



Unione Europea

Fondo europeo agricolo
per lo sviluppo rurale:
*l'Europa investe
nelle zone rurali*



Misura 16 "Cooperazione" art. 35 del Reg. (UE) n. 1305/2013
Sottomisura 16.1 - Tipologia di Intervento 16.1.2 - "Sostegno ai GO
del PEI per l'attuazione di progetti di diffusione delle innovazioni
nell'ambito del rafforzamento dell'AKIS campano"



KASTRACK
tracking chestnut fingerprints



Preparazione del campione per lisi alcalina

Protocollo HotSHOT

Passaro S., Gentile D., De Masi L., Petriccione M., Nunziata A.

Protocollo HotSHOT

1. Trasferire **100 mg** di tessuto vegetale (*foglie o gemme*) in un tubo sterile da 1.5 ml
2. Aggiungere **100 µl** di **soluzione di estrazione*** (*100 mM NaOH*) e **macinare meccanicamente** i campioni utilizzando un puntale di plastica montato su un comune trapano da lavoro per circa **20-30 secondi** alla **velocità minima**
3. Aggiungere altri **500 µl** di **soluzione di estrazione*** (*100 mM NaOH*) a ciascun campione
4. Chiudere la provetta e **mescolare** per **1 minuto**
5. **Centrifugare** la provetta per circa **1 min** a **4.000 x g**
6. **Incubare** la provetta a **temperatura ambiente** per **1 h**
7. **Mescolare** nuovamente la provetta per circa **1 min** con l'aiuto di un vortex
8. **Centrifugare** la provetta per **5 min** a **4.000 x g**
9. Prelevare **10 µl** di **surnatante** e diluire in **90 µl** di **tampone TE**** (*10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA; pH 8.0*); eseguire poi una ulteriore diluizione utilizzando **10 µl** del campione già diluito in **150 µl** di **tampone TE**. Utilizzare questa seconda diluizione per eseguire il saggio di genotipizzazione
10. La provetta del campione in soluzione alcalina può essere conservata a **-20°C**. Anche la provetta del campione diluito può essere conservata, ma non sarà più amplificabile dopo lunghi periodi.

***Soluzione di estrazione** (*100 mM NaOH*)

Sciogliere **0.4 g** di **NaOH** in **100 ml** di **acqua bidistillata**.

****tampone TE** (*10 mM Tris-HCl; 0.1 mM EDTA; pH 8.0*)

Preparare una soluzione di EDTA 10 mM pH 8.0 sciogliendo 0.29224 g di EDTANa₂ in 80 ml di acqua bidistillata e poi portando il volume a 100 ml con altra acqua. Poi, in 80 ml di acqua distillata sciogliere 0.1576 g di Tris-HCl e aggiungere 1 ml di soluzione 10 mM di EDTA (pH 8.0). Portare a volume di 100 ml con acqua bidistillata. Il tampone è in vendita anche già pronto.