

Protocollo per l'estrazione del DNA genomico da animale

- Prelevare pochi mg di materiale animale e porlo in una *ependorf* da 1.5ml sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione
- Omogenizzare il tessuto in presenza di azoto liquido con un pestello
- Aggiungere 300µl di Tampone di Estrazione (NaCl 10mM; Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 10mM, pH 8.0;) e 100µl di SDS 5% (Sodio Dodecil Solfato)
- Aggiungere 15 µl di Proteinasi K
- Macinare il tessuto con un pestello
- Incubare alla temperatura di 60°C per circa 30 minuti
- Preparare dei nuovi tubi *ependorf* per il passaggio successivo riportando i codici identificativi precedentemente assegnati ai propri campioni
- Centrifugare per 15 minuti a 13000 giri (rpm, *round per minute*)
- Trasferire 150µl di surnatante nella nuova *ependorf* preparata precedentemente
- Aggiungere 150µl di ammonio acetato 5M e 300µl di isopropanolo
- Miscelare invertendo le *ependorf* (5X)
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti
- Centrifugare per 10 minuti a 13000 rpm
- Eliminare il surnatante stando attenti che il *pellet* rimanga attaccato all'*ependorf*
- Lavare il *pellet* aggiungendo 500µl di etanolo 70%
- Centrifugare 5 minuti
- Buttare il surnatante e lasciare asciugare il *pellet* (attaccato all'*ependorf*) in stufa per 15 minuti
- Risospendere in 50 µl di TE + RNAsi

Protocollo PCR

Mix PCR per 1 campione di DNA estratto da pesce

| | |
|-----------------------|-------|
| Buffer 10x | 2,5 |
| Primer 1 (15pmol/ µl) | 0,4 |
| Primer 2 | 0,4 |
| Primer 3 | 0,4 |
| Primer 4 | 0,4 |
| dNTP (10mM) | 0,5 |
| H ₂ O | 17,9 |
| DNA estratto | 2 |
| Taq 5U/ µl | 0,5 |
| Totale | 25 µl |

Mix PCR per 1 campione di DNA estratto da insetti e mammiferi

| | | |
|-------------------------------------|-----|-----|
| Buffer 10x | 2,5 | |
| MIX Primer* (12,5pmol/ µl ciascuno) | 0,5 | |
| dNTP (10mM) | 0,5 | |
| H ₂ O | 19 | |
| DNA | 2 | |
| Taq 5U/ µl | | 0,5 |

Totale 25 µl

*Mix dei primer 5,6,7,8,9,10,11 e 12:

miscelare 15 µl per ciascun primer (cocentrazione iniziale di ciascun primer: 100pmol/ µl), quindi risulterà una miscela con un volume totale di 80 µl e una concentrazione finale di 12,5 pmoli/µl per ciascun primer

Condizione PCR:

94 °C 2MIN

94°C 30s

54°C 45s

72°C 45s

per 35 cicli

72°C 3min

4°C end

Primer COI barcoding (pesci)

- 1) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' (forward primer - VF2_t1)
- 2) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3' (forward primer - FishF2_t1)
- 3) 5'-CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (reverse primer - FishR2_t1)
- 4) 5'-CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA-3' (reverse primer - FR1d_t1)

Primer COI barcoding (insetti e mammiferi)

- 5) 5'-GTA AACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' (forward primer - LepF1_t1)
- 6) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG-3' (forward primer - VF1_t1)
- 7) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG-3' (forward primer - VF1d_t1)
- 8) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG-3' (forward primer - VF1i_t1)
- 9) 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3' (reverse primer - LepR1_t1)
- 10) 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA-3' (reverse primer - VR1d_t1)
- 11) 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (reverse primer - VR1_t1)
- 12) 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCAIAAICA-3' (reverse primer - VR1i_t1)

Tabella con simboli standard per i primer che contengono nucleotidi degenerati

Per esempio un primer con la sequenza "ATCCR" contiene sia ATCCA che ATCCG.

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| W = A or T | B = C or G or T |
| S = G or C | D = A or G or T |
| M = A or C | H = A or C or T |
| K = G or T | V = A or C or G |
| R = A or G | N = A or C or G or T |
| Y = C or T | |