

Protocollo per l'estrazione del DNA genomico da vegetale

- Porre un pezzo di foglia o di radice, tagliato con le forbici (da 2 a 3 cm), in una *eppendorf* da 1.5ml sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione (e del ragazzo/a)
- Omogenizzare il tessuto in presenza di azoto liquido con un pestello
- Aggiungere 300µl di Tampone di Estrazione (NaCl 2M; Tris-HCl 200mM, pH 8.0; EDTA 70mM, pH 8.0; Sodium meta-bisulfite 20mM) e 100µl di SDS 5% (Sodio Dodecil Solfato)
- Macinare il tessuto con un pestello
- Incubare in stufa alla temperatura di 60°C per circa 30 minuti
- Preparare dei nuovi tubi *eppendorf* 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 *eppendorf* preparata precedentemente
- Aggiungere 150µl di ammonio acetato 5M e 300µl di isopropanolo
- Miscelare invertendo le *eppendorf* (5X)
- Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti
- Centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm
- Buttare il surnatante stando attenti che il *pellet* rimanga attaccato all'*eppendorf*
- Lavare il *pellet* aggiungendo 500µl di etanolo 70%
- Centrifugare 5 minuti
- Buttare il surnatante e lasciare asciugare il *pellet* (attaccato all'*eppendorf*) in stufa per 15 minuti
- Risospendere in 50 µl di TE + RNAsi

Protocollo PCR DNA vegetale

Mix PCR per 1 campione di DNA estratto da vegetali

Buffer 10x	2,5
Primer F (15pmol/ µl)	0,4
Primer R1	0,2
Primer R2	0,2
dNTP (10mM)	0,5
H ₂ O	18.4
DNA	2
Taq 5U/ µl	0,45
Totale	25 µl

Primer per *rbcL* barcoding (piante)

F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGTATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' (forward primer – rbcLaf-M13)

R1 e R2) 5'-CAGGAAACAGCTATGACGTAAAATCAAGTCCACCRCG-3' (reverse primer – rbcLa-revM13)

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	