

### ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO BATTERICO

La stessa procedura va seguita in parallelo per ciascuno dei 2 campioni costituiti entrambi da un *pellet* batterico raccolto sul fondo della provetta eppendorf.

**STEP di ri-sospensione:** il pellet batterico va risospeso in **600µl** di **soluzione H<sub>2</sub>O**

**STEP di lisi:** alla risospensione vanno addizionati **100µl** di **soluzione L**, **senza mescolare con la pipetta**, si chiude il tappo della provetta e si mescola bene per inversione almeno 6 volte.

**STEP di ri-naturazione:** si aggiungono **350µl** di **soluzione N**, **si mescola delicatamente per inversione (6volte) fino a quando la soluzione non diventa tutta gialla.**

**CENTRIFUGAZIONE:** bilanciando le provette nella centrifuga, si centrifuga per 3' al massimo della velocità (circa 13000 g).

Il sopranatante che si ottiene, nel caso non risultasse limpido lo si centrifuga ancora una volta in una provetta eppendorf nuova e se invece risulta limpido lo si trasferisce, caricando tutti i 900µl nella colonnina sistemata all'interno del suo supporto precedentemente siglato.

- si centrifuga a alla massima velocità per 30'' e poi si scarta il liquido che è passato oltre la colonnina (*flow-through*) nell'apposito recipiente, poi si rimette la colonnina nel supporto
- si caricano nella colonnina 200µl di soluzione W 1 (lavaggio 1)
- si centrifuga a alla massima velocità per 30'' poi si scarta nell'apposito recipiente il *flow-through*, poi si rimette la colonnina nel supporto
- si caricano nella colonnina 400µl di soluzione W 2 (lavaggio 2)
- si centrifuga a alla massima velocità per 30'' poi si scarta nell'apposito recipiente il *flow-through*, poi si rimette la colonnina nel supporto
- **si centrifuga per 30'' la colonnina vuota** per togliere l'eccesso di liquido
- **si trasferisce la colonnina in una provetta nuova da 1,5mL** si caricano dentro 30µl di soluzione E (eluente) e si centrifuga alla massima velocità per per 1', **conservare il flow through.**
- Si caricano nella stessa colonnina altri 30 µl di soluzione E e si centrifuga nuovamente per 1' alla massima velocità e si **conserva tutto l'eluito (circa 60 µl totali)**, contrassegnando le provette.

**CONSERVARE I CAMPIONI PER LE ESERCITAZIONI SUCCESSIVE!!!**  
contrassegnandoli bene per riuscire a riconoscerli e ritrovarli fra tutti gli altri campioni

#### PREPARAZIONE SOLUZIONE per EF su gel di agarosio

pesare sulla bilancia tecnica 1g di agarosio (sulla stagnola o sulla navicella) e trasferirlo nella bottiglia pirex

- aggiungere 100ml di tampone TAE 1x

**- AGGIUNGERE 3 $\mu$ L di GelRed**

- contrassegnare la bottiglia Pirex col nome del gruppo

**Stima della concentrazione del DNA plasmidico estratto:**

- sciogliere il gel di agarosio per elettroforesi nel forno a microonde
- preparare una capsulina petri di diametro 3,5cm segnando all'esterno sul fondo 4 quadratini di circa 5mm di lato, 2 per ciascun campione
- prelevare circa 3mL di gel sciolto e colarlo nella capsulina senza introdurre bolle in modo che si formi uno strato di 3-4mm di gel sul fondo della capsulina
- lasciare che si raffreddi e si formi il gel
- depositare nella zona delimitata dai quadratini 1 $\mu$ l e 2 $\mu$ l di DNA plasmidico eluito di ciascun campione
- lasciare asciugare bene e osservare il segnale al transilluminatore