

## 3a) RETROTRASCRIZIONE DA RNA TOTALE

La procedura di trascrizione inversa con QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) comprende due fasi principali: eliminazione del DNA genomico e trascrizione inversa.

### MATERIALE

- Provetta contenente mix A
- Provetta contenente mix B
- H<sub>2</sub>O sterile
- Provette 1,5 ml
- Box ghiaccio

### STRUMENTAZIONE

- Pipette e puntali (20, 200)
- Microcentrifuga
- Termoblocco (42°C – 95°C) ACCENDERE a inizio esercitazione!

### PROCEDIMENTO

TEMPO STIMATO PER PROCESSARE UN CAMPIONE: 40'

- 1) Scongellare in ghiaccio il campione di RNA preparato nell'esercitazione precedente
- 2) Utilizzando i dati ottenuti dall'esercitazione precedente calcolare il volume di campione di RNA da prelevare per preparare una diluizione concentrata 250 ng/ $\mu$ l

Concentrazione campione iniziale	concentrazione campione finale	Volume campione ( $\mu$ l)	Volume H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Volume finale ( $\mu$ l)
X ng/ $\mu$ l	250 ng/ $\mu$ l			10

- 3) Preparare in una provetta da 1,5 ml (siglare con il proprio numero!) la diluizione del campione di RNA (250 ng/ $\mu$ l) prelevando prima il volume di acqua e poi quello di RNA. Spipettare delicatamente un paio di volte per mescolare il campione e centrifugare per 10s. Conservare in ghiaccio
- 4) **Eliminazione del DNA genomico** (lavorare in ghiaccio): prendere un nuovo tubino e siglarlo. Prelevare 5  $\mu$ l di **MIX A** e inserirli nel nuovo tubino. Aggiungere 2  $\mu$ l di campione di RNA diluito (250 ng/ $\mu$ l) nella stessa provetta. Volume finale reazione A = 7 $\mu$ l. Vortexare 5 s, spin 5s.
- 5) Incubare la reazione a 42°C per 2 min nel termoblocco. Al termine dell'incubazione recuperare immediatamente il campione e mettere in ghiaccio.
- 6) **Reazione di retrotrascrizione** (lavorare in ghiaccio): prelevare 3  $\mu$ l di **MIX B** e inserirli nella provetta della reazione preparata al punto precedente (Volume finale reazione B = 10 $\mu$ l) Vortexare 5 s, spin 5s.
- 7) Incubare la reazione a 42°C per 30 min nel termoblocco
- 8) **Inattivazione retrotrascrittasi**: incubare la reazione a 95°C per 3 min
- 9) Recuperare la reazione e mettere in ghiaccio. Questo campione verrà utilizzato per allestire le reazioni real-time PCR

### 3b) ALLESTIMENTO REAZIONE RT-QPCR

Questa parte di esercitazione non va discussa nella relazione

#### MATERIALE

- Master mix contenente SYBR Mix 2x e primers ACTIN fw + rev (MIX A)
- Master mix contenente SYBR Mix 2x e primers SFPQ fw + rev (MIX S)
- Master mix contenente SYBR Mix 2x e primers CCL5 fw e rev (MIX C)
- Provette da 0,5 o 0,2 ml
- Provette 1,5 ml
- qPCR adhesive plate foil (QIAGEN)
- qPCR 96-well plate, white, skirted (QIAGEN)
- Box ghiaccio
- H<sub>2</sub>O sterile

#### STRUMENTAZIONE

- Microcentrifuga
- Vortex
- Pipette e puntali (20, 200, 1000 µl)
- Real-time cycler QIAquant 96 2plex QIAGEN

#### PROCEDIMENTO

TEMPO STIMATO PER ALLESTIRE LA REAZIONE 20'

- 1) Scongellare tutti i reagenti a RT, poi tenerli in ghiaccio.
- 2) **Preparazione diluizione cDNA (1/10)**: Mescolando in una provetta da 1,5 ml 27 µl di H<sub>2</sub>O e 3 µl di cDNA preparato nell'esercitazione precedente.
- 3) **Allestimento reazioni**: Allestire 3 reazioni separate come segue prelevando 10 µl di master mix (**MM A, S, c**) e inserire in 3 tubini da 0,2 ml (siglare i tubini) (Fare attenzione quando si pipetta perché la mix potrebbe rimanere nel puntale).

	MM A	MM S	MM C
Master mix	10 µl	10 µl	10 µl
cDNA (diluizione 1/10)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
VOLUME FINALE	15 µl	15 µl	15 µl

- 4) Prelevare il volume di acqua indicato nella tabella e aggiungere negli stessi tubini facendo attenzione a non fare bolle.
- 5) Prelevare il volume indicato di cDNA diluito al punto 2 e inserirlo in ognuno dei 3 tubini contenenti la mix del punto precedente. Spipettare due volte. Verificare visivamente che tutte le provette contengano il campione sul fondo. Vortexare 5 sec e centrifugare 15 sec per raccogliere tutta la mix sul fondo della provetta.
- 6) Facendo molta attenzione trasferire le reazioni preparate al punto precedente (15 µl) nella piastra da 96 pozzetti (aiutati dai tutors). Verificare visivamente che tutti i pozzetti contengano il campione sul fondo al volume corretto.

7) Programmare il termociclatore come segue:

		T°C	Durata	cicli
STEP 1	Attivazione Polimerasi e denaturazione DNA	95	2 min	
STEP 2 Amplificazione	Denaturazione	95	5 sec	39
	Annealing/extension e lettura piastra	60	30 sec	
STEP 3	Analisi curva melting	95	5 sec	
		65	5 sec	

**Le reazioni verranno recuperate dai tutors e i dati saranno analizzati durante la prossima esercitazione**