

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 **200 μ L** di **buffer A** con la pipetta

STEP di lisi: alla risospensione vanno addizionati **200 μ L** 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 **2'** a **temperatura ambiente** sul bancone

STEP di ri-naturazione: si aggiungono **350 μ L** 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

PREPARAZIONE DELLE SPIN COLUMNS:

caricare **500 μ L** di **soluzione D** in ogni *spin column* e centrifugare per 1' a 13000rpm e scartare nell'apposito recipiente il liquido che è passato oltre la colonnina (*flow-through*) che ora è pronta per purificare il campione

Nel caso il sopranatante ottenuto dalla centrifugazione del campione non risultasse limpido lo si centrifuga ancora una volta in una provetta eppendorf nuova e se invece risulta limpido lo si trasferisce, caricando **700 μ L** nella colonnina sistemata all'interno del suo supporto precedentemente siglato.

- si centrifuga a 13000rpm per 1' e poi si scarta il *flow-through* nell'apposito recipiente, poi si rimette la colonnina nel supporto
- si caricano nella colonnina **750 μ L** 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 **60 μ L** di **soluzione E** (eluente), si lascia 1' sul banco e poi si centrifuga 13000rpm 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

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 pareti 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 50 μ L sopra il *pellet*** e risospenderlo manualmente in questo stesso volume. Poi prelevarne 20 μ L e trasferirli nel tubo contenente i 200 μ L 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 **80 μ L del sopranatante** e trasferirli in una nuova provetta, aggiungere 920 μ L 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 conservata a 4°C.

- Lo spettrofotometro viene azzerato con due cuvette 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**.