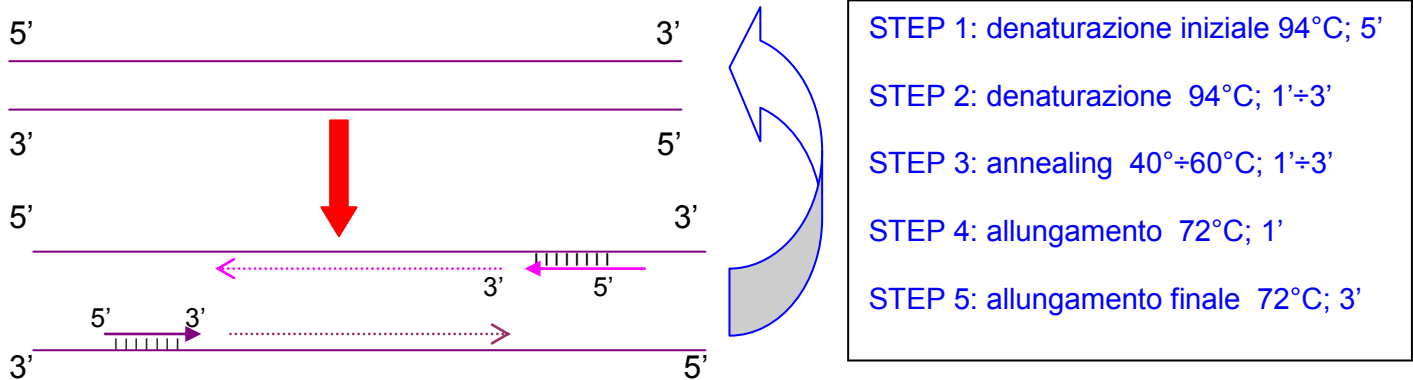


**POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**



**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:**

singola reazione:

30µl H<sub>2</sub>O  
 10µl buffer 5x Taq pol  
 5µl primer 5'-FW  
 5µl primer 3'-RE  
 1µl dNTPs 10mM

**MISCELA  
 PER 3  
 REAZIONI:**

90µl H<sub>2</sub>O  
 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

La miscela da 150µl per 3 reazioni va trasferita nel tubo da 0,5ml contenente **6µl di Taq pol depositati sul fondo** e il tutto va mescolato delicatamente per evitare la formazione di bolle. Centrifugare brevemente per togliere eventuali bolle e raccogliere tutto il liquido sul fondo.

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 H<sub>2</sub>O (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 ∞

