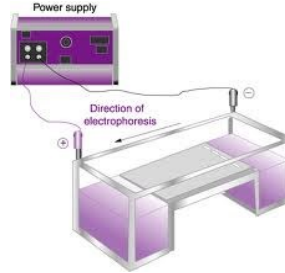
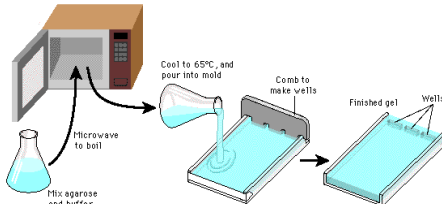


DIGESTIONE CON GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

Preparare 50mL **-gel agarosio 1,5%** in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 3 μ L/50ml

- 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 30'

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

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

**PER 3
REAZIONI**

15 μ l per ciascuna provetta 0,2ml

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

A ciascuna di queste provette aggiungere **5 μ L del rispettivo campione di DNA stampo (controlli e campioni)** ottenendo un volume finale di **20 μ l**

Bisogna mescolare molto bene e cercare di non avere bolle, il volume di ogni campione deve essere di **20 μ l 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.