

Protocollo: L'estrazione non-distruttiva di DNA da Psille

Questo protocollo è usato per estrarre il DNA da Psille forandole con uno spillo, in modo da mantenere il campione in buono stato (esoscheletro) dopo l'estrazione. Le Psille sono state precedentemente conservate in una soluzione al 95% di etanolo e al 5% di glicerolo. Questo protocollo usa il kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue ed è stato modificato da Percy (2003) Evolution: 57,2540-56. Questo protocollo è stato creato come parte del progetto CRF Psyllid, finanziato dal governo scozzese e il progetto POnTE. Contattare Jennifer Sjölund (jennifer.sjolund@sasa.qsi.gov.uk) per informazioni.

Operazioni preliminari

- Preparare il kit di buffer in base alle istruzioni del produttore

Preparazione del campione di psilla

1. Rimuovere la psilla dalla provetta e asciugarla con della carta.
2. Posizionarla sopra un pezzo di materiale di supporto, e sotto ad uno stereomicroscopio:
3. Forare la Psilla con uno spillo da 0.1 mm in due siti, uno attraverso l'addome e l'altro nella sommità del torace, senza attraversarlo completamente.
4. Posizionarla in una provetta Eppendorf da 1.5/2 ml.

Estrazione del DNA: Giorno 1

5. Aggiungere 180 µl del buffer ATL e 20 µl di Proteinase K per ogni campione.
6. Vortexare e centrifugare brevemente.
7. Incubare overnight a 56 °C in un termo-incubatore ad agitazione lenta.

Estrazione del DNA: Giorno 2

8. Vortexare per 15 s e centrifugare brevemente.
9. Aggiungere 200 µl del buffer AL. Vortexare e centrifugare brevemente.
10. Incubare a 56 °C per 10 min.
11. Aggiungere 200 µl di Etanolo (96-100 %). Vortexare e centrifugare brevemente.
12. Pipettare il liquido in una spin column (colonnina) posta in una provetta di raccolta da 2 ml, lasciando il campione di psilla in fondo al provetta. Centrifugare a 8000 rpm (rotazioni al minuto) per 1 min.
 - Conservare il campione rimanente di psilla in una soluzione al 95% di etanolo e al 5% di glicerolo.
13. Gettare il liquido e il tubo di raccolta. Mettere la spin column in un nuovo tubo di raccolta.
14. Aggiungere 500 µl del buffer AW1. Centrifugare per 1 min a 8000 rpm.
15. Gettare il liquido e il tubo di raccolta. Mettere la spin column in un nuovo tubo di raccolta.
16. Aggiungere 500 µl del buffer AW2. Centrifugare per 3 min a 14000 rpm.
17. Gettare il liquido e il tubo di raccolta. Mettere la spin column in una provetta Eppendorf da 1.5 ml.
18. Aggiungere 100 µl del buffer AE. Incubare per 1 min a temperatura ambiente. Centrifugare per 1 min a 8000 rpm.