di DNA, è opportuno utilizzare 50 µL di TE. • N.B.: grandi quantitativi di DNA a elevato peso molecolare possono richiedere molto tempo per idratarsi (dissolversi) completamente. • Un'idratazione incompleta del DNA è causa di inesattezze nelle stime della concentrazione del DNA e di errori nelle applicazioni downstream come la PCR.
14. Per assicurare la completa idratazione del DNA (pellet e striscio), incubare a temperatura ambiente durante la notte, quindi vorticare oppure incubare a 50°C per 1 ora vorticando di tanto in tanto.	<ul style="list-style-type: none"> • Un'idratazione incompleta del DNA è causa di inesattezze nelle stime della concentrazione del DNA e di errori nelle applicazioni downstream come la PCR.
15. Opzioni per la conservazione del DNA completamente reidratato: a) Per lunghi periodi, si raccomanda la conservazione in TE, in aliquote a -20°C, oppure b) in TE a 4°C per periodi fino a 2 mesi.	<ul style="list-style-type: none"> • Il congelamento del DNA purificato in TE fa precipitare il DNA. Nello scongelamento del campione di DNA purificato congelato, occorre prestare la massima attenzione all'idratazione, come spiegato al passaggio 14.

Quantificazione del DNA

Con metodo a fluorescenza

Le analisi che usano coloranti fluorescenti sono più specifiche rispetto all'assorbanza a 260 nm per misurare la quantità di DNA a doppio filamento (dsDNA) in un campione di DNA. Raccomandiamo l'uso di coloranti fluorescenti come PicoGreen® o SYBR® Green I per quantificare il dsDNA poiché si rileva una minore interferenza da parte dell'RNA contaminante. Un protocollo poco costoso che utilizza il SYBR Green I viene descritto in PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. In alternativa, si possono usare anche i kit disponibili in commercio, come il Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (cat. n. Q-33130) della Invitrogen. Per entrambi i protocolli raccomandiamo che il DNA purificato venga diluito 1:50 con soluzione TE e che vengano utilizzati 5 µL nell'analisi di quantificazione.

Con metodo ad assorbanza

Se si sceglie di quantificare il DNA mediante assorbanza, raccomandiamo il trattamento preliminare del campione purificato con RNasi per digerire l'RNA contaminante, quindi la rimozione dei frammenti di RNA mediante precipitazione di etanolo del DNA. Una descrizione del protocollo dettagliato si trova in PD-PR-040,

*RNA removal by double-RNase digestion*². Si prega di notare che il DNA ottenuto da un campione orale in genere contiene una quantità sensibilmente maggiore di RNA rispetto ai campioni ematici. Accertarsi che il DNA precipitato in alcol si sia dissolto completamente prima di effettuare la lettura dell'assorbanza.

Fattore di conversione: un'assorbanza di 1,0 a 260 nm corrisponde a una concentrazione di 50 ng/μL (50 μg/mL) per il dsDNA puro.

Assicurarsi che i valori di assorbanza siano compresi nel range lineare dello spettrofotometro. Ridiluire e rimisurare i campioni che non rientrano nel range lineare. Per maggiori informazioni si prega di consultare la documentazione relativa allo strumento.

Metodo:

1. Diluire un'aliquota di 10 μL di DNA trattato con RNasi purificato con 90 μL di TE (diluizione 1/10). Mescolare pipettando delicatamente su e giù. Aspettare che si dissolvano eventuali bolle.
2. Utilizzare la TE nella cella di riferimento (vuota).
3. Misurare l'assorbanza a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcolare i valori corretti di A_{280} e A_{260} sottraendo l'assorbanza a 320 nm (A_{320}) dai valori di A_{280} e A_{260} .
5. Concentrazione di DNA in ng/μL = A_{260} corretto \times 10 (fattore di diluizione) \times 50 (fattore di conversione).
6. Rapporto A_{260}/A_{280} : dividere l' A_{260} corretto per l' A_{280} corretto.

Esempio

1. Poniamo i seguenti valori misurati: $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ e $A_{260} = 0,295$
2. La concentrazione di DNA nel campione non diluito sarà:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fattore di diluizione] \times 50 [fattore di conversione]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ oppure $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. Il rapporto corretto A_{260}/A_{280} sarà:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Bibliografia

- 1 DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Sostituito da DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

Il servizio di assistenza tecnica è disponibile dal lunedì al venerdì (dalle 9.00 alle 17.00 EST):

- numero verde (Nord America): 1.866.813.6354, selezionare 6
- tutti gli altri paesi: 613.723.5757, selezionare 6
- Email: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA e ORAcollect®-DNA non sono in vendita negli Stati Uniti d'America.

Oragene®-DISCOVER è destinato solo a scopi di ricerca, non è da utilizzare in procedure diagnostiche.

Alcuni prodotti DNA Genotek potrebbero non essere disponibili in tutte le aree geografiche.

*Oragene, preplT e ORAcollect sono marchi registrati di DNA Genotek Inc. Ogni altro marchio o nome qui menzionato appartiene al rispettivo proprietario.

Tutti i protocolli, white paper e documenti applicativi di DNA Genotek sono reperibili nella sezione Support del nostro sito Internet www.dnagenotek.com

Guida di riferimento rapido:

Protocollo di laboratorio per la purificazione manuale del DNA a partire da 0,5 mL di campione

Passaggi di purificazione
1. Mescolare il campione nel kit DNA Genotek mediante inversione e agitare delicatamente per qualche secondo.
2. Incubare il campione a 50°C in un incubatore ad acqua per almeno 1 ora o in un incubatore ad aria per almeno 2 ore.
3. Trasferire 500 µL del campione in una provetta per microcentrifuga.
4. Aggiungere 20 µL di volume di PT-L2P e mescolare vorticando per qualche secondo.
5. Incubare su ghiaccio per 10 minuti.
6. Centrifugare a temperatura ambiente per 5 minuti a 15.000 giri/min.
7. Utilizzando una pipetta, trasferire delicatamente la maggior parte del supernatante limpido in una provetta per microcentrifuga pulita. Scartare il pellet.
8. Aggiungere al supernatante limpido 600 µL di etanolo dal 95% al 100% a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente per inversione 10 volte.
9. Lasciare il campione in verticale a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire al DNA di precipitare completamente.
10. Posizionare la provetta nella microcentrifuga con un determinato orientamento. Centrifugare a temperatura ambiente per 2 minuti a 15.000 giri/min.
11. Rimuovere delicatamente il supernatante con una pipetta e scartarlo. Fare attenzione a non agitare il pellet di DNA.
12. Aggiungere 250 µL di etanolo 70% e lasciare in posizione verticale a temperatura ambiente per 1 minuto. Rimuovere completamente l'etanolo senza agitare il pellet.
13. Aggiungere 100 µL di soluzione TE e vorticare il campione per almeno 5 secondi.
14. Incubare per una notte a temperatura ambiente oppure a 50°C per 1 ora vorticando di tanto in tanto.
15. Conservazione: per lunghi periodi di conservazione in aliquote a -20°C (raccomandato), oppure a 4°C per periodi fino a 2 mesi.