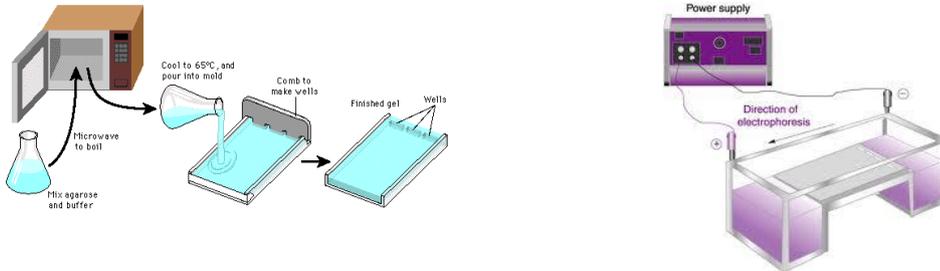


**DIGESTIONE CON GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE**

- gel agarosio **1,5%** in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 5µL/100ml
- tampone di corsa: TAE 1x
- tampone di caricamento (*loading buffer*)
- markers* di peso molecolare



**PREPARAZIONE CAMPIONI DELLE REAZIONI DI RESTRIZIONE PER ANALISI ELETTROFORETICA:**

- **campioni DNA plasmidico NON trattati (controllo) e trattati con ER PREPARATI IN PRECEDENZA:** tutti i **15µl** di ogni reazione vanno addizionarli a 3µl di *loading buffer* e caricare quasi tutto (**15µl**) in un pozzetto
  - **-IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 5µl DI MARKERS di peso molecolare**
- NB: Siccome i pozzetti del gel sono solamente 8, basta scegliere **UNO SOLO** dei 2 controlli non trattati DA CARICARE

| 1                       | 2              | 3              | 4            | 5              | 6              | 7              | 8              |
|-------------------------|----------------|----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| DNAPlaT<br>o Q<br>NO ER | DNAPlaT<br>1ER | DNAPlaQ<br>1ER | MARKER<br>MW | DNAPlaT<br>2ER | DNAPlaQ<br>2ER | DNAPlaT<br>3ER | DNAPlaQ<br>3ER |

La corsa va effettuata a 110v per circa 20'

Il gel va sottoposto al transilluminatore a raggi UV per visualizzare il DNA

**ALLESTIMENTO DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR per evidenziare il polimorfismo nelle sequenze Alu nel genoma umano**

**REAZIONI DI CONTROLLO:**

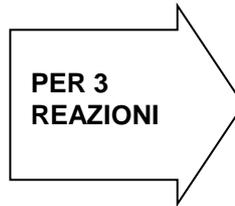
**genotipo +/+**

**genotipo +/-**

**genotipo -/-**

## Allestire 3 reazioni: 2 di controllo e 1 col proprio DNA genomico estratto nella 1°ES

35µl master mix (buffer, dNTPs, Taq pol)  
2µl primers MIX (5'-FW+3'-RE)



10µl per ogni provetta da 0,2ml

La master mix da 35µl (sufficiente per 4 reazioni) va depositata nel tubo da 1,5ml contenente i **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 3 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 ∞

