



Unione Europea

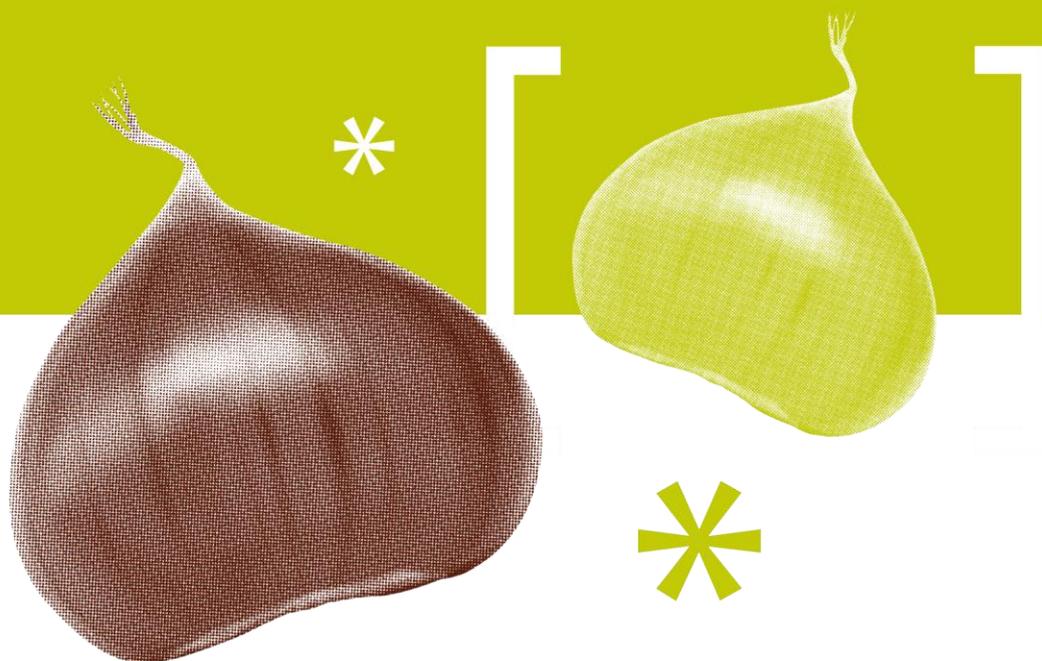
Fondo europeo agricolo  
per lo sviluppo rurale:  
*l'Europa investe  
nelle zone rurali*



**Misura 16 "Cooperazione" art. 35 del Reg. (UE) n. 1305/2013**  
Sottomisura 16.1 - Tipologia di Intervento 16.1.2 - "Sostegno ai GO  
del PEI per l'attuazione di progetti di diffusione delle innovazioni  
nell'ambito del rafforzamento dell'AKIS campano"



**KASTRACK**  
tracking chestnut fingerprints



## ***Estrazione del DNA con kit commerciali*** ***Protocollo DNeasy Plant Mini Kit***

(cat. N. 69104 e 69106 QIAGEN, Germantown, MD, USA)

Passaro S., Gentile D., De Masi L., Petriccione M., Nunziata A.

## Note importanti

---

- Il presente protocollo riassume la procedura consigliata dal produttore così come sperimentata su foglie e gemme di castagno durante il progetto KasTrack. È possibile, in alternativa, utilizzare kit equivalenti basati sulla tecnologia delle colonnine da centrifuga con membrana di silice.
- Dopo la raccolta, se il tessuto vegetale non viene utilizzato immediatamente, congelare in azoto liquido e conservare ad una temperatura compresa tra -90 °C e -65 °C fino all'uso. In alternativa, essiccare o liofilizzare entro 24 ore dalla raccolta e conservare a temperatura ambiente.
- La procedura è ottimizzata per l'uso con tessuto fogliare, ma può essere utilizzata anche per la purificazione del DNA da altri tessuti vegetali, inclusi gemme e semi.
- Il buffer AP1 può assumere un colore giallo durante la conservazione. Ciò non influisce sulla procedura.

## Cose da fare prima di iniziare

---

- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15–25°C).
- Se necessario, sciogliere nuovamente i precipitati nei Buffer AP1 e AW1 (prima dell'aggiunta di etanolo).
- Aggiungere etanolo ai Buffer concentrati AW1 e AW2 secondo le indicazioni in etichetta:
  - A 19 ml di Buffer AW1 aggiungere 38 µl di Etanolo puro e barrare la casella in etichetta
  - A 13 ml di Buffer AW2 aggiungere 40 µl di Etanolo puro e barrare la casella in etichetta
- Preriscaldare un incubatore a bagnomaria o un blocco riscaldante a 65°C.

## Procedura

---

1. **Pesare il tessuto vegetale - utilizzare fino a 100 mg di tessuto fresco o congelato; fino a 20 mg di tessuto liofilizzato.**

*Nota: il superamento della quantità massima raccomandata di materiale di partenza comporta una lisi inefficiente e una riduzione della resa e della purezza.*

2. **Macinare il tessuto vegetale con uno dei seguenti metodi:**
3. **Mortaio e pestello** - Versare **azoto liquido** sul materiale nel mortaio e **macinare** accuratamente con un pestello. Trasferire il campione polverizzato in una provetta per microcentrifuga da 1,5 o 2 ml, aggiungere **400 µl** di **buffer AP1** e miscelare accuratamente per **5-10 secondi** utilizzando un **vortex**.

**2.a) Trapano** - Montare un pestello di plastica ad un comune trapano da lavoro. In una provetta da 2 ml contenente 100 µl Buffer di lisi AP1 e macinare per circa 30 secondi a bassa velocità. Aggiungere poi altri 300 µl di buffer AP1, miscelare accuratamente per 5-10 secondi utilizzando un vortex.

**2.b) Tissue lyser** - Trasferire il campione liofilizzato in una **provetta safe-lock** da 2 ml, insieme a **biglie** in acciaio inox o in carburo di tungsteno da 3 mm. Posizionare le provette nel set di adattatori **TissueLyser 2x24**, e fissarle ai morsetti del TissueLyser. Macinare immediatamente i campioni per **1 min** a **30 Hz**. **Ripetere** il passaggio di **macinazione** precedente, **invertendo** la posizione dei **tubi** all'interno del set di adattatori, per assicurarsi che tutti i campioni vengano polverizzati completamente e uniformemente. Se si lavora con tessuto fresco, è possibile utilizzare la stessa procedura con campioni immersi in 100 µL Buffer di lisi AP1. Al termine, come visto in precedenza, è necessario aggiungere altri 300 µL di buffer AP1 e miscelare accuratamente per 5-10 secondi utilizzando un vortex.

**Note:**

- *Aggiungere il tampone di lisi al tessuto polverizzato il più rapidamente possibile per evitare la degradazione del DNA.*
- *Tutto il materiale macinato deve essere accuratamente miscelato con il tampone di lisi. La degradazione del DNA può verificarsi nelle particelle che vengono lasciate sulle pareti del tubo.*
- *In rari casi, in cui i grumi non possono essere rimossi mediante pipettaggio e vortex, è possibile utilizzare un micropestello monouso.*

3. Aggiungere **4 µl** di **RNasi A** (100 mg/ml) e agitare tramite **vortex** per **5-10 secondi** per miscelare accuratamente.

4. Incubare la miscela per **10 minuti** a **65°C** agitando di tanto in tanto.

**Note:**

- *Mescolare **2-3 volte** durante l'incubazione **capovolgendo la provetta** in modo da promuovere la lisi chimica.*
- *Non miscelare il buffer AP1 e la RNasi A prima dell'uso.*

5. Aggiungere al lisato **130 µl** di **Buffer P3**. Mescolare e incubare per **5 minuti** in ghiaccio.

6. Centrifugare per 5 minuti a 20.000 x g per rimuovere la maggior parte dei precipitati e dei residui cellulari generati durante la fase di lisi per evitare che interferiscano con le successive fasi di purificazione.

7. Prelevare e trasferire il surnatante nella colonna di centrifuga **QIAshredder® Mini spin** (colore lilla) posta in una provetta di raccolta da 2 ml e centrifugare per **2 minuti a 20.000 x g**.

**Nota:** la colonna *QIAshredder Mini spin* rimuove la maggior parte dei precipitati e dei residui cellulari, ma una piccola quantità passerà attraverso e formerà un pellet nel tubo di raccolta. Fare attenzione a non disturbare questo pellet nella fase successiva.

8. Trasferire la frazione di **eluato**, misurandone il volume, in una nuova provetta per microcentrifuga da 1.5 ml (non fornita nel kit) facendo attenzione a non disturbare il pellet di residui cellulari. In genere si recuperano **450 µl** di lisato.

**Nota:** per alcune specie vegetali viene recuperato meno lisato, quindi misurare il volume per il passaggio successivo.

9. Aggiungere **1.5 volumi di Buffer AW1** al lisato e mescolare con una pipetta. Ad esempio, a 450 µl di lisato aggiungere 675 µl di tampone AW1.

**Note:**

- Se il volume del lisato è inferiore, ridurre di conseguenza la quantità di Buffer AW1.
- Dopo l'aggiunta di Buffer AW1 può formarsi un precipitato, ma ciò non influisce sulla procedura.
- Assicurarsi che l'etanolo sia stato aggiunto al Buffer AW1.
- È importante pipettare il Buffer AW1 direttamente sul lisato e miscelare immediatamente.

10. Trasferire **650 µl** della miscela della fase 10, compreso l'eventuale precipitato che si è formato, nella colonna da centrifuga **DNeasy® Mini spin column** (senza colore) posta in una provetta di raccolta da 2 mL (fornita nel kit). Centrifugare per **1 min a ≥6000 x g**. Gettare l'eluato e ripetere il passaggio con il campione rimanente.

**Nota:** le frazioni di eluato contengono il Buffer AW1 e quindi non devono mai entrare in contatto con la candeggina nello smaltimento.

11. Posizionare la colonna da centrifuga **DNeasy® Mini spin column** in un nuovo tubo di raccolta da 2 ml (fornito nel kit), aggiungere **500 µl di Buffer AW2** e centrifugare per **1 min a ≥6000 x g**. Gettare l'eluato e riutilizzare il tubo di raccolta al punto successivo.

**Nota:** Assicurarsi che l'etanolo sia stato aggiunto al Buffer AW2.

12. Aggiungere altri **500 µl** di **Buffer AW2** alla colonna di centrifuga DNeasy® Mini e centrifugare per **2 min** a **20.000 x g** per lavare e poi asciugare la membrana.  
***Nota:** Dopo la centrifugazione, rimuovere con cautela la colonna di centrifuga DNeasy Mini dal tubo di raccolta in modo che la colonna non entri in contatto con il flusso, e quindi che l'etanolo non venga trasportato nella successiva fase di eluizione. Dopo avere gettato l'eluato, è possibile eseguire una nuova centrifugazione per **2 min** a **20.000 x g** per asciugare del tutto la membrana prima di trasferirla in un nuovo tubo.*
13. Trasferire la colonna di centrifuga **DNeasy® Mini spin column** in una nuova provetta per microcentrifuga da 1.5 ml o 2 ml (non fornita nel kit).
14. Per eluire il DNA genomico, aggiungere **75 µl** di tampone AE direttamente al centro della membrana DNeasy Mini e dopo un'incubazione di **5 min** a temperatura ambiente, centrifugare per **1 min** a **≥6000 x g**.
15. Eseguire una seconda eluizione, come al punto 14, utilizzando la stessa provetta di eluizione. Il DNA purificato è pronto per essere utilizzato in applicazioni a valle o **conservato a -20°C**.