

PIANIFICAZIONE DI UN ESPERIMENTO IN LABORATORIO

(8 punti)

1. *Qual è il materiale biologico di partenza?*
2. *Cosa dobbiamo estrarre?*
3. *Qual è la problematica (es. gDNA da tessuto animale e devo fare PCR per il gene COI)?*
4. *Avere a disposizione di un PC collegato a internet*
5. *Ricerca i riferimenti bibliografici → metodiche e strumentazione adeguata*
6. *Preparare le soluzioni opportune*
7. *Autoclavare il materiale da utilizzare*
8. *Prenotare la strumentazione comune in laboratorio*

LABORATORIO DI GENETICA FORENSE

1. LOCALI AMPI NON AFFOLLATI PER EVITARE ERRORI
2. LOCALI BEN ILLUMINATI E VENTILATI
3. CONTROLLI DI ROUTINE SUL FUNZIONAMENTO DI TUTTE LE APPARECCHIATURE (centrifughe, microscopi, incubatori, ecc.)

• Arete distinte per evitare la contaminazione:

1. Area accettazione campioni: analisi dei reperti (descrizione e foto)
2. Area estrazione del DNA
3. Area amplificazione DNA (PCR)
4. Area elettroforesi DNA ed elaborazione dati (Post PCR)

Materiale di laboratorio



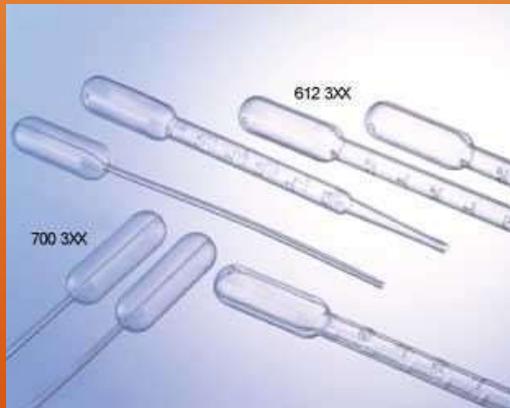
Guanti monouso in vinile



falcon



Puntali con filtro



Pasteur graduate



Pipette gilson

TECNICHE DI ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI

Qualità del campione di partenza

Numero di campioni

Costo

Tempo

Semplicità e affidabilità

Automazione

Sicurezza

QUAL È IL MATERIALE BIOLOGICO DI PARTENZA?

Blood

Semen

Saliva

Urine

Hair (w/Root & Shaft)

Teeth and Bone

Tissue

Cigarette Butts

Envelope & Stamps

Fingernail

Clippings

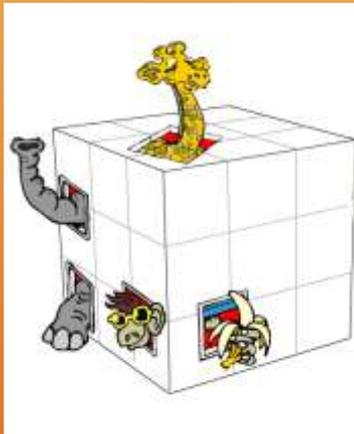
Chewing Gum

Bite Marks

Feces

ESTRAZIONE DEL DNA

Monitoraggio genetico **NON** invasivo
per le popolazioni selvatiche



NON ARRECARRE DISTURBO:

**ESTRARRE IL DNA DAI CAMPIONI BIOLOGICI CHE LASCIANO SUL
CAMPO (FECI, PELI, PENNE, TRACCE DI SANGUE ECC...)**

ESTRAZIONE DEL DNA

Monitoraggio genetico **NON** invasivo per le popolazioni selvatiche

È chiaro che per questi campioni è importante il contenuto cellulare da cui deriva la quantità di acido nucleico reperibile.

Molto importante in questo caso è la conservazione del campione:

per residui biologici trovati sul campo NON è pensabile eseguire l'estrazione dell'RNA (sarà già degradato); è preferibile estrarre il DNA che è una molecola molto più stabile.

Se si volesse eseguire uno studio di espressione genica a partire da questo tipo di campioni (es. feci), è necessario che la matrice sia fresca e che l'estrazione venga eseguita subito dopo il prelievo o dovrà essere congelato rapidamente.

STEPS IN DNA ANALYSIS

Collection

Specimen Storage

Extraction

Quantitation

Genotyping

Interpretation
of Results

Database

Storage & Searching



Blood Stain



Buccal swab

Sample Collection
& Storage



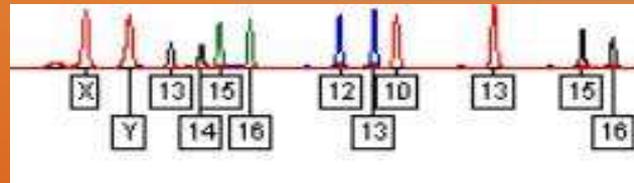
DNA
Extraction



DNA
Quantitation



Multiplex PCR Amplification



STR Typing

Male: 13,14-15,16-12,13-10,13-15,16

Interpretation of Results



DNA Database

L'ESTRAZIONE DEL DNA dal nucleo

1. **LISI** (ovvero rompere) della parete e della membrana cellulare → fare fuoriuscire il contenuto nucleare
2. **TRATTARE CON PK** → separare il DNA dalle proteine istoniche cui è associato
3. **PRECIPITARE IL DNA:** vengono utilizzati degli alcoli, quali ad es isopropanolo ed etanolo, nei quali il DNA è insolubile

LISI DEL CAMPIONE



Buffer di lisi per rottura della parete e membrana cellulare

Sali caotropici

Detergenti

Lisi enzimatica

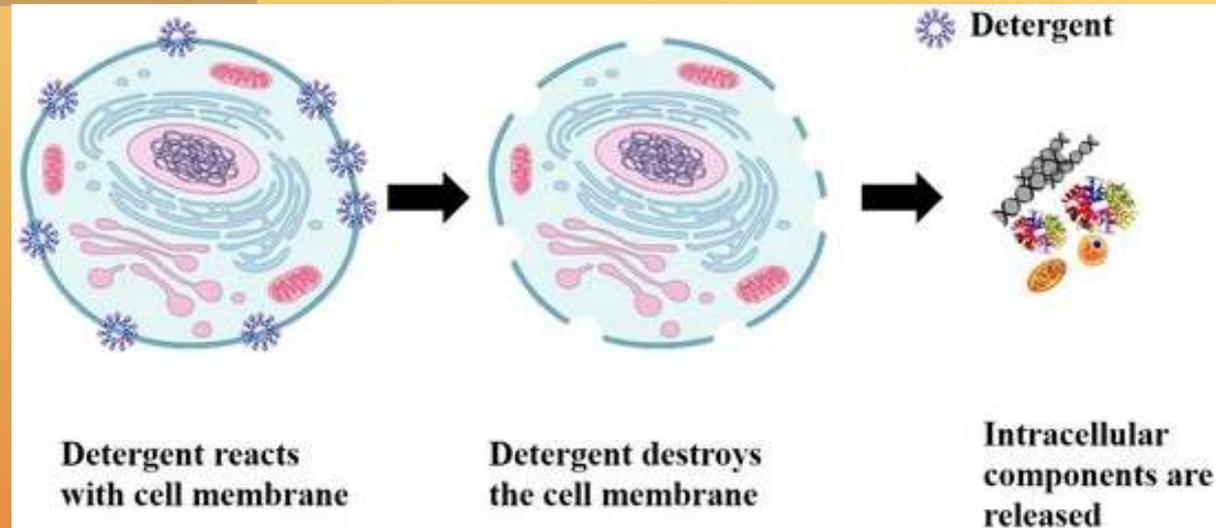
Lisi meccanica (sonicazione, elettroporazione, tissue lyser)

Bollitura

Raffreddamento



LISI DEL CAMPIONE



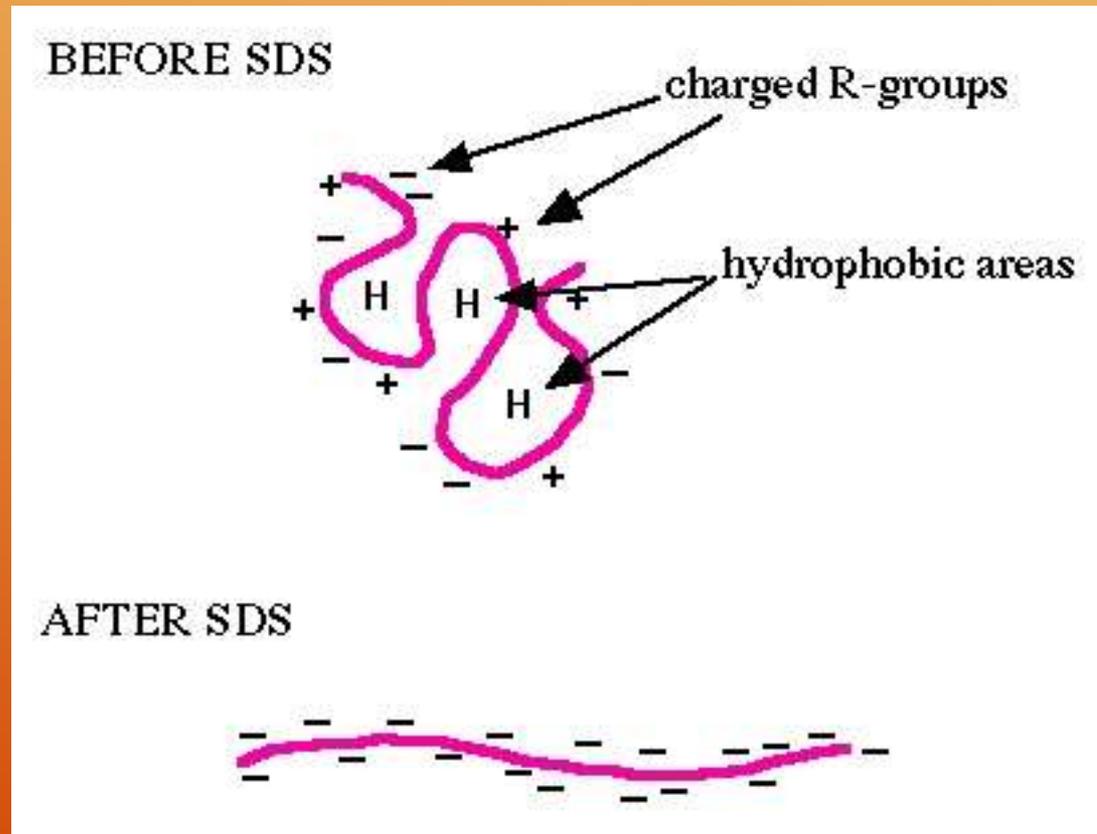
SDS, TritonX, Tween, sono detergenti non ionici: separano gli acidi nucleici dalle proteine e inibiscono le nucleasi

CTAB: detergente anionico che ha la capacità di formare complessi con il DNA e con proteine e polisaccaridi. Favorisce la purificazione da polisaccaridi, fenoli e altre impurità che spesso si trovano associate al DNA

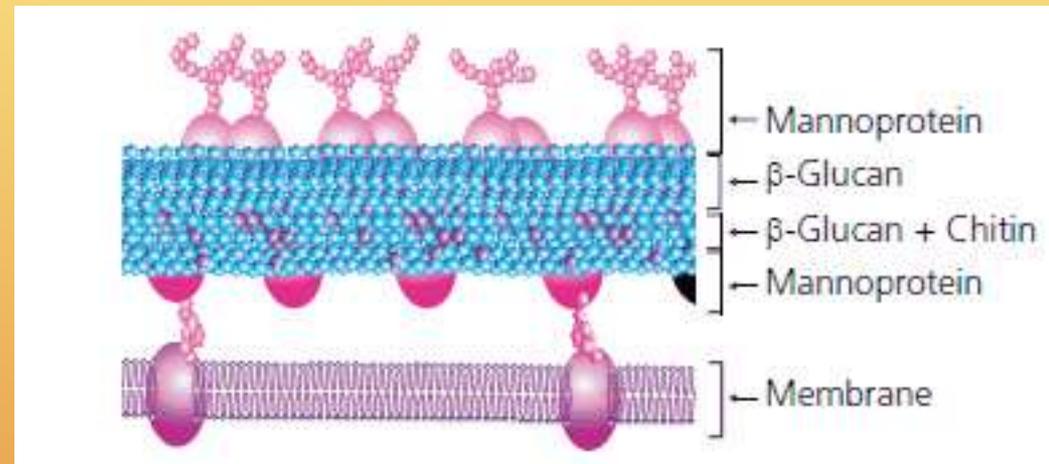
LISI DEL CAMPIONE

Uso di detergenti per lisi cellulare

Dissolvono interazioni idrofobiche tra aminoacidi



LISI ENZIMATICA DELLA PARETE CELLULARE



Enzimi per digerire la parete cellulare dei batteri

Lisozima: distrugge la parete di batteri Gram +

Detergenti (Triton X100) e agenti chelanti (EDTA) per distruggere la parete di Gram - (insensibili a lisozima)

Parete cellulare di lievito: $\beta(1-3)$ glucanasi, proteasi, $\beta(1-6)$ glucanasi, mannanasi e chitinasi

Funghi: lyticase oppure rottura meccanica con biglie

BOLLITURA E RAFFREDDAMENTO

Particolarmente utilizzata per estrarre DNA da matrici difficili (batteri e funghi)

Bollitura (100°C) per 15 min e successivo congelamento

- **Uso di azoto liquido**
- **Abbattimento della temperatura a -80°C**

LISI MECCANICA



Tissue lyser

La lisi del campione può essere effettuata a secco o con buffer di estrazione

La distruzione del campione avviene grazie ad una biglia di acciaio e a movimenti oscillatori ad alta frequenza

Tempo variabile a seconda della matrice di partenza

La lisi deve essere seguita da uno step di centrifugazione

PRIMARY DNA EXTRACTION METHODS

Organic

Chelex

Solid-phase

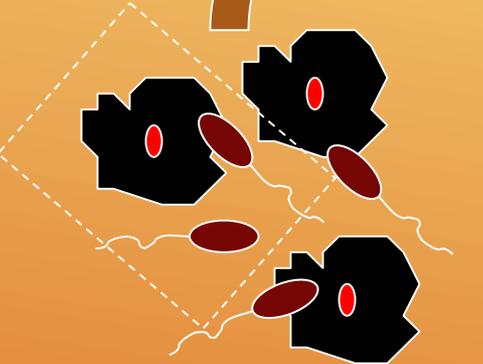
Qiagen (silica bind)

DNA IQ and PrepFiler (magnetic bead capture)

Differential extraction (separation of non-sperm and sperm fractions) based on absence or presence of DTT to break open the sperm cell coating

DIFFERENTIAL EXTRACTION

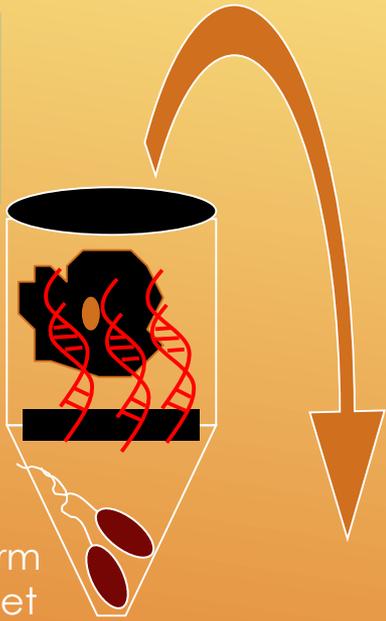
Remove a portion of the mixed stain



SDS, EDTA and proteinase K (cell lysis buffer)

Incubate at 37 °C

Centrifuge



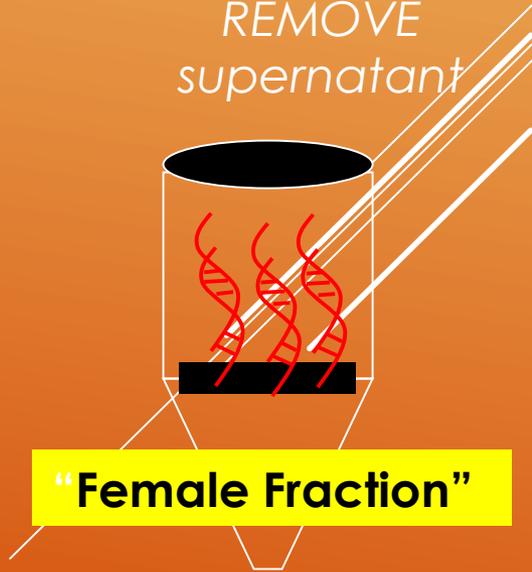
REMOVE supernatant

SDS, EDTA and proteinase K + DTT

DTT lyses sperm heads

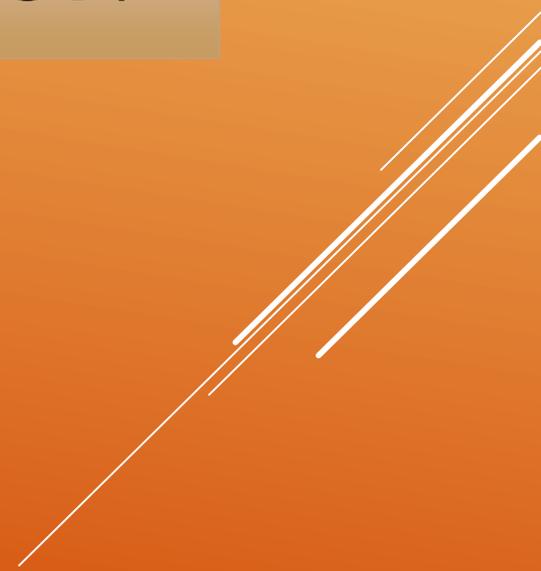
“Male Fraction”

“Female Fraction”



ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO TOTALE (gDNA e mtDNA)

ORGANIC EXTRACTION

Decorative white lines consisting of several parallel diagonal strokes in the bottom right corner of the slide.

Nella provetta al materiale biologico si aggiungono:

- 300 μ l di TAMPONE DI ESTRAZIONE (necessario per la rottura delle membrane cellulari)
- 100 mM NaCl, che stabilizza la salinità della soluzione e attiva
- proteinasi K (20 mg/ml)
- 100 mM EDTA (pH 8,00), un chelante che elimina i cationi bivalenti, substrato di azione per
- 2% SDS, detergente (sodio dodecil solfato) che solubilizza i lipidi delle membrane

Al termine dell'incubazione (56°C per 2 ore) per si elimina il materiale biologico (residui da togliere) e si aggiungono:

→ 500 µl di fenolo puro

→ 500 µl cloroformio/alcool isoammilico (24:1).

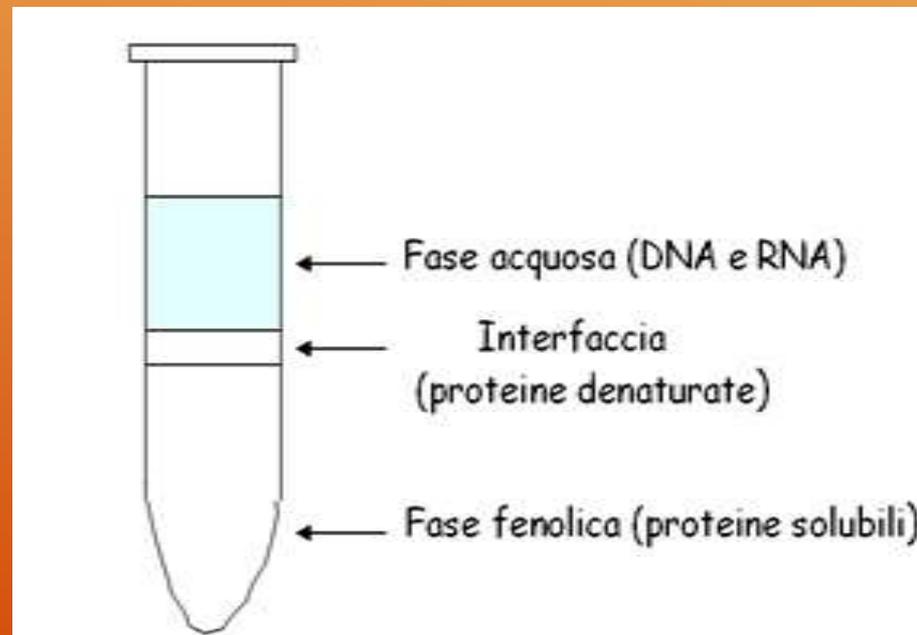
Questa tecnica è utilizzata per separare la fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, dalle altre componenti cellulari.

Il fenolo è un solvente dei lipidi e un denaturante delle proteine, mentre il cloroformio, un composto volatile costituito da una parte idrofoba e una idrofilica, solubilizza ed elimina il fenolo dalla soluzione impedendogli di legarsi alla componente idrofoba del DNA.

Si agitare fino a ottenere un'emulsione lattacea e si centrifuga a 13000 rpm per 5 minuti.

Al termine della centrifugazione si potrà osservare nella parte superiore della provetta la fase in cui sono presenti il DNA (e RNA), e nella parte inferiore le componenti idrofobiche solubili nella fase fenolica;

Si trasferisce la fase acquosa (DNA), circa 500 μ l, in una nuova provetta .



Si aggiungono 50 μl (un decimo di volume) di ammonio acetato 5 M (carico +, si lega al DNA -, facilitandone la precipitazione)

1000 μl (il doppio del volume) di ETOH assoluto freddo, (rompe i legami H, permettono al DNA di precipitare sul fondo)

Si mescola e si lascia a -20°C per 20 minuti.

CENTRIFUGARE A 14000 RPM PER 50 MIN
AL TERMINE DELLA CENTRIFUGAZIONE IL PELLET SARÀ PRECIPITATO SUL FONDO
DELLA PROVETTA E SI PUÒ QUINDI ASPIRARE LA FASE LIQUIDA.

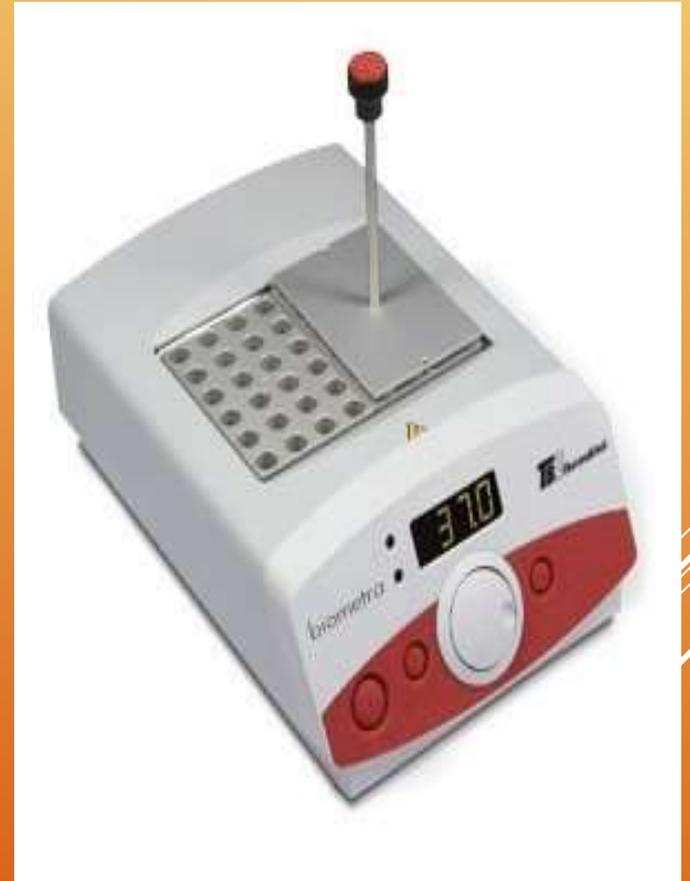


Si esegue un secondo lavaggio (ETOH) 70%. Dopo averle agitate, le provette vengono poste di nuovo in centrifuga e si centrifuga a 14000 rpm per 30 min.

Dopo aver centrifugato si elimina la fase liquida senza toccare il pellet che ha sedimentato sul fondo della provetta

Si elimina ogni traccia di etanolo mediante evaporazione.

Infine, si risospenderà il pellet in 50 μ l di acqua bidistillata sterile.



ORGANIC EXTRACTION

Lati positive:

yields relatively pure, high molecular weight dsDNA – good for RFLP

Lati negative:

Time consuming

Requires sample to be transferred to multiple tubes – increases risk of contamination

Involves use of hazardous (and smelly!) chemicals

ESTRAZIONE DI DNA CON KIT COMMERCIALI A COLONNINA

Facilità d'uso, protocolli standardizzati e riproducibili

Matrici silicee (legame tra DNA e matrice in presenza di sali caotropici)

Possibilità di automatizzare l'estrazione

Uso di RNase A e Proteinasi K

Kit diversi a seconda della matrice di partenza

ESTRAZIONE DI DNA CON KIT COMMERCIALI A COLONNINA

100-200 mg di campione (lisi con tissue lyser o azoto liquido)

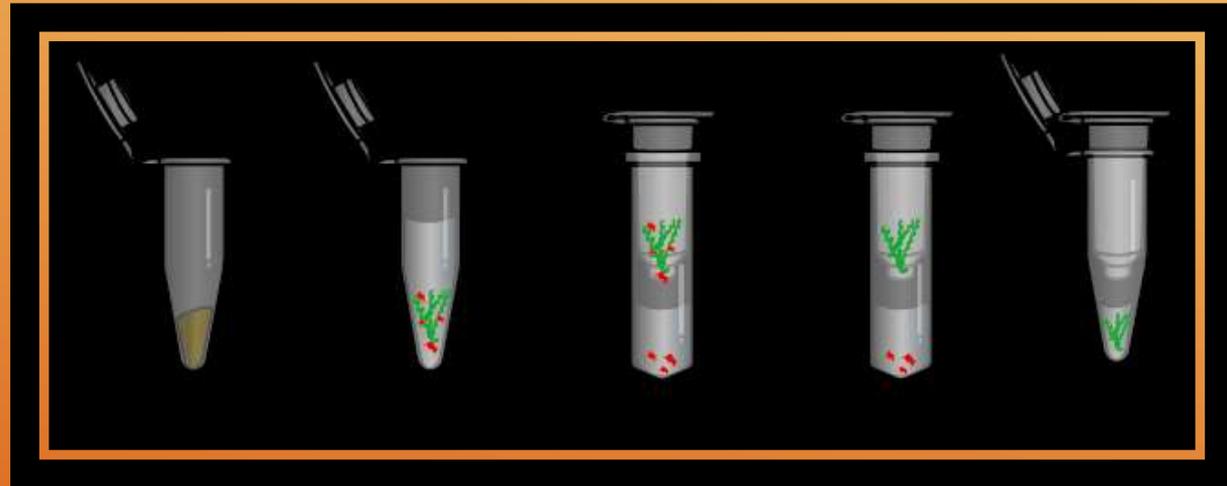
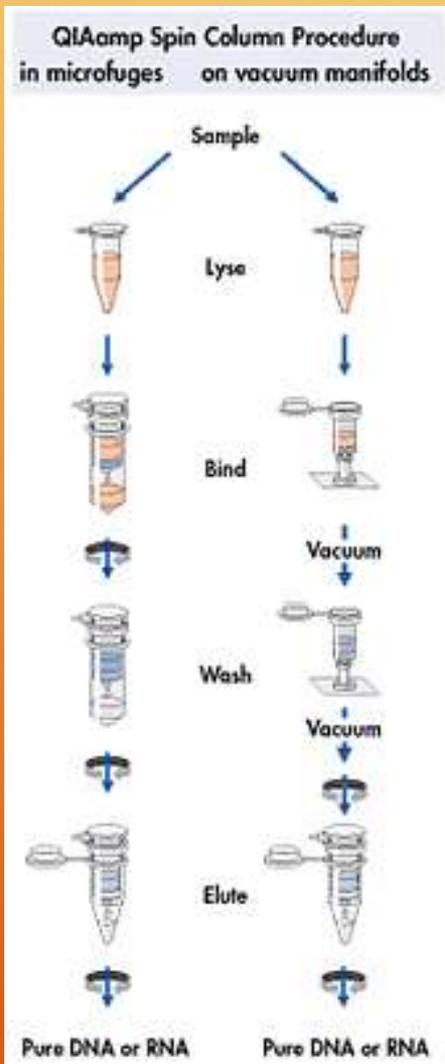
Il buffer di lisi fa adsorbire il DNA alla membrana di silice

Il pH acido e la concentrazione di sali del buffer assicurano che proteine e altri contaminanti non vengano trattiene dalla membrana

In questo modo il DNA, legato alla membrana viene sottoposto a cicli di lavaggio

L'aggiunta del buffer di eluizione a pH 9 fa staccare il DNA dalla membrana di silice

ESTRAZIONE DI DNA CON KIT COMMERCIALI COLONNINA A



ESTRAZIONE DI DNA CON KIT COMMERCIALI A COLONNINA

Pro:

DNA altamente purificato

Resa di DNA \simeq 100-150 ng/ μ l

Lunghezza della catena di DNA

Contro:

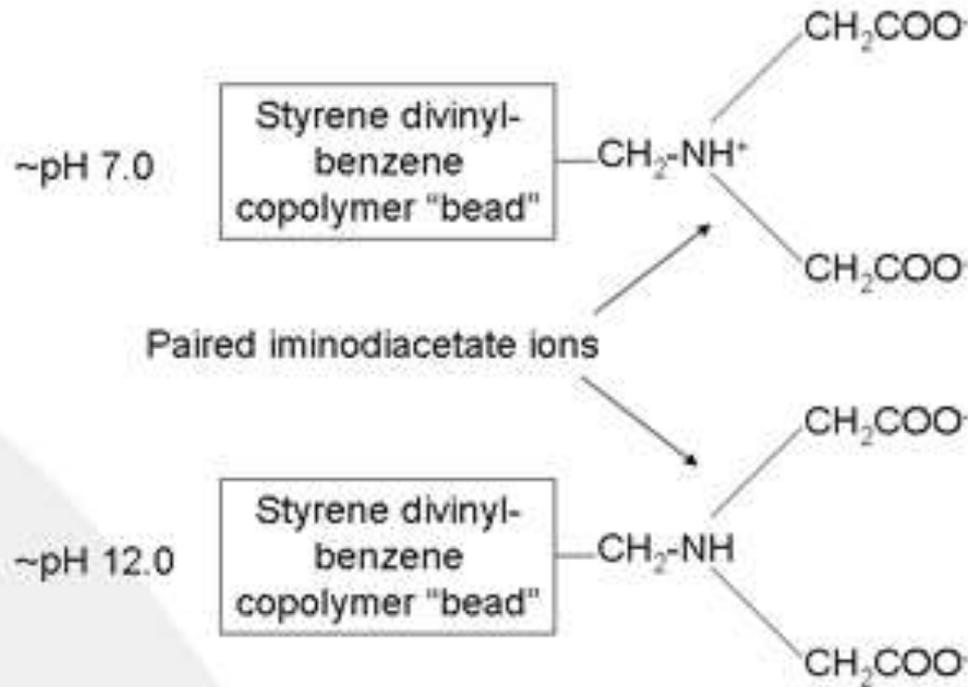
Molti trasferimenti dei campioni

Aumenta il rischio di contaminazioni

Time-consuming

Si possono processare un numero limitato di campioni

CHELEX EXTRACTION



Chelex[®] 100 resin is composed of styrene divinylbenzene copolymers with paired iminodiacetate ions. The iminodiacetate ions act as chelators for binding polyvalent metal ions. Chelex[®] 100 is very effective in binding metal contaminants with a high selectivity for divalent ions, without altering the concentration on non-metal ions. ⁰⁶

Chelex 100 (resina a scambio ionico)

DNA EXTRACTION AND QUANTIFICATION

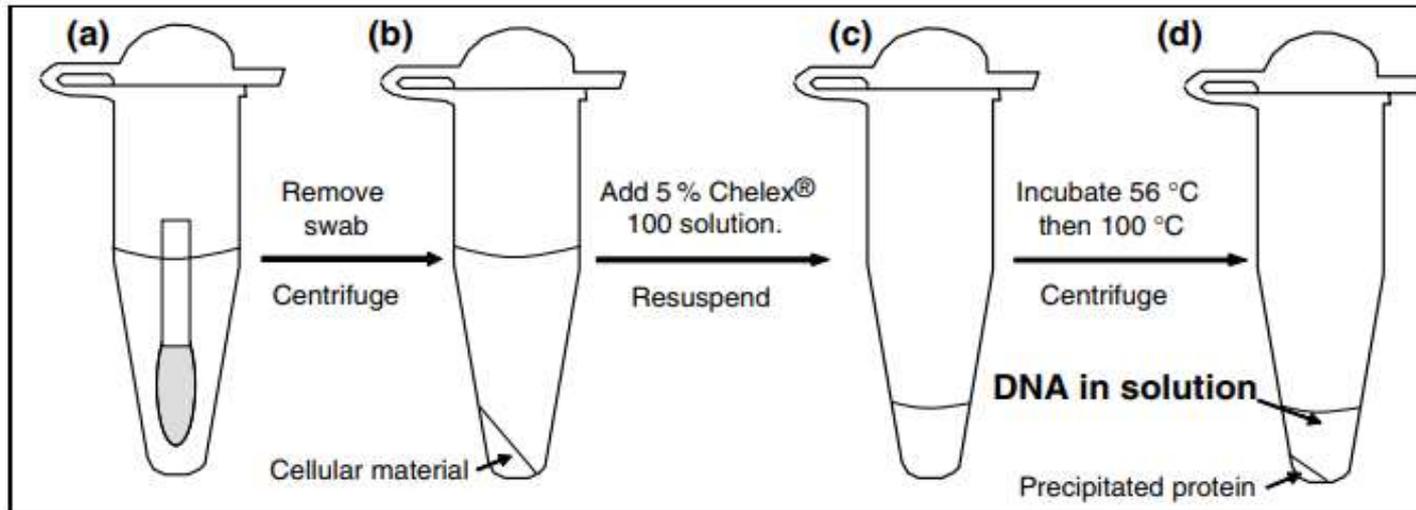


Figure 4.1 The Chelex[®] 100 extraction is quick and easy to perform. (a) The cellular material is added to 1 ml of TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0) and incubated at room temperature for 10–15 minutes. (b) The tube is centrifuged at high speed to pellet the cellular material and the supernatant is removed. (c) the pellet of cellular material is resuspended in 5 % Chelex[®], the tube is incubated at 56 °C for 15–30 minutes and then placed in a boiling water bath for 8 minutes. The tube is centrifuged at high speed for 2–3 minutes to pellet precipitated protein. (d) The supernatant contains the DNA and can be used directly in a PCR

CHELEX EXTRACTION

Pros:

Relatively fast

Can extract directly from cloth (stain)

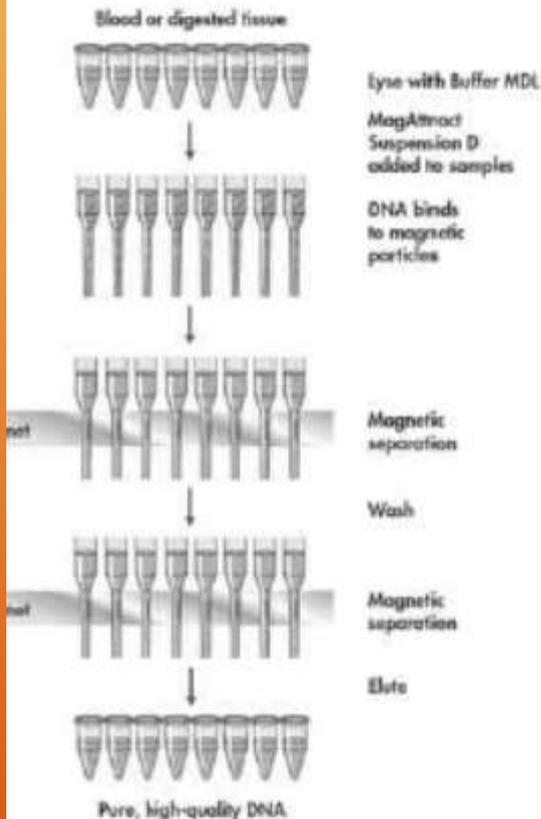
Minimizes contamination (only a single tube)

Removes PCR inhibitors

Con:

→ssDNA – not useful for RFLP

Sistema di estrazione automatizzato con utilizzo di sferette magnetiche



DNA purificato

1. Lisi delle cellule (sangue o tessuti)

2. Trasferimento in colonnine contenenti particelle magnetiche rivestite di resina di silice a cui il DNA si lega

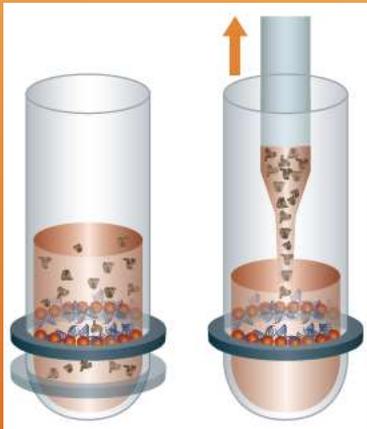
3. Aggiunta di un magnete che trattiene il DNA legato alle particelle

4. Apertura dell'estremità inferiore della colonna e aggiunta di tamponi per poter allontanare i contaminanti (mentre il DNA è trattenuto)

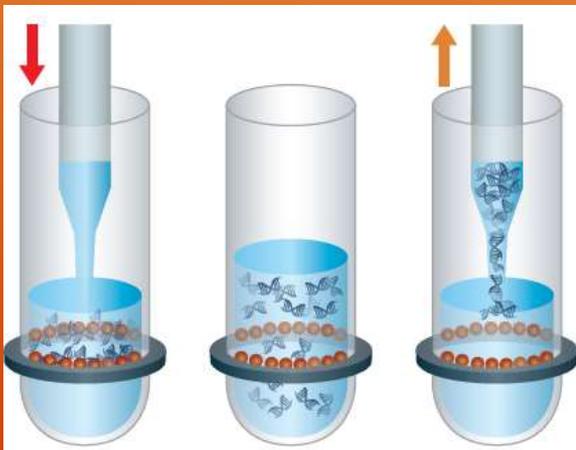
5. Allontanamento del magnete ed eluizione del DNA (purificato) dalla colonna in TE o acqua (le particelle magnetiche sono trattenute nella colonna).



FASE 1) Immobilizzazione dell'acido nucleico. Aggiunta di biglie PM al campione. Il DNA o RNA si lega selettivamente alle biglie PM, mentre le impurità rimangono nella soluzione.



FASE 2) Depurazione/Lavaggio. Un magnete cattura le microparticelle presenti nella soluzione. Una volta scartata la soluzione, le microparticelle vengono lavate in modo da acquisire acido nucleico con un elevato grado di purezza.



FASE 3) Eluizione. Il DNA o RNA purificato viene eluito in condizioni acquose. Il risultato: acidi nucleici molto puri e massima flessibilità per le applicazioni successive.

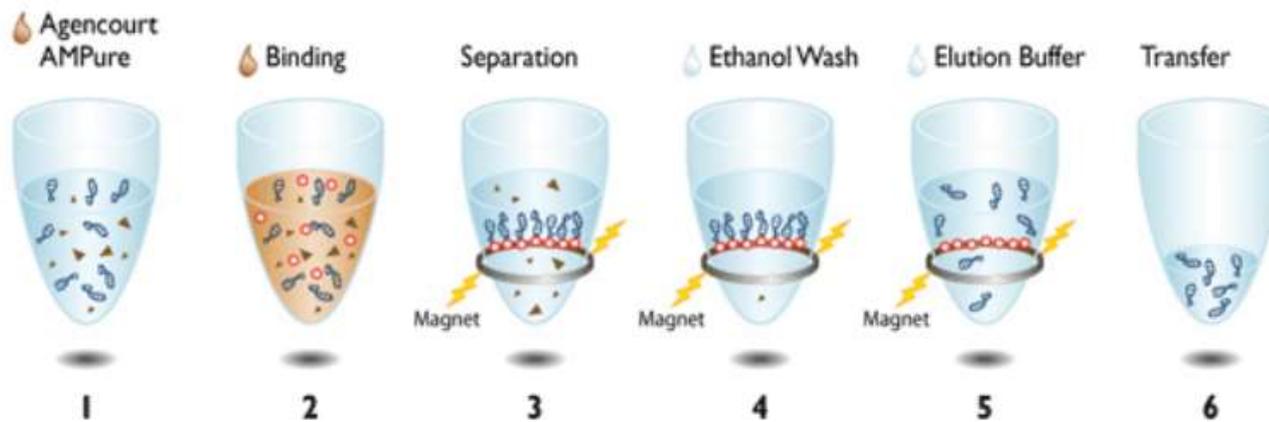


Fig. 9: 1. Reazione di PCR; 2. Legame degli ampliconi di PCR alle biglie magnetiche; 3. Separazione degli ampliconi legati alle biglie magnetiche dai contaminanti; 4. Lavaggio degli ampliconi con etanolo;

ESTRAZIONE DI DNA CON BIGLIE PM

Pro:

Procedura molto veloce e automatizzata

DNA altamente purificato

Bassa probabilità di contaminazione

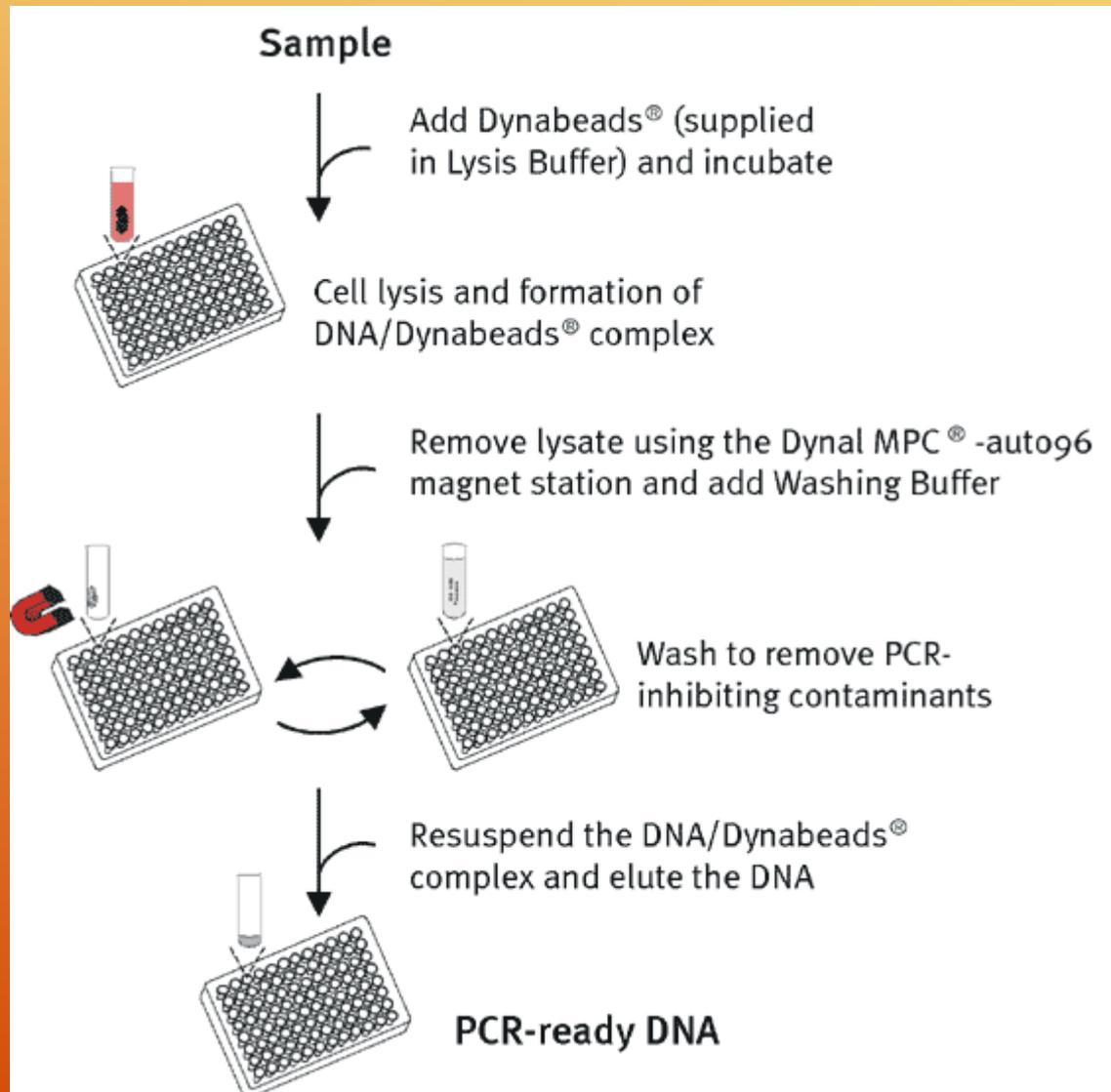
Contro:

Costoso

Resa più bassa di DNA \simeq 5-20 ng/ μ l

DNA più frammentato

Automated Extraction Platforms Utilizing Magnetic Beads



Automated Extraction Platforms Utilizing Magnetic Beads

Benefits: reduced time, limited analyst manipulation, multiple samples processed at once, and higher throughput.

Downsides: increased cost per sample, significant time necessary for validation of new technology in the laboratory.



QIAGEN QIASymphony



Promega Maxwell 16



ABI Automate

TIME REQUIRED FOR TESTING

Now typically a minimum of 4-5 hours

Collection

Extraction

Could be <5 minutes

Quantitation

Not necessary if samples are uniform in amount

Amplification

Rapid thermal cycling to-date done with singleplexes; **typically 2-3 hours**

Biggest problem is length of time for PCR (with multiplex amplification)

Genotyping

DNA separations (STR analysis) of <5 minutes have been demonstrated; **typically ~30 minutes**

Interpretation of Results

Currently performed manually in most labs; expert systems are under development to enable rapid interpretation

Database

Storage & Searching

Search could be similar to fingerprint search in terms of speed

Comparison a DNA profile to a reference or database

Conservazione del DNA



Chiamaci in Riservatezza: 800 743 021 · info@affinitydna.it · Uffici mondiali ·

[HOME](#)

[TEST DEL DNA](#)

[CHI SIAMO](#)

[FAQS](#)

[CONTATTACI](#)

DNA BANKING E CONSERVAZIONE

Il nostro servizio di banking DNA consente di conservare il campione di DNA per un massimo di 15 anni, a scopo di identificazione o per proteggere la propria proprietà.

[Home](#) / [DNA Banking e Conservazione](#)

DNA Banking e Conservazione

[ORDINA
ADESSO](#)

A soli €139 includendo 15 anni di conservazione

Il nostro servizio **DNA Banking e conservazione** consente di archiviare in sicurezza il proprio campione del DNA a soli **€139**, offrendo tranquillità a lungo termine fino a 15 anni.

Conservazione del DNA

Table 3.3. General specimen storage guidelines

Temperature in °C	Preservation method	Recommended for
+18 to +20	Room temperature	Slides, tissue blocks
0 to +4	Refrigerator	Processing fresh specimens
-0.5 to -27	Freezer	Short-term DNA stability
-27 to -40	Freezer	DNA stability
-40 to -80	Freezer	DNA/RNA stability
-80 to -130	Freezer	Recommended for urine, blood, blood fractions (plasma, serum etc)
-130 to -150	Liquid nitrogen vapour	Recommended for storage of tissues, preservation of cellular viability
-196	Liquid nitrogen liquid phase	Storage of living cells

HOW MUCH DNA CAN WE RECOVER?

A Diploid Cell: 6 pg of DNA

Sperm: 3 pg of DNA

WBC: DNA per μl of blood is 30 - 60 ng.

HOW MUCH DNA DO WE NEED?

The RFLP: minimum of 50ng of dsDNA.

This is the equivalent of approximately 2 μl of blood.

The number of intact sperm (3 pg/sperm): approximately 20,000.

HOW MUCH DNA DO WE NEED?

PCR: 1ng of dsDNA or ssDNA

→ 1/20 of 1ul of blood,

→ 350 sperm.

commercially available kits: below 1ng of DNA (100-250 pg).

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Elettroforesi su gel di agarosio
spettrofometro
Fluorimetro
Real-Time PCR



Valutazione qualitativa DNA estratto

Per poter visualizzare il DNA su un gel, altrimenti invisibile, bisogna colorarlo con un agente intercalante che emette fluorescenza quando eccitato a lunghezze d'onda ultraviolette (GelRed)

- I gel più utilizzati sono quelli di agarosio con concentrazioni 0,7 - 2% p/v
- A basse concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari alti (es. DNA genomico)
- Ad alte concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari bassi (amplificati di PCR)

Quantificazione di acidi nucleici usando l'elettroforesi in gel di Agarosio

Il gel di agarosio per le dimensioni dei pori e buona resistenza risulta particolarmente adatto per l'elettroforesi sia di DNA, che di molecole proteiche. **La dimensione dei pori di un gel di agarosio all'1% è stato stimato da 100 nm a 200-500 nm.**

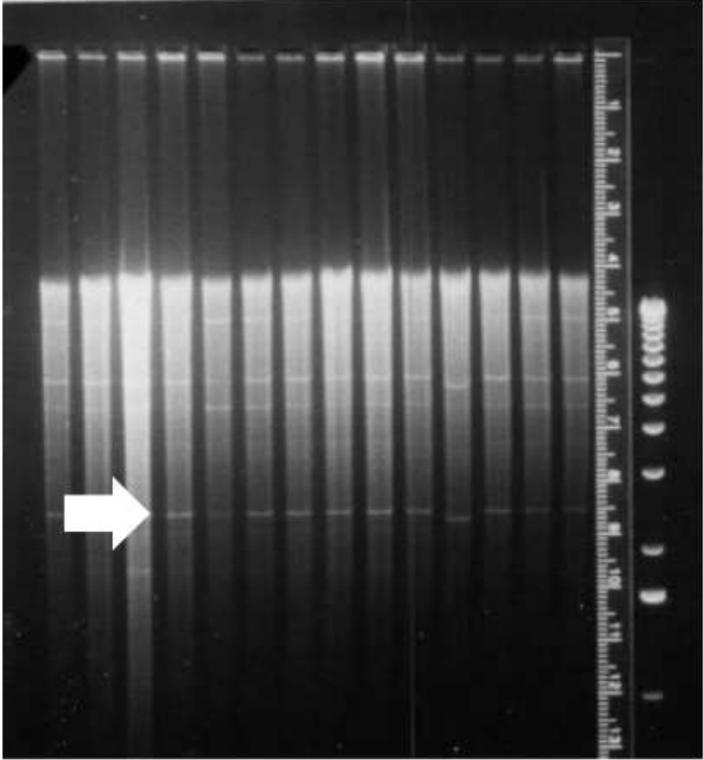
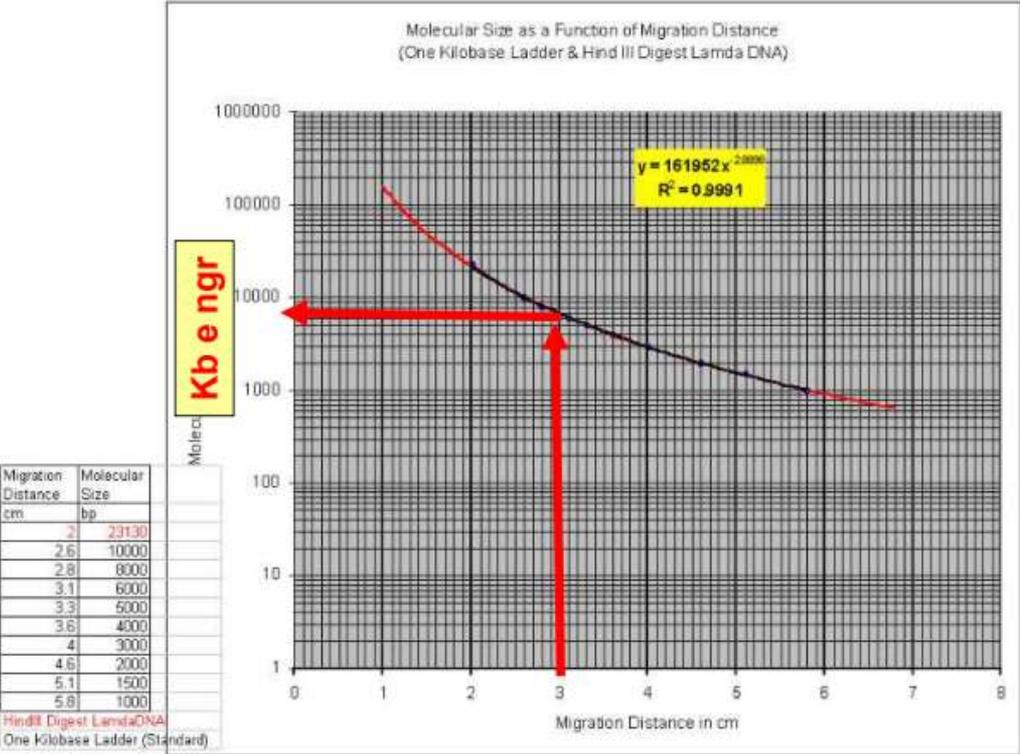
Gel a bassa concentrazione (0.1 - 0.2%) sono fragili e quindi più difficili da maneggiare.

Il gel di agarosio ha un potere di risoluzione inferiore rispetto gel di poliacrilammide per il DNA, ma presenta una gamma più ampia di separazione, ed è quindi usato **per frammenti di DNA di dimensioni che possono variare da 50-20.000 bp**. Il limite superiore di risoluzione è di circa 750 kb, ma la risoluzione di oltre 6 Mb è possibile usando *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE).

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments

Quantificazione di DNA usando gel di Agarosio



QUANTIFICAZIONE AL NANODROP

La spettrofotometria è una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa che permette il riconoscimento e la quantificazione di una sostanza, in base al suo spettro di assorbimento della luce.

La lunghezza d'onda (λ) usata dallo spettrofotometro utilizzata per la misura della quantità di DNA è di 260 nm (Densità Ottica, OD).

DO=1 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ di dsDNA.

Rapporto tra le letture a 260 nm/280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) → stima della purezza degli acidi nucleici.

QUANTIFICAZIONE AL NANODROP

E' uno spettrofotometro che ci permette di quantificare dei campioni di diversa natura, utilizzando dei microvolumi, (no classiche cuvette). E' composto da una parte strumentale e da un software installato in un computer.

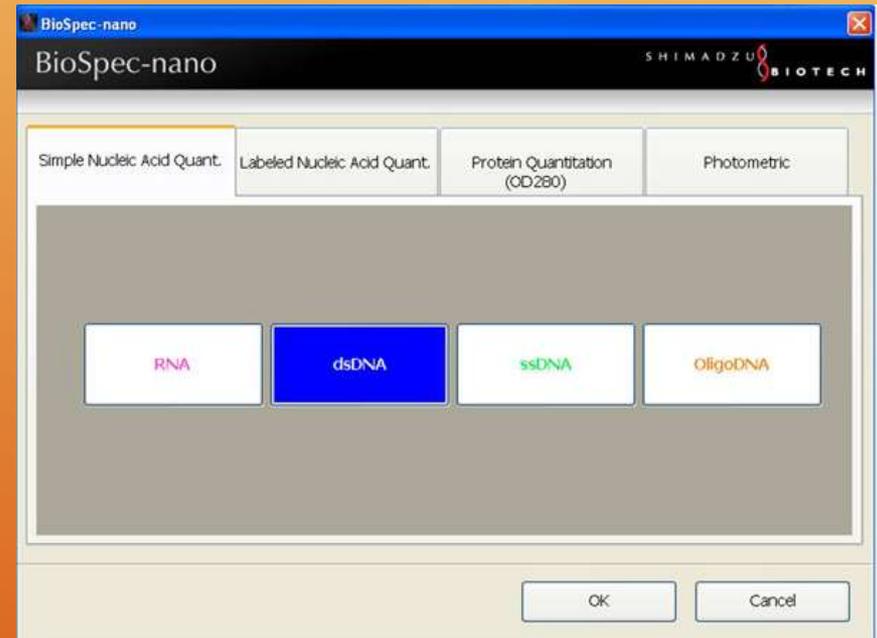
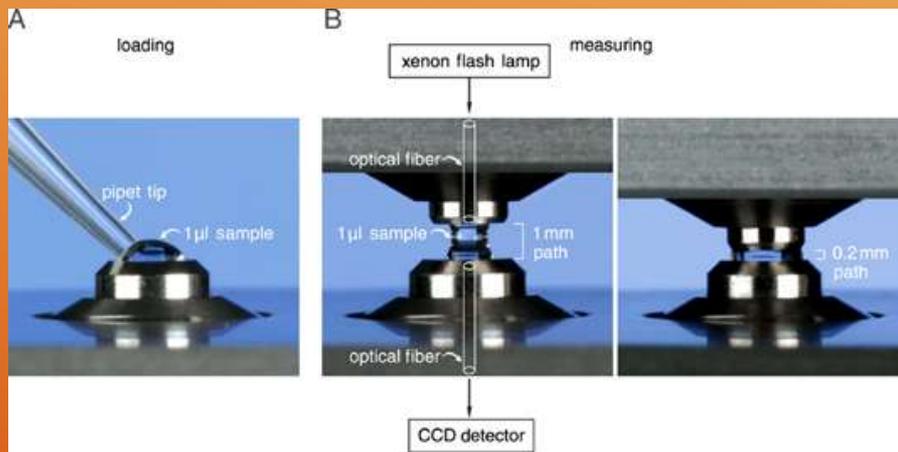


Figura 1. Analita finestra di selezione per la quantificazione del DNA doppio filamento

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Spettrofotometria (assorbanza a 260nm)

Pure DNA 260/280: 1.8 – 2.0

< 1.8:

Too little DNA compared to other components of the solution; presence of organic contaminants: proteins and phenol; glycogen - **absorb at 280 nm**.

> 2.0:

High share of RNA.

Pure DNA 260/230: 2.0 – 2.2

<2.0:

Salt contamination, humic acids, peptides, aromatic compounds, polyphenols, urea, guanidine, thiocyanates (latter three are common kit components) – **absorb at 230 nm**.

>2.2:

High share of RNA, very high share of phenol, **high turbidity**, dirty instrument, wrong blank.

QUANTIFICAZIONE AL NANODROP

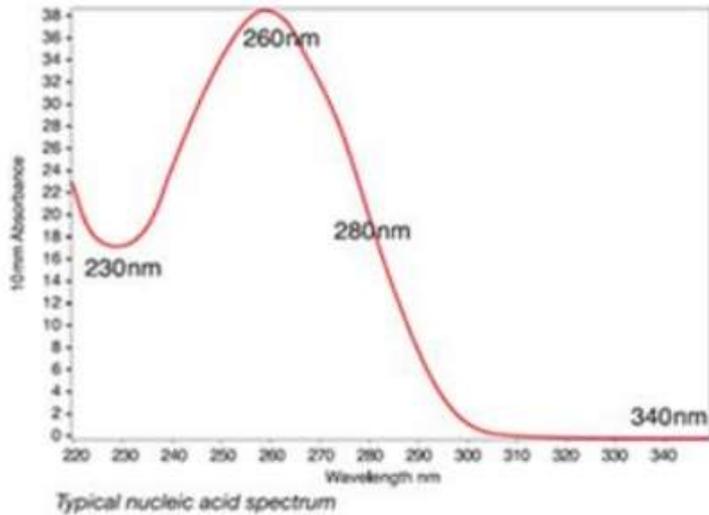
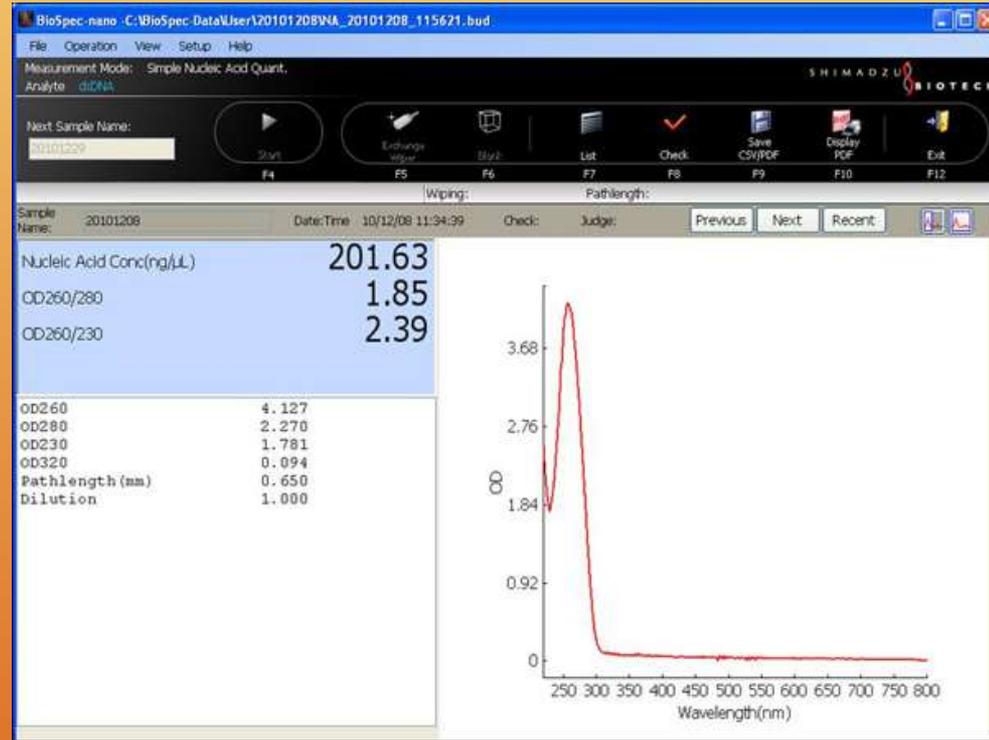


Fig. 5.1: Spettro tipico degli acidi nucleici.



La quantità di luce assorbita è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente.

Conoscendo la lunghezza percorsa dalla luce (1mm)

Table 1. Characterization of extracted DNA from various sources

S. No.	Samples	OD value	Concentration of DNA ($\mu\text{g/ml}$)	A260/A280
1.	Bacteria	0.562	2,8	1.81
2.	Fungi	0.057	2.7	1.58
3.	Blood	0.066	3.6	1.88
4.	Fish tissue	0.632	3.3	1.59
5.	Onion	0.083	5.3	1.92

QUANTIFICATION OF DNA/RNA

- ▶ Use a fluorescent method – Qubit or picoGreen
 - ▶ Dye binds specifically to dsDNA or RNA
 - ▶ In many cases measure both DNA and RNA by Qubit
- ▶ Requires ~2uL sample

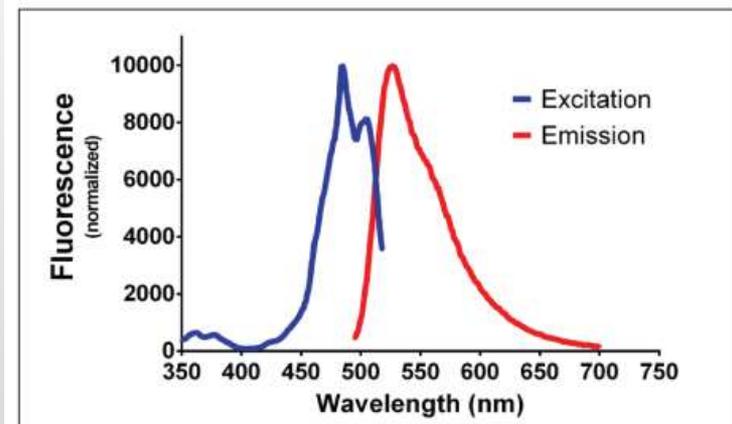


Figure 1. Fluorescent excitation and emission spectrum of dsDNA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stained with PicoGreen reagent. Data was normalized such that maximum value was 10,000 RFUs.

DNA QUALITY REQUIREMENTS



Some DNA left in the well

Sharp band of 20+kb

No sign of proteins

No smear of degraded DNA

No sign of RNA



NanoDrop:

$260/280 = 1.8 - 2.0$

$260/230 = 2.0 - 2.2$

Qubit or Picogreen:

10 kb insert libraries: 3-5 ug

20 kb insert libraries: 10-20 ug

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Apparecchio Real-time PCR



Apparecchio Real-time PCR

Apparecchio Real-time PCR

Caratteristiche

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantificazione simultanea del DNA. Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA a doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real-time è combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA (complementary DNA) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA

Potenzialità

Con questa tecnica è possibile, ad esempio, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa

INIBITORI DELLA PCR

Table 4 Examples of PCR inhibitors reported in the literature and methods to minimize inhibition

Inhibitors	Description and inhibitory concentration for PCR	Methods to minimize inhibition
CTAB	$\geq 0.005\%$ (w/v) [49, 51]; 0.01% [47]	70% ethanol wash
EDTA	≥ 0.5 mM [49, 51]; 1 mM [47]	Reduce the concentration of EDTA to 0.1 mM in the TE buffer or simply use Tris-HCl (10 mM) to bring DNA in solution. DNA can also be brought in pure water (but the DNA cannot be stored for long-term use)
Ethanol	$>1\%$ (v/v) [49]	Dry pellet and resuspend
Fat		Lipase or hexane treatment and chloroform extraction [14]
Isopropanol	$>1\%$ (v/v) [49]	Dry pellet and resuspend [14]
Phenol	$>2\%$ (v/v, [49]; $>0.2\%$ [51] Chlorogenic acid—plant phenol (0.24–0.36 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)—inhibited PCR in potato [53]	Use PVP, PVP/ammonium acetate [14] Incorporation of 1.2% citric acid at the DNA extraction step neutralized the inhibitory effect of chlorogenic acid
Polysaccharides	Acidic polysaccharides such as dextran sulphate are inhibitory [14, 50] Dextran sulphate: $>0.1\%$ [51]; $\geq 0.001\%$ [30] Pectin: $>0.5\%$ [49] Xylan: $>0.0025\%$ [51]	Use CTAB buffer and chloroform extraction. Treatment with enzymes such as pectinase, cellulase, hemicellulase and α -amylase can be used to remove polysaccharides High salt precipitation
Protein	1% casein hydrolysate in PCR mixture caused inhibition [47].	Use SDS, CTAB or guanidinium buffers, proteinase K
SDS	$\geq 0.005\%$ (w/v, [49]	Wash with 70% ethanol
Sodium acetate	≥ 5 mM [49]	Wash with 70% ethanol
Sodium chloride	≥ 25 mM [49]	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification [14]

WHAT ARE THE MAIN CONTAMINANTS?



Polysaccharides
Lypopolysaccharides
Growth media residuals



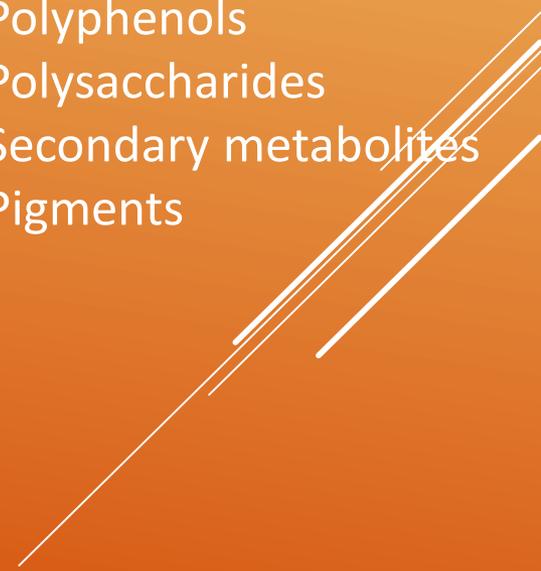
Chitin
Protein
Secondary metabolites
Pigments
Growth media residuals



Chitin
Fats
Proteins
Pigments



Polyphenols
Polysaccharides
Secondary metabolites
Pigments



INIBITORI DELLA PCR

Se si è estratto il DNA:

- dal tessuto dal quale
- dai reagenti stessi
- sostanze umiche del suolo
- Detergenti (SDS) hanno una >> azione inibente rispetto ai detergenti non ionici (Tween e il Triton X)

INIBITORI DELLA PCR

→ La presenza di inibitori possono ridurre l'efficienza e la riproducibilità della PCR (agendo sulla DNA polimerasi)

→ Diluire il DNA: aiuta a ridurre la concentrazione degli inibenti e il loro effetto negativo

→ **L'aggiunta di BSA (Bovine serum albumin) riduce l'effetto degli inibenti e facilita la reazione di PCR**