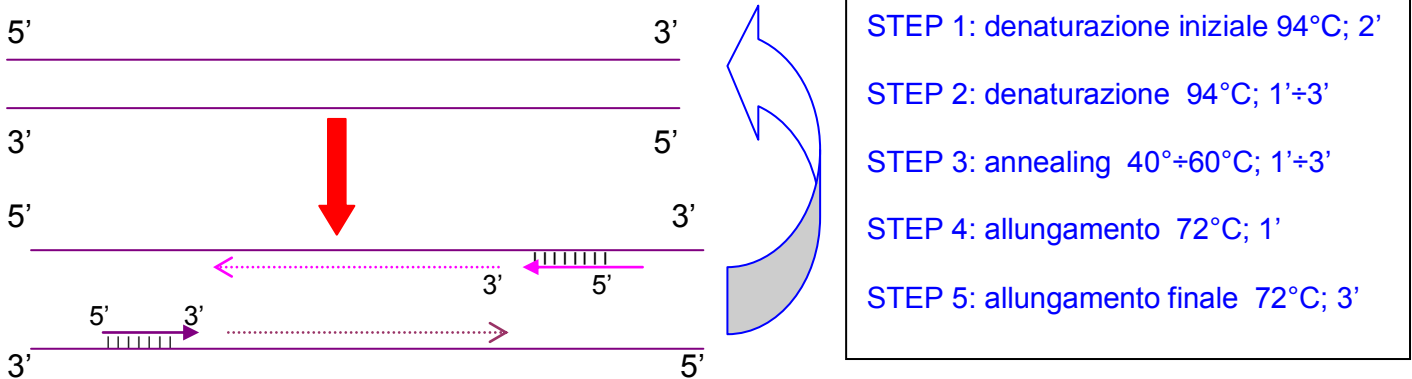


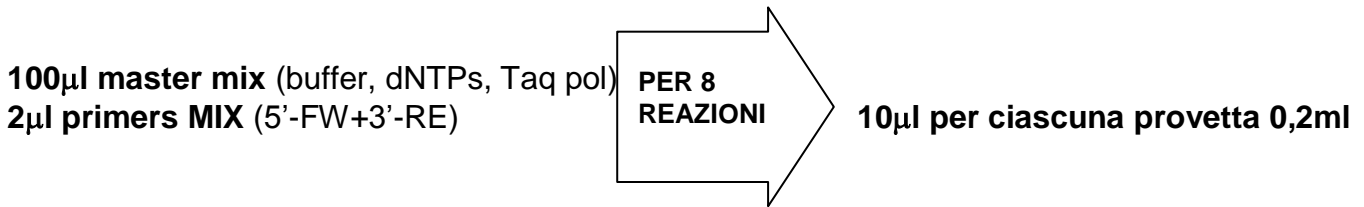
**POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**



**ALLESTIMENTO DI ESPERIMENTI DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR**

**1)- PCR Alu**

Ogni gruppo può allestire **8 reazioni: 3 controlli (CTRL) e 5 DNA genomico estratto nella 2°ES**



La master mix da 100µl per 8 reazioni va depositata nel tubo da 1,5ml contenente **2µl di primers MIX (gialla) 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 8 provette da **0.2ml**, (una per ciascun campione, bisogna contrassegnarle per distinguerle!) sul cui fondo si depositano **10µl di master mix** completa dei primers.

A ciascuna di queste provette aggiungere **10µL del rispettivo campione di DNA stampo (CTRL e campioni)** ottenendo un volume finale di **20µl**

Bisogna mescolare molto bene e cercare di non avere bolle, il volume di ogni campione deve essere di **20µl 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; 2'
  - 2)- 94°C; 1'
  - 3)- 60°C; 1'
  - 4)- 72°C; 2'
  - 5)- 40 X
  - 6)- 72°C; 10'
  - 7)- 4°C ∞
- 

**2)- PCR G6PD**

Ogni gruppo può allestire **7 reazioni: 2 controlli (CTRL) e 5 DNA da pazienti anonimi**

350µl master mix (buffer, dNTPs, Taq pol,  
5'-FW+3'-RE)

PER 7  
REAZIONI

40µl per ciascuna provetta 0,2ml

Della master mix (per 7 reazioni) vanno **depositati 40 µL sul fondo** dei tubi da 0,2ml 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.

#### **Diluizione degli stampi di DNA plasmidico**

Per ciascun campione, depositare nel fondo di una provetta eppendorf 9µl di acqua e aggiungere 1µl del rispettivo DNA plasmidico eluito.

A questo punto si aggiungono **10µl del rispettivo campione di DNA stampo (i 2 plasmidi diluiti come sopra e 5 campioni di DNA genomico)** ottenendo un volume finale di **50µl**

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; 2'
- 2)- 94°C; 1'
- 3)- 60°C; 1'
- 4)- 72°C; 2'
- 5)- 40 X
- 6)- 72°C; 10'
- 7)- 4°C ∞

