**Izolacija DNA pomoću Promega Genomic Wizard kita**

Priprema otopine Rnase A**:** otopiti Rnase A u DNA Rehydration Solution do konačne koncentracije 4 mg/mL, prokuhati 10 min kako bi se uklonile Dnaze i pohraniti alikvote na -20 °C.

Protokol ispod je za prekonoćne bakterijske kulture. Osim toga, ušicom sa MRS agara pokupiti bakterije porasle iz uzoraka svakog mlijeka i nastaviti s korakom 3 donjeg protokola (resuspendirati u 480 µL 50 mM EDTA i prebaciti čitav sadržaj u epice)

- iz 1 grama kuglica izolirati DNA (uzeti onaj uzorak s kojim smo određivali preživljavanje nakon mikroinkapsulacije) pomoću Promega Genomic Wizard kita te izmjeriti koncentraciju izolirane DNA

1. Uzgojiti 5 mL prekonoćne kulture svake bakterije i prebaciti u Falconice od 15 mL
2. Centrifugirati na 13000-16000 g 2 minute i ukloniti supernatant
3. Resuspendirati talog stanica u 480 µL 50 mM EDTA i prebaciti čitav sadržaj u epice
4. Dodati 120 µL otopine lizozima (10 mg/mL), lagano pipetirati dok se ne resuspendira talog i inkubirati uzorak u vodenoj kupelji na 37 °C 30-60 min
5. Centrifugirati 2 min na 13000-16000 g i ukloniti supernatant
6. Dodati 600 µL Nuclei Lysis Solution i lagano pipetirati dok sve stanice ne budu resuspendirane
7. Inkubirati u vodenoj kupelji na 80 °C 5 min kako bi se lizirale stanice a zatim ohladiti na sobnoj temperaturi
8. Dodati 3 µL RNAse Solution staničnom lizatu i rukom okrenuti epicu 2-5 puta da se izmiješaju
9. Inkubirati na 37 °C u kupelji 15-60 min te ohladiti uzorak na sobnoj temperaturi
10. Dodati 200 µL Protein Precipitation Solution staničnom lizatu i vorteksirati na visokoj brzini 20 sekundi
11. Inkubirati uzorke na ledu 5 minuta
12. Centrifugirati na 13000-16000 g 3 minute
13. Prebaciti supernatant koji sadrži DNA u čistu epicu od 1.5 mL u koju je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature\*
14. Nježno izmiješati okretanjem epice dok ''konci'' DNA ne formiraju vidljivu masu
15. Centrifugirati 2 min na 13000-16000g
16. Pažljivo odliti supernatant i osušiti epicu na čistom apsorbirajućem papiru
17. Dodati 600 µL 70 % etanola sobne temperature i nježno okretati epicu nekoliko puta da se ispere talog DNA
18. Centrifugirati 2 min na 13000-16000 g i ukloniti etanol aspiracijom ili pipetmanom
19. Osušiti tubice na čistom apsorbirajućem papiru i ostaviti 10-15 min otvorene epice da se talog osuši na zraku
20. Dodati 100 µL DNA Rehydration Solution u epicu i rehidrirati DNA inkubacijom 1h na 65 °C u kupelji. Za to vrijeme nekoliko puta promiješati otopinu lupkanjem epice. Alternativno, DNA se može rehidrirati i inkubacijom preko noći na sobnoj temperaturi ili na 4 °C
21. Izmjeriti koncentracije DNA pomoću Biocpec-nano uređaja (Shimatzu, Japan) i pohraniti DNA na 2-8 °C

\* malo supernatanta može ostati u epici koja sadrži proteinski pelet. Bolje je ostaviti to u epici da se spriječi kontaminacija otopine DNA s istaloženim proteinima