

Fingerprinting del DNA

Protocollo per l'estrazione del DNA

- prelevare il campione di materiale biologico.

Mozzicone di sigaretta: con forbici sterili ritagliare la carta esterna del filtro appoggiandosi sulla carta d'argento e con una pinzetta trasferire un pezzetto nella provetta eppendorf.

Mucosa boccale: prelevare con un cotton fioc uno striscio di mucosa boccale; ritagliare con le forbici sterili un pezzettino del cotone e trasferirlo nella eppendorf.

Bicchieri o bottiglietta: con un cotton fioc umido passare il bordo del bicchiere o la ghiera del tappo della bottiglia; ritagliare con le forbici sterili un pezzettino del cotone e trasferirlo nella eppendorf

- numerare sul tappo la propria provetta contenete il campione biologico
- risospendere il buffer di estrazione (**chelex** 5% w/v, resina chelante, toglie le impurità e libera il DNA) con una micropipetta P 200. Attenzione fare velocemente sia l'operazione di risospensione che quella di trasferimento del buffer nella eppendorf con il campione biologico
- Aggiungere 200µl di buffer di estrazione, precedentemente risospeso (chelex) + 10µl di **proteinasasi K** + 20µl di **DTT** (ditiotreitolo)
- miscelare per inversione 5/6 volte
- incubare a 56°C per 30 min.
- "vortexare" per 15 sec.
- centrifugare in centrifuga eppendorf per 30 sec.
- incubare in bagnomaria a 95°/100°C per 8 min.
- "vortexare" per 15 sec
- centrifugare in centrifuga eppendorf per 2 min.

Aliquote del surnatante che contiene il DNA possono essere impiegate in PCR

Protocollo per colorazione argentica del DNA, dopo corsa elettroforetica

- immergere il gel dopo la corsa elettroforetica nella soluzione 1 (acido nitrico) e porre in agitazione per 6 min.
- recuperare la soluzione 1 e sostituirla con la soluzione 2 (nitrato d'argento) e quindi porre in agitazione per 20 min.
- sciacquare velocemente il gel con acqua bidistillata
- immergere il gel nella soluzione 3(carbonato di sodio) e porre in agitazione fin quando la soluzione 3 si scurisce
- smaltire la soluzione 3 ormai esausta e sostituirla con nuova soluzione 3
- mantenere in agitazione il gel immerso nella soluzione 3 fino a quando cominciano ad apparire le bande più basse del marcatore di peso molecolare
- smaltire la soluzione 3
- immergere il gel nella soluzione 4 (acido acetico 10%) e porre in agitazione per 5 min.
- recuperare la soluzione 4
- immergere il gel in acqua bidistillata e porre in agitazione per 5 min
- smaltire l'acqua bidistillata e sostituirla con la soluzione 5 (glicerolo 1%) e porre in agitazione per 10 min.
- recuperare la soluzione 5

- lasciare asciugare il gel all'aria e quindi avvolgerlo in pellicola trasparente