

ESTRAZIONI DI DNA

1) ESTRAZIONE DI DNA BATTERICO (PLASMIDICO)

La stessa procedura deve essere 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 **250µl** di **buffer A** con la pipetta

STEP di lisi: alla risospensione vanno addizionati **250µl** di **soluzione B**, senza mescolare con la pipetta, si chiude il tappo della provetta e si mescola bene per inversione almeno 6 volte, poi si lascia **3'** a **temperatura ambiente** sul bancone

STEP di ri-naturazione: si aggiungono **350µl** di **soluzione C**, senza mescolare con la pipetta, si chiude il tappo della provetta e si mescola bene per inversione almeno 6 volte, poi si può centrifugare

CENTRIFUGAZIONE: bilanciando le provette nella centrifuga, si centrifuga per 10' a 13000rpm

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 gli **800µl** nella colonnina sistemata all'interno del suo supporto precedentemente siglato.

- si centrifuga a 13000rpm per 1' 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 **750µl di soluzione W** (lavaggio)
- si centrifuga a 13000rpm per 1' poi si scarta nell'apposito recipiente il *flow-through*, poi si rimette la colonnina nel supporto
- **si centrifuga per 1' la colonnina vuota per togliere l'eccesso di liquido**
- si trasferisce la colonnina **in una provetta nuova da 1,5mL** a cui è stato tagliato via il tappo, vi si caricano dentro **50µl di soluzione E** (eluente), si lascia 1' sul banco e poi si centrifuga 13000rpm per per 1', per recuperare l'eluato
- si trasferisce il campione raccolto sul fondo in una provetta col tappo contrassegnato per riconoscere il campione

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

2) ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO

La stessa procedura deve essere seguita in parallelo per ciascun componente del gruppo

-Mettere tutta la soluzione salina (5ml nel tubo falcon) in bocca, masticare a lungo le parete della guancia e poi espellere e raccogliere il tutto nello stesso tubo falcon. Trasferire 1ml in una provetta eppendorf e centrifugare 2' a 13000rpm. Controllare che si sia formato un *pellet* biancastro (ben visibile); in caso negativo eliminare il surnatante e riinserire 1ml della soluzione salina nella stessa eppendorf e ripetere la centrifuga.

-con la pipetta aspirare il sopranatante per eliminarlo, FACENDO ATTENZIONE A NON andare fino in fondo col puntale. **LASCIARE circa 50µL sopra il pellet** e risospenderlo manualmente in questo stesso volume. Poi prelevarne 20µL e trasferirli nel tubo contenente i 200µL di matrice, risospendere tutto il volume manualmente e mettere a incubare a 56°C per 5', risospendere manualmente di nuovo e re-incubare per altri 5 min.

-dopo aver nuovamente risospeso il volume, mettere a incubare nel bagno a secco a 98°C per 5' , poi risospendere manualmente e centrifugare 5' a 6000x

- prelevare **80µL del sopranatante** che verranno analizzati allo spettrofotometro per stimare la concentrazione e la qualità del campione di DNA, determinando l'assorbanza a 260 e 280nm.
- Dopo aver azzerato lo spettrofotometro con due cuvettes contenenti 1ml di acqua, questi 80µL di campione vengono addizionati direttamente in una delle due cuvettes per la lettura spettrofotometrica.