

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

REAZIONI DI CONTROLLO:

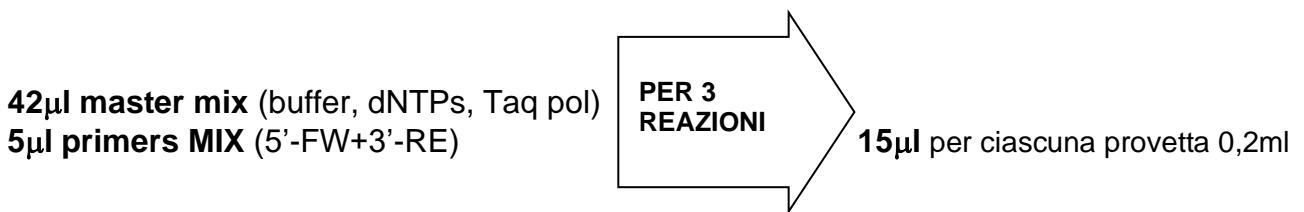
genotipo +/+

genotipo +/-

genotipo -/-

controllo negativo (no stampo)

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



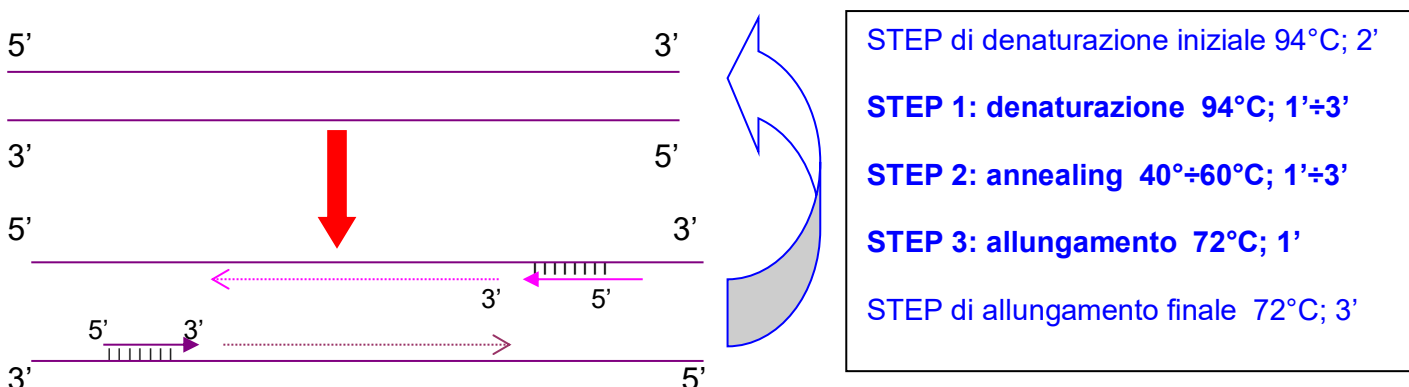
La master mix da 42µl (sufficiente per 3 reazioni) va depositata nel tubo da 1,5ml contenente i **5µl di primers MIX (gialla) depositati sul fondo** e il tutto va mescolato delicatamente per evitare la formazione di bolle. Centrifugare brevemente per togliere eventuali bolle e raccogliere tutto il liquido 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.

SCHEMA GENERALE DI UN'AMPLIFICAZIONE



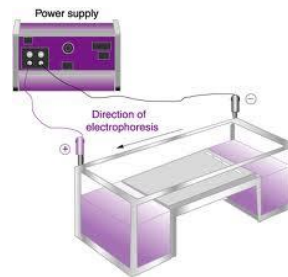
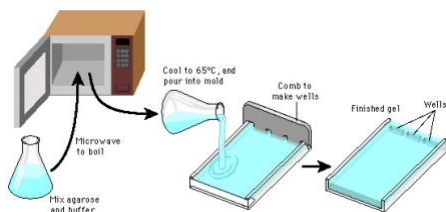
Si mettono le provettine nei pozzetti del termociclatore e si fa partire il seguente programma di amplificazione:

- 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 ∞



ANALISI DELL'AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR DELLE SEQUENZE Alu PER EVIDENZIARE I POLIMORFISMI

-gel: agarosio 1,6% in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 3μL/50ml



-tampone di corsa: TAE 1x

-tampone di caricamento (*loading buffer*)
 -*markers* di peso molecolare

PREPARAZIONE CAMPIONI DA PCR

- **campioni controllo da PCR Alu (20μl)**: da ogni reazione prelevare **5μl** e addizionarli a 10μl di *loading buffer* e caricare **5μl** per pozzetto
- **ai campioni di DNA genomico da PCR Alu (20μl)** aggiungere **10μl** di *loading buffer* e caricare **7μl** in un pozzetto e **15μl** in un altro
- **-IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 5μl DI MARKERS** di peso molecolare

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MARKER	CTRL	CTRL Alu	CTRL Alu	CTRL	PCR DNA	PCR DNA	PCR DNA	PCR DNA	
MW	negativo	-/-	+/+	Alu	Studente1	Studente1	Studente2	Studente2	
5μl	5μl	5μl	5μl	+/- 5μl	gen 7μL	gen 15μL	gen 7μL	gen 15μL	

La corsa va effettuata a 100v per circa 40' e poi il gel va sottoposto al transilluminatore a raggi UV