

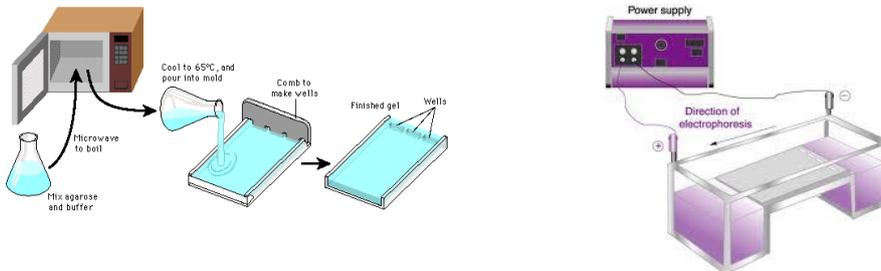
DIGESTIONE CON GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

gel agarosio 1,5% in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 5 μ L/100ml

-tampone di corsa: TAE 1x

-tampone di caricamento (*loading buffer*)

-*markers* di peso molecolare



PREPARAZIONE CAMPIONI DELLE REAZIONI DI RESTRIZIONE PER ANALISI ELETTROFORETICA:

- campione DNA plasmidico **NON** trattato (controllo) e trattati con ER **PREPARATI IN PRECEDENZA**: tutti i **10 μ l** di ogni reazione vanno addizionarli a **3 μ l** di *loading buffer* e caricare **10 μ l** in un pozzetto
- **IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 5 μ l DI MARKERS di peso molecolare**

1	2	3	4	5
DNApla NO ER	DNApla 1ER	MARKER MW	DNApla 2ER	DNApla 3ER

La corsa va effettuata a 100v 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 -/-

controllo negativo (no stampo)

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

42µl master mix (buffer, dNTPs, Taq pol)
5µl primers MIX (5'-FW+3'-RE)



15µl per ciascuna provetta 0,2ml

La master mix da 42µl (sufficiente per 3 reazioni) va depositata nel tubo da 1,5ml contenente i **5µl 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 **15µl di master mix** completa dei primers.

A ciascuna di queste provette aggiungere **5µL del rispettivo campione di DNA stampo (controlli 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 ∞

