CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE -1° esercitazione a.a. 2024-25

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'eluito
- 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** e trasferirli in una nuova provetta, addizionare 920 µL di H2O, mescolare bene per inversione varie volte. Questo campione deve essere poi trasferito tutto nella cuvette per l'analisi allo spettrofotometro per stimarne la concentrazione e la qualità, senza introdurre bolle. La provetta contenente il DNA estratto e la matrice va contrassegnata per essere conservata a 4°C.

- Lo spettrofotometro viene azzerato con due cuvettes contenenti 1ml di acqua
- Una delle due cuvette viene sostituita con quella contenente il campione di DNA e si effettua la lettura **a 260 e 280nm**, prendendo nota dei **valori ottenuti che vanno riportati nella relazione**.