

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 aggiungono a 4µl di miscela di digestione con un **singolo** enzima di restrizione
- 2)-12µl che si aggiungono a 4µl di miscela di digestione con **entrambi** gli enzimi di restrizione
- 3)-12µl che si aggiungono 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 ciascuna reazione di restrizione 6µl di loading buffer** e mescolare bene, poi da questa si preleveranno **10µl** da caricare nei pozzetti elettroforetici

Campioni da caricare nell'elettroforesi:

- 10 µl di plasmide #3 **SENZA ENZIMA**
- 10 µl di plasmide #5 **SENZA ENZIMA**
- 10 µl di un plasmide a scelta digerito con **UN SOLO** enzima di restrizione
- 10 µl di plasmide #3 digerito con **ENTRAMBI** gli enzimi di restrizione
- 10 µl di plasmide #5 digerito con **ENTRAMBI** gli enzimi di restrizione
- 5 µl di marker MW
- 5 µl di diluizione da PCR #3: prelevare 2 µl addizionarli a 7 µl di H₂O e 3 µl LB
- 5 µl di diluizione da PCR #5: prelevare 2 µl addizionarli a 7 µl di H₂O e 3 µl LB