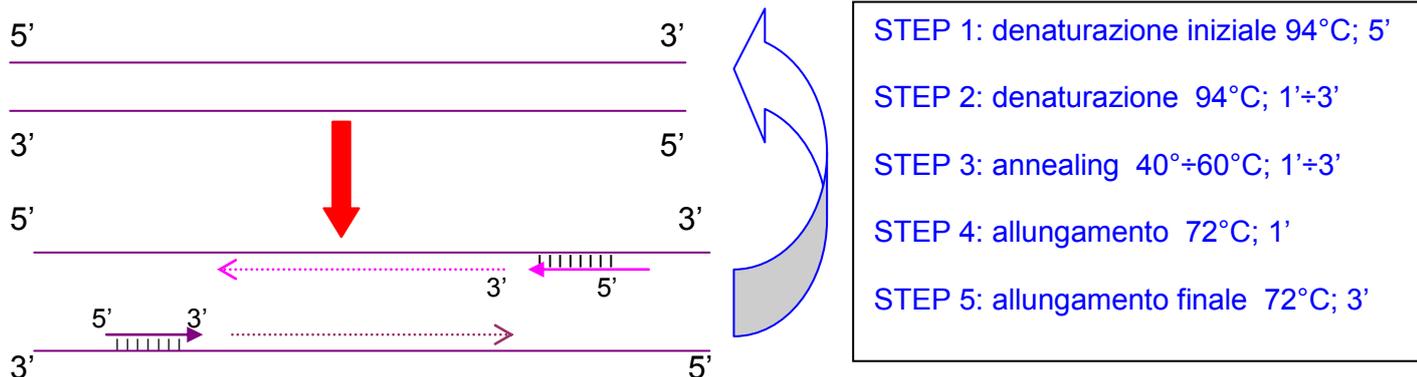


CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE -5° esercitazione

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)



ALLESTIMENTO DI UN ESPERIMENTO DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

Ogni gruppo può allestire **tre reazioni**:

una per ciascuno dei due DNA da amplificare ed una reazione di controllo

Miscela col volume e reagenti sufficienti per una singola reazione:

26µl H₂O
10µl buffer 5x Taq pol
5µl primer 5'-FW
5µl primer 3'-RE
1µl dNTPs 10mM

**PER 3
REAZIONI:**

87µl H₂O
30µl buffer 5x Taq pol
15µl primer 5'-FW
15µl primer 3'-RE
3µl dNTPs 10mM

Volume finale **50µl**

150µl da da mescolare bene,
facendo attenzione al volume
in modo da avere tutto sul fondo provetta

Alla miscela per 3 reazioni si devono ancora aggiungere:

- **6 µl Taq pol**

A questo punto si preparano altre 3 provette da **0.2ml**, (una per ciascun campione, bisogna contrassegnarle per distinguerle!) sul cui fondo si deposita **1µl di DNA stampo**. **Gli stampi saranno costituiti dai DNA plasmidici** estratti in una delle esercitazioni precedenti (plasmidi 1 e 2) oppure 1µl di H₂O (controllo negativo).

Mescolare bene nuovamente e **trasferire 50µl di miscela** in ciascuna di queste provette con il rispettivo stampo depositato sul fondo.

- Bisogna mescolare molto bene e cercare di non avere bolle, il volume di ogni campione deve essere di **50µl finali raccolti sul fondo** → conviene centrifugare brevemente i tubi, usando le provette eppendorf più grandi come adattatori per la centrifuga.

Si mettono le provettine nei pozzetti del termociclatore e si fa partire il seguente programma di amplificazione:

- 1)- 94°C; 5'
- 2)- 94°C; 30''
- 3)- 62°C; 30'
- 4)- 72°C; 40'
- 5)- 35 X
- 6)- 72°C; 3'
- 7)- 4°C ∞

