



Unione Europea

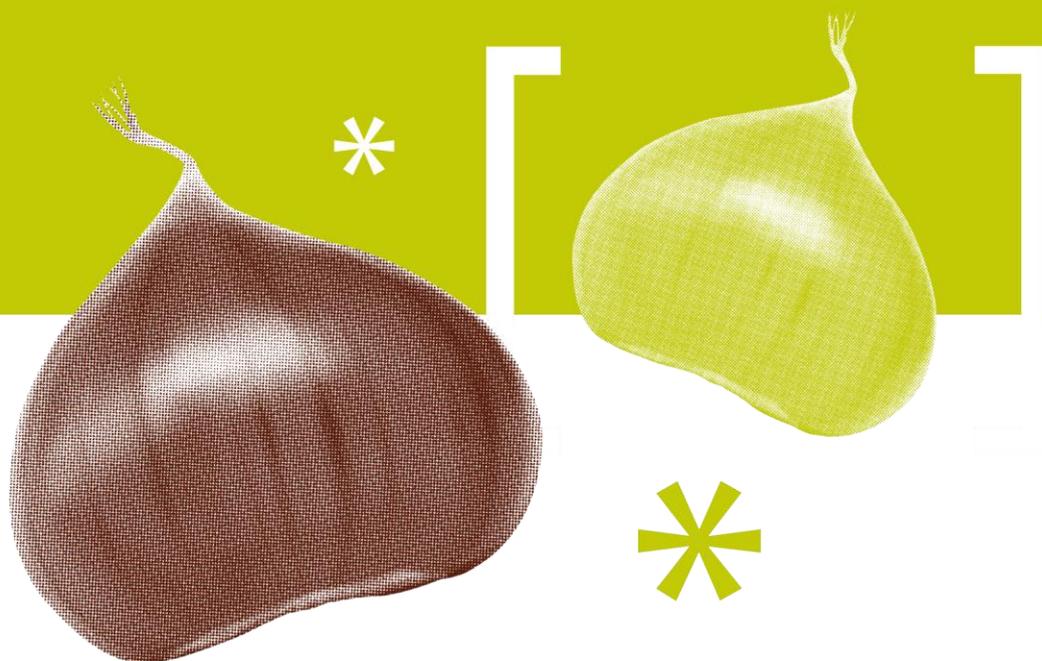
Fondo europeo agricolo
per lo sviluppo rurale:
*l'Europa investe
nelle zone rurali*



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



Fissazione delle foglie su carta speciale

Protocollo FTA PlantSaver

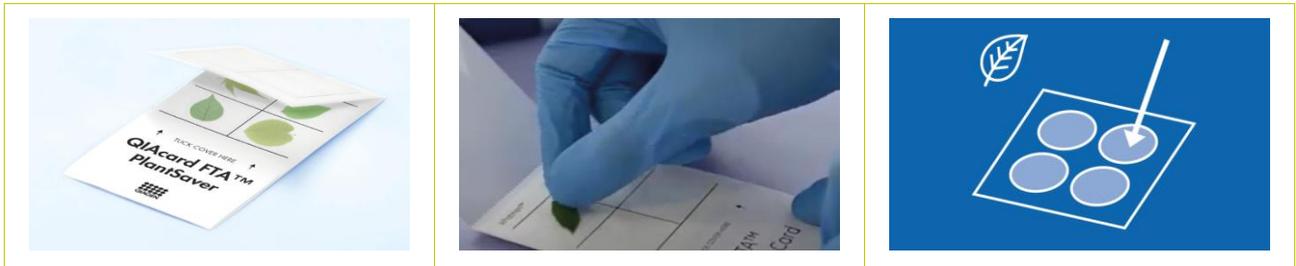
Passaro S., Gentile D., De Masi L., Petriccione M., Nunziata A.

Note importanti

- Il presente protocollo riassume la procedura consigliata dal produttore così come sperimentata su foglie di castagno durante il progetto KasTrack..

Procedura di preparazione del campione

1. **Posizionare la foglia**, con la pagina inferiore rivolta verso il basso, **sopra** la scheda **QIAcard FTA PlantSaver**.

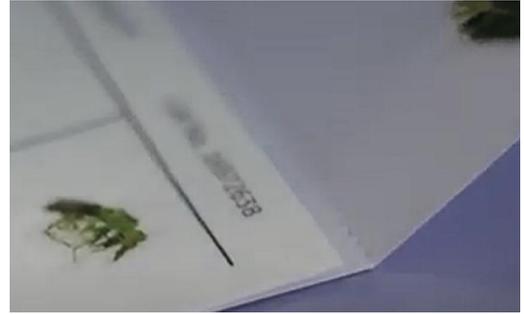


2. Chiudere la scheda e **colpire moderatamente per 15 secondi** utilizzando un **oggetto pesante e contundente** (come un piccolo pestello di porcellana, la punta di un tubo Falcon, un martello, il manico di un cacciavite).

Nota: quando si applica la pressione, è importante dare un colpo rapido e forte con uno slancio sufficiente a rompere le pareti cellulari. Se la pressione è troppo bassa, non si riuscirà a trasferire abbastanza DNA alla matrice della scheda per consentire le applicazioni successive. Allo stesso tempo, se si colpisce la scheda con troppa forza si rischia di distruggere la matrice.



3. Per **verificare** che una quantità sufficiente di **materiale** vegetale si sia **trasferita** alla matrice della scheda QIAcard FTA PlantSaver, si deve poter **osservare** la presenza di **aree** verdi o umide **sul retro** della scheda in corrispondenza dell'area in cui è stato applicato il campione.

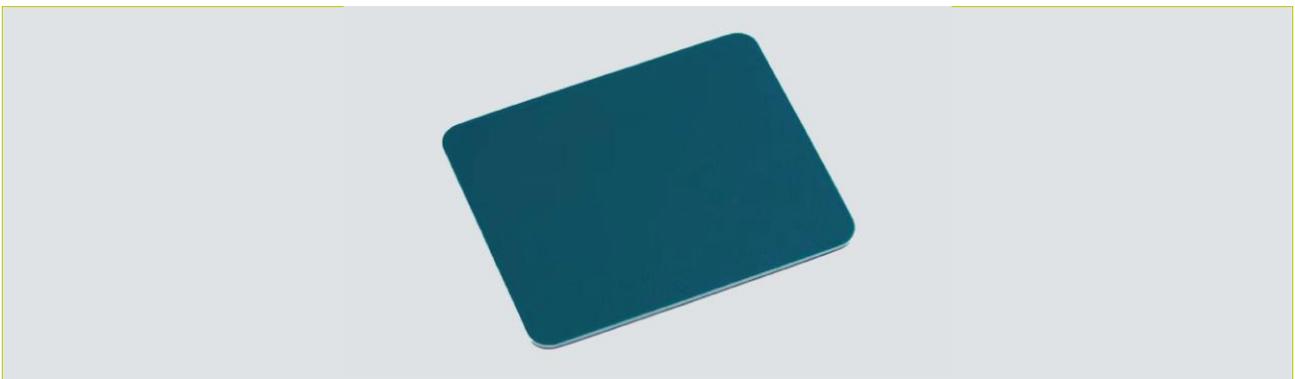


Nota: fare attenzione a non danneggiare la matrice.

4. Con l'aiuto di una pinzetta, **eliminare** i **residui** di tessuto fogliare dalla superficie della scheda e dalla copertura.
5. Dopo aver trasferito il tessuto vegetale, lasciare **asciugare** all'aria la scheda QIAcard FTA per almeno **1 ora**.

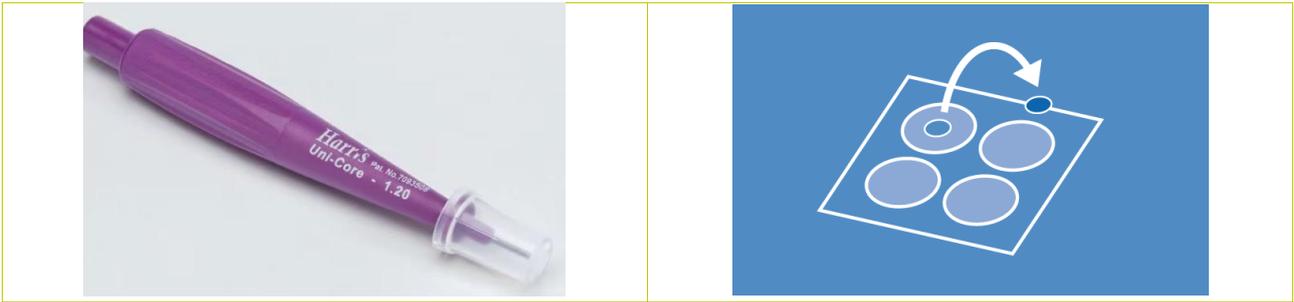
Protocollo di lavaggio del campione

1. Posizionare la scheda QIAcard FTA PlantSaver su una **superficie pulita** idonea al taglio.



2. **Prelevare** un **dischetto** dal centro dell'area del campione essiccato utilizzando i **punzoni UniCore** da **1.2 mm**.

Nota: attenzione a non perforare anche la superficie di supporto.



3. Trasferire il dischetto in un **micro-tubo** da 0,2 ml o in una piastra da 96 campioni per l'amplificazione della **PCR***

* prelevare anche un dischetto da un'area vuota della matrice FTA da utilizzare come controllo negativo.

Nota: è necessario prestare attenzione nel maneggiare i dischi FTA asciutti, poiché le attrezzature da laboratorio in plastica possono generare elettricità statica e respingere i dischi.

Nota: è importante assicurarsi che i contaminanti non vengano trasportati tra una perforazione e la successiva. Quindi si consiglia di perforare una matrice vuota o carta da filtro tra un campione e l'altro.



4. Aggiungere **30 µl** di tampone di lavaggio **QIAcard FTA Wash Buffer** in ciascun micro-tubo o pozzetto e **mescolare pipettando** almeno **due volte**. Incubare in agitazione a temperatura ambiente per **5 minuti**.



5. Assicurandosi che il dischetto rimanga nel micro-tubo o nel pozzetto, **rimuovere** la maggiore quantità possibile di tampone di lavaggio **QIAcard FTA Wash Buffer** con una pipetta.

- 6. Ripetere** i passaggi 4 e 5 per un totale di **4 lavaggi** con il tampone di lavaggio **QIAcard FTA Wash Buffer**.
- 7.** Aggiungere **30 µl** di **Buffer TE-1** (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) in ciascun micro-tubo o pozzetto, **mescolare pipettando almeno due volte**. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione.
- 8.** Assicurandosi che il disco perforato rimanga nel micro-tubo o nel pozzetto, **rimuovere** la maggiore quantità possibile di **Buffer TE-1** con una pipetta.
- 9. Ripetere** i passaggi 7 e 8, per un totale di **3 lavaggi** con **Buffer TE-1**.
- 10.** Lasciare **asciugare** il dischetto contenuto nel micro-tubo o nel pozzetto mantenendo il contenitore aperto a temperatura ambiente per **1 ora** oppure a **56°C** per **10 min**.

***Nota:** il processo di purificazione del DNA rimuove le sostanze chimiche protettive della tecnologia FTA; si raccomanda di eseguire l'amplificazione della **PCR entro 3 ore** dall'asciugatura del disco o di **conservare** il disco a **4°C** per tempi brevi o tra **-15°/-30°C** per tempi più lunghi.*

Amplificazione PCR

Aggiungere **15 µl** della miscela di amplificazione direttamente nel micro-tubo o nel pozzetto della piastra PCR contenente il dischetto FTA essiccato.