

PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA TESSUTO VEGETALE

Modificato da Doyle & Doyle (1987) Focus 12: 13-15.

Buffer di estrazione:

NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
Tris-HCl	100 mM
pH 8	
CTAB (Esadeciltrimetilammonio bromuro)	2% (W/v)

Preparazione del Buffer di estrazione:

Si prepara in una provetta sterile da 50 ml
1 g CTAB in circa 20 ml H₂O dist., si agita per facilitare la sua dissoluzione

14 ml NaCl 5 M

2 ml EDTA 0,5 M pH 8 che sequestra i metalli (es. Mg) che catalizzano per reazioni enzimatiche indesiderate (ricordiamo che una volta che il tessuto è stato distrutto nel mortaio, enzimi proteolitici come DNAsi, nucleasi si liberano in soluzione e potrebbero danneggiare il DNA che si vuole studiare).

5 ml di Tris-HCl 1 M pH 8 è una base compatibile con proteine ed acidi nucleici

Altri reagenti:

Na-dietilditiocarbammato (una punta di spatola)

Polvere di Quarzo (una punta di spatola)

Cloroformio-Alcol isoamilico (24:1 v/v)

Isopropanolo (alcol isopropilico)

Etanolo 70% (v/v)

Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)

Etanolo assoluto

NaCl saturo

RNasi A 10 mg/ml

Il Buffer di estrazione viene preparato il giorno precedente all'estrazione.

Prima di iniziare preparare Eppendorf sterili da 2 ml, mortai con Na-dietilditiocarbammato e quarzo, materiale vegetale, ed accendere bagnomaria a 60°C.

Il protocollo prevede 5 passaggi e consente di isolare DNA genomico (DNA nucleare, cloroplastico e mitocondriale).

1 - Omogenizzazione del tessuto vegetale

Scegliere le foglie più piccole, se possibile, poiché hanno un rapporto massa di DNA/massa di tessuto più favorevole. Il tessuto (foglie tenere) viene posto nel mortaio insieme ad una piccola quantità di polvere di quarzo, che facilita la triturazione meccanica del materiale, e un antiossidante che nel caso specifico è Sodio-dietilditiocarbammato. Si aggiungono 700 µl di buffer di estrazione per 2-300 mg di tessuto vegetale e si pesta il materiale fino ad ottenere un omogeneizzato liquido abbastanza denso.

Recuperare l'omogenato e trasferirlo in Eppendorf da 2 ml, incubare a bagnomaria a 60°C per 20 minuti, agitando la provetta delicatamente ogni tanto. Questa operazione favorisce la distruzione delle membrane cellulari da parte del CTAB che è un detergente.

2- Estrazione con solvente organico

Sotto cappa, aggiungere al campione 1 volume di Cloroformio-Alcol isoamilico (24:1 v/v), agitando fino ad ottenere un'unica fase. Il solvente organico elimina gran parte delle proteine e dei pigmenti (tra cui la clorofilla). Centrifugare a 10000 rpm per 10' a 4° C. Si ottiene così una separazione degli elementi contenuti nel campione. Il surnatante (la fase liquida più in alto, color giallo paglierino) contiene gli acidi nucleici e viene facilmente recuperato (circa 600 µl) e trasferito in una nuova Eppendorf da 2 ml.

3 - Precipitazione degli acidi nucleici

Al campione si aggiunge alcool isopropilico freddo (- 20° C) per una quantità pari a 2/3 del volume di surnatante recuperato. Si inverte la provetta 5-6 volte. A questo punto è possibile visualizzare, in controluce, la matassa di DNA genomico ed il pulviscolo di RNA. La precipitazione avviene perché l'alcool, rispetto al DNA, è assai più affine all'acqua, per cui l'acqua che circonda il DNA mantenendolo in soluzione viene sequestrata dall'alcool ed il DNA, non più idratato e non essendo solubile in alcool, precipita.

Si lascia precipitare a temperatura ambiente per 20 minuti, si centrifuga a 4000 rpm per 10' a 4° C, si elimina il surnatante, si lava il pellet di acidi nucleici (DNA e RNA) con 1 ml di etanolo a 70%, e si centrifuga ancora a 4000 rpm per 10' a 4°C. Si elimina completamente il surnatante e si liofilizza per 1 minuto per eliminare le tracce di etanolo.

4 - Solubilizzazione

Si aggiungono 400 µl di Tris-EDTA e si solubilizza il pellet in ghiaccio. A questo punto il materiale può essere conservato a -20° C.

5 - Purificazione (rimozione dell'RNA)

Si aggiunge RNAasi A per una concentrazione di 100 µg/ml, si incuba il materiale a 37° C per 40' in leggera agitazione in modo che l'enzima agisca eliminando l'RNA.

Si aggiunge poi un uguale volume di Cloroformio-Alcol isoamilico (24:1 v/v), si agita, per ottenere un'unica fase. Il Solvente organico Cloroformio-Alcol isoamilico elimina l'enzima RNAasi A e altre impurità. Si centrifuga a 10000 rpm per 10' a 4° C. Si recupera il surnatante e si aggiungono 1/10 del volume di NaCl saturo e 2 volumi di etanolo assoluto freddo (-20° C), si inverte la Eppendorf 4-5 volte. A questo punto, in controluce, dovrebbe essere visibile la matassa di DNA. Si centrifuga a 4000 rpm a 4°C, si elimina il surnatante e si lava il pellet di DNA con 1 ml di etanolo a 70%. Si centrifuga ancora a 4000 rpm a 4°C. Si elimina il surnatante, si liofilizza per un minuto per eliminare le tracce di etanolo e si solubilizza il pellet di DNA in acqua distillata (100-200 µl). Si conserva a -20°C.

A questo punto il DNA deve essere quantizzato e visualizzato su gel, ed è pronto per le analisi molecolari.