**Određivanje stabilnosti liofiliziranih mikrokapsula nakon prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a RAPD metodom**

**03.07.2023.**

- izolacija DNA (prema postupku opisanom u dokumentu **Izolacija DNA**) → uzorci prije mikroinkapsulacije (oznaka P) te nakon liofilizacije i simuliranih uvjeta GIT-a (oznaka 3) → ukupno **24 uzoraka**

**05.07.2023.**

- PCR reakcija s M13 početnicama → ukupno 25 uzoraka (24 uzoraka + negativna kontrola)

- pripremiti 1 %-tni agarozni gel:

1. gel → S, K, MB1 (P), MB1 (Ø, 3), MB1 (FOS, 3), MB1 (GOS, 3), MB2 (P), MB2 (Ø, 3), MB2 (FOS, 3), MB2 (GOS, 3), MB13 (P), MB13 (Ø, 3), MB13 (FOS, 3), MB13 (GOS, 3), MB20 (P), MB20 (Ø, 3), MB20 (FOS, 3), MB20 (GOS, 3), MC1 (P), MC1 (Ø, 3), MC1 (FOS, 3), MC1 (GOS, 3), D12 (P), D12 (Ø, 3), D12 (FOS, 3), D12 (GOS, 3)

\* oznake: S (standard), K (negativna kontrola), P (početno), 3 (nakon GIT-a)

**Reakcijska smjesa (25 µL) → 25 UZORAKA**

voda 10 µL → 850 µL

EmeraldAmp 12,5 µL → 1062,5 µL

početnica M13 0,5 µL → 42,5 µL

kalup 2 µL

- negativna kontrola ne sadrži DNA, već vodu

- PCR reakcija: početna denaturacija DNA pri 94 °C tijekom 1 min, 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C tijekom 1 min, sparivanja početnica pri 40 °C tijekom 20 s i sinteze komplementarnih lanaca 80 s pri 72 °C, a zatim 5 min završne elongacije pri 72 °C

**06.07.2023.**

- dobivene PCR produkte razdvojiti DNA elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu pri 60 V, pri čemu se kao standard korišti smjesa 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder

- prebaciti gelove u otopinu za bojanje pola sata (Diamond boja:1x TAE pufer=1:10000)

- slikati gel