

## Colony PCR

Scegliere le colonie da testare. (3 colonie).

Sotto cappa stemperare ogni colonia in una eppendorf da 200  $\mu$ l contenente 5  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile utilizzando puntali sterili; contemporaneamente replicare la colonia in una piastra LB-Agar/Amp nuova. Nel controllo negativo (provetta numero 4), aggiungere solo H<sub>2</sub>O.

Mettere la piastra a 37 °C.

Preparare la seguente miscela di reazione per la PCR (sufficiente per 5 PCR):

10  $\mu$ l Primer FOR (25 $\mu$ M)

10  $\mu$ l Primer REV (25 $\mu$ M)

10  $\mu$ l dNTPs (2.5mM)

9.3  $\mu$ l buffer TAQ (10X)

5  $\mu$ l TAQ

30.7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O sterile

---

75  $\mu$ l

Aggiungere 15  $\mu$ l di mix ai 5  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile in cui è stata stemperata la colonia e riporre le provette nel termociclatore (si usa lo stesso programma utilizzato per la prima amplificazione).

Preparare nel frattempo un gel di agarosio allo 0.8% per l'elettroforesi dei prodotti di PCR.

Aggiungere ad ogni provetta 4  $\mu$ l di sample buffer (6X) e caricare l'intera PCR nei pozzetti; effettuare la corsa elettroforetica a 100 V 50 mA per 1 ora.