

DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE

-Enzimi di restrizione: **BamHI; EcoRI**

-Condizioni di digestione:

| |
|--|
| 10mM tris/HCl pH 8 5mM MgCl ₂ 100mM NaCl 1mM DTT |
|--|

Si utilizzano i 2 plasmidi estratti nell'esercitazione precedente la cui concentrazione è stata stimata

- **PER OGNI CAMPIONE** di DNA plasmidico si prelevano:

- 1)-**12µl** che si addizionano a 4µl di miscela di digestione con un **singolo** enzima di restrizione
- 2)-**12µl** che si addizionano a 4µl di miscela di digestione con **entrambi** gli enzimi di restrizione
- 3)-**12µl** che si addizionano a 4µl di H₂O e costituiranno il controllo da caricare in elettroforesi.

Bisogna sempre accertarsi di mescolare bene e di depositare **TUTTO IL VOLUME** della soluzione **SUL FONDO DELLA PROVETTA**. Se il liquido risultasse sparso nel tubo, si centrifuga la provetta eppendorf brevemente per raccogliarlo sul fondo.

Si otterranno in questo modo i seguenti 6 campioni:

| | | |
|--|--|--|
| 12µl 1°plasmide + 4µl soluzione con uno dei 2 enzimi | 12µl 1°plasmide +4µl soluzione con entrambi i 2 enzimi | 12µl 1°plasmide +4µl H ₂ O |
| 12µl 2°plasmide + 4µl soluzione con uno dei 2 enzimi | 12µl 2°plasmide +4µl soluzione con entrambi i 2 enzimi | 12µl 2°plasmide +4µl H ₂ O |

Si mettono tutti a incubare per **ALMENO 1h** a **37°C** nel termostato

Durante questa incubazione si prepara il gel elettroforetico per l'analisi

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI per elettroforesi: dopo l'incubazione, aggiungere direttamente **a ciascun campione 6µl di loading buffer** e mescolare bene, poi si preleveranno **10µl** da caricare nell'elettroforesi;

Ciò che rimane delle digestioni con ENTRAMBI gli enzimi e dei controlli negativi va contrassegnato e conservato a -20°C.

In elettroforesi si caricheranno **10µl di ciascun campione** per ciascun pozzetto, inoltre in un altro pozzetto si caricheranno **5µl di marker** di peso molecolare di riferimento.