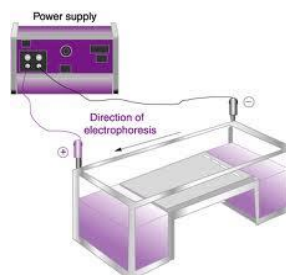
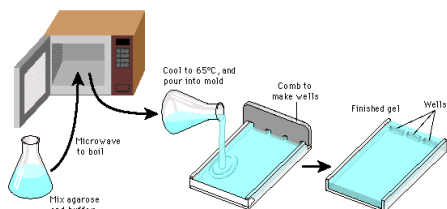


DIGESTIONE CON GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

- gel: agarosio 1% in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 5 μ L/100ml
- tampone di corsa: TAE 1x
- tampone di caricamento (*loading buffer*)
- markers* di peso molecolare



PREPARAZIONE CAMPIONI DA PCR G6PD PER ANALISI ELETTROFORETICA:

- **campioni da PCR G6PD –stampo plasmidico: 10 μ l** addizionarli a 3 μ l di *loading buffer* e caricare il tutto (**13 μ l**) in un pozzetto
- **campioni da PCR G6PD –DNA genomico: 10 μ l** addizionarli a 3 μ l di *loading buffer* e caricare il tutto (**13 μ l**) in un pozzetto
- **-IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 10 μ l** DI **MARKERS** di peso molecolare

1	2	3	4	5	6	7	8
PCR G6PD 1plasm	PCR G6PD 2plasm	MARKER MW	PCR G6PD gen	PCR G6PD gen	PCR G6PD gen	PCR G6PD gen	PCR G6PD gen

La corsa va effettuata a 120v per circa 20'

Il gel va sottoposto al transilluminatore a raggi UV per visualizzare il DNA

PURIFICAZIONE PRODOTTI PCR G6PD DA STAMPO DNA GENOMICO E PLASMIDICO

Tutto il campione rimasto dalla PCR (circa **40 μ L**) va addizionato a **200 μ L di soluzione PB**, mescolare bene e raccoglierlo sul fondo in modo da riuscire a prelevare tutti i 240 μ L con la pipetta e trasferirli sulla colonnina, facendo attenzione a **NON TOCCARE LA MATRICE**.

Centrifugare 1' a 13000 rpm e poi scartare il *flow-through*, rimettere la colonnina nel tubo appena svuotato e aggiungere **750 μ L** di soluzione di lavaggio W, centrifugare nuovamente 1' a 13000 rpm e poi scartare il *flow-through*. **Centrifugare 1' a 13000 rpm la colonnina vuota per togliere l'eccesso di liquido.**

- A questo punto si trasferisce la colonnina **in una provetta nuova da 1,5mL** col tappo contrassegnato per riconoscere il campione, vi si caricano dentro **30 μ l di acqua** (eluente), si lascia 1' sul banco e poi si centrifuga 13000rpm per 1', in modo da recuperare tutto l'eluato.

DIGESTIONE PRODOTTI PCR G6PD CON MboII

Suddividere la miscela di digestione (circa 35 μ L totali) in 7 tubi con 5 μ L ciascuno.

Prelevare **10 μ L** di ciascun campione PCR purificato e trasferirli nel rispettivo tubo contenente **i 5 μ L di miscela di digestione**. Incubare almeno 1h a 37°C.