

Estrazione di **DNA** genomico da **funghi**

Obiettivo Purificare il materiale genetico di muffe cresciute in piastra e isolate a partire da matrici alimentari.

Autore Istituto Augusto Monti di Asti
Primo classificato Mad for Science 2018
Progetto “Funghi - Questi sconosciuti”



Materiali e reagenti

- Colture di muffe in piastra Petri
- Materiali e reagenti forniti dal kit di estrazione (vedi note)
- Lancette sterili monouso
- Provette da 1.5 ml
- Provette da 2 ml
- Pestelli
- Puntali
- Pennarello



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Bagnetto termostato
- Micropipette
- Vortex
- Microcentrifuga



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

Circa un'ora (le tempistiche variano a seconda del numero di campioni da estrarre)



Procedimento

1. Per eseguire questo protocollo è necessario disporre di colture di muffe in piastra Petri, ottenute seguendo il protocollo “Semina di funghi su piastra” nella sezione “Microbiologia”.
2. Accendere il bagnetto termostato e impostare la temperatura a 65°C.
3. Trasferire in una provetta un volume di tampone di eluizione (Elution Buffer PE) adeguato al numero di campioni da estrarre e scaldarlo nel bagnetto a 65°C. Considerando che il volume di eluizione per ogni campione è di 100 µl, se avessimo per esempio 10 campioni di muffe dovremmo riscaldare almeno 1 ml di tampone di eluizione.
4. Accertarsi che il tampone di lavaggio PW2 (Wash Buffer PW2) e la soluzione di RNase A siano stati adeguatamente preparati e che il tampone di lisi PL1 (Lysis Buffer PL1) non presenti precipitati (vedi note).
5. Raccolta e omogeneizzazione meccanica del campione:
 - raccogliere con una lancetta sterile monouso uno o più campioni di uno stesso micete (fino a 100 mg), evitando di prelevare il terreno sottostante, e trasferirli in una provetta da 2 ml o da 1.5 ml. Il campione da prelevare deve essere il più rappresentativo possibile delle colonie presenti in piastra. Ad esempio, se la muffa presenta una colorazione verde e bianca, raccogliere materiale sia dalla porzione bianca sia dalla porzione verde; così anche nel caso di colonie con diversa morfologia. In questa fase lavorare sotto cappa biologica a flusso laminare o, in alternativa, su un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e vicino alla fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!);
 - lisare meccanicamente il micete, usando i pestelli direttamente dentro la provetta con un movimento *up and down*.
6. Lisi cellulare del campione:
 - con una micropipetta trasferire 400 µl di tampone di lisi PL1 (**Lysis Buffer PL1**) e mescolare il campione con un vortex per 10-15 secondi;
 - aggiungere 10 µl di **RNase A** e mescolare il campione con un vortex per 10-15 secondi;
 - incubare la provetta nel bagnetto per 10 minuti a 65°C.

7. Filtraggio del lisato:

- montare una colonnina pulita con l'anello **viola** sul tubo di raccolta da 2 ml (entrambi in dotazione nel kit) e marcarla con il nome del campione;
- trasferire poco per volta il lisato nella colonnina, facendo attenzione a non toccare il filtro con il puntale;
- centrifugare la colonnina per 2 minuti a 13.000 rpm (se il liquido non avesse attraversato completamente il filtro, ripetere la centrifugazione);
- eliminare la colonnina con il filtro, perché ha trattenuto le componenti cellulari non necessarie derivate dalla lisi;
- preparare una provetta pulita da 1.5 ml, segnando il nome del campione;
- trasferire il liquido filtrato dal tubo di raccolta alla provetta da 1.5 ml pulita, evitando di prelevare un eventuale pellet.

8. Preparazione delle condizioni per il legame del DNA alla successiva colonnina: aggiungere 450 µl di **Binding Buffer PC** al filtrato e mescolare il campione con un vortex per 10-15 secondi.

9. Legame del DNA alla colonnina:

- montare una colonnina pulita con l'anello **verde** sul tubo di raccolta da 2 ml (entrambi in dotazione nel kit) e marcarla con il nome del campione;
- trasferire un massimo di 700 µl di campione filtrato, facendo attenzione a non toccare la membrana con il puntale;
- centrifugare la colonnina per 1 minuto a 13.000 rpm;
- eliminare il liquido contenuto nel tubo di raccolta;
- riposizionare la colonnina, a cui è legato il DNA, nel tubo di raccolta svuotato nel punto precedente.

Nel caso avanzasse altro campione filtrato (oltre ai 700 µl trasferiti precedentemente), ripetere il caricamento e la centrifugazione così da massimizzare la quantità di DNA legata alla membrana.

10. Lavaggio e asciugatura della membrana della colonnina:

- trasferire con una micropipetta 400 µl di tampone di lavaggio PW1 (**Wash Buffer PW1**) senza toccare la membrana della colonnina, centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm, eliminare il liquido del tubo di raccolta e ricollocare la colonnina nel tubo di raccolta appena svuotato;
- trasferire con una micropipetta 700 µl di tampone di lavaggio PW2 (**Wash Buffer PW2**) nella colonnina, senza toccare la membrana, centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm, eliminare il liquido del tubo di raccolta e rimontare la colonnina nel tubo di raccolta appena svuotato;
- aggiungere con una micropipetta 200 µl di tampone di lavaggio PW2 (**Wash Buffer PW2**) senza toccare la membrana della colonnina, centrifugare per 2 minuti a 13.000 rpm ed eliminare il tubo di raccolta con il liquido;
- opzionale dopo la centrifugazione del punto precedente: eliminare il liquido del tubo di raccolta, rimontare la colonnina sul tubo di raccolta

appena svuotato, centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm ed eliminare il tubo di raccolta;

- inserire la colonnina in una provetta da 1.5 ml pulita e marcata con il nome del campione.

11. Eluizione del DNA:

- trasferire con una micropipetta 50 μ l di tampone di eluizione (**Elution Buffer PE**) caldo (65°C) nel centro della colonnina, incubare nel bagnetto per 5 minuti a 65°C e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm;
- ripetere il passaggio precedente, trasferendo altri 50 μ l di tampone di eluizione (**Elution Buffer PE**) caldo (65°C) nel centro della stessa colonnina, incubare nel bagnetto per 5 minuti a 65°C e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm;
- eliminare la colonnina, perché il DNA è stato eluito e si trova ora nella provetta da 1.5 ml.

12. Quantificare la concentrazione di DNA estratto con lo spettrofotometro (come descritto nel protocollo “Quantificazione del DNA allo spettrofotometro”) oppure effettuare una valutazione qualitativa del DNA tramite caricamento su gel d’agarosio.

13. Conservare il DNA estratto a 4°C, per alcuni giorni, oppure a -20°C.

Note

- L'estrazione di DNA da funghi descritta è stata realizzata con il kit NucleoSpin® Plant II Mini (Macherey-Nagel), seguendo il protocollo di estrazione del DNA da piante.
- La quantità di DNA attesa al termine dell'estrazione è di circa 1-30 µg.
- Il kit di estrazione - con tutte le sue componenti madri - è da conservare a temperatura ambiente (15-25°C). La soluzione di RNase A ricostituita si conserva a 4°C fino a 3 mesi. Nel caso fosse necessario utilizzare il kit per intervalli di tempo maggiori, è possibile preparare delle aliquote mantenendole a -20°C.
- Al primo utilizzo del kit è necessario diluire il Wash Buffer PW2 concentrato con Etanolo al 96-100% e ricostituire la soluzione liofilizzata di RNase A con acqua deionizzata sterile, seguendo le indicazioni riportate sui contenitori delle componenti in oggetto. Nel caso del Kit Mini è necessario diluire il Wash Buffer PW2 (25 ml) con 100 ml di Etanolo al 96-100% e ricostituire la polvere di RNase A con 600 µl di acqua.
- Se il Lysis Buffer PL1 presenta dei precipitati, soprattutto se è stato conservato a temperature inferiori a 20°C, incubare la bottiglia a 30-40°C per alcuni minuti e mescolare molto bene fino a che i precipitati non si siano sciolti.
- Se nella fase di lisi cellulare il campione non si risospende facilmente, è possibile aggiungere altro Lysis Buffer PL1, oltre ai 400 µl iniziali. In questo caso anche i volumi di RNase A e di Binding Buffer PC sono da aumentare proporzionalmente.
- Nel caso in cui una precedente estrazione abbia fornito DNA a bassa concentrazione, è possibile la volta successiva prolungare a 30-60 minuti la lisi cellulare a 65°C per favorire la completa distruzione cellulare e una maggiore liberazione di DNA.
- Non è sicuro accendere la fiamma del becco Bunsen sotto la cappa biologica, per cui la raccolta dei campioni sotto cappa deve essere effettuata esclusivamente con lancette sterili monouso. Prestare attenzione a cambiare lancetta per ogni nuovo campione da raccogliere!
- Se, invece, si esegue la raccolta sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare lancette in acciaio inox. In questo caso:
 - sterilizzare la punta della lancetta sulla fiamma del becco Bunsen, fino al raggiungimento del colore rosso;
 - raffreddare la punta incandescente, immergendola nel terreno di coltura di una piastra in un punto libero da colonie;
 - procedere con la raccolta del campione;
 - ripetere la fase di sterilizzazione e di raffreddamento della lancetta per ogni campione.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, l'operatore deve adottare alcuni accorgimenti funzionali a mantenere la sterilità dell'ambiente:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura, oltre il tempo necessario al prelievo del materiale biologico.
- Nel posizionare le provette nella microcentrifuga è buona norma che queste abbiano lo stesso orientamento (ad esempio, tutte con l'apertura della provetta verso il rotore della centrifuga). Questa pratica permetterà di sapere da quale lato si depositerà un eventuale pellet e ne faciliterà l'identificazione.
- Cambiare i puntali delle micropipette tra un campione e l'altro per evitare contaminazioni crociate di DNA.