

**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)

**PER 3  
REAZIONI**

**15µl** per ciascuna provetta 0,2ml

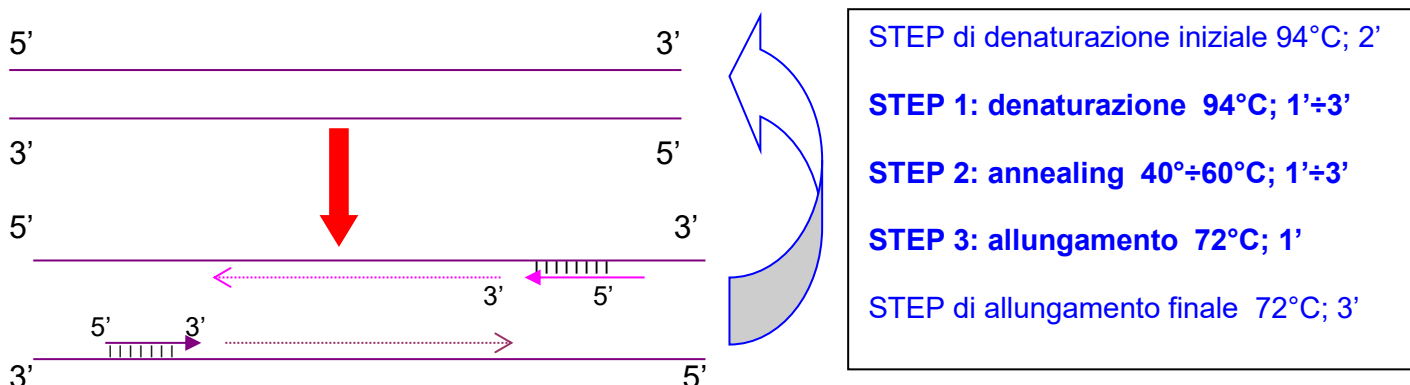
La master mix da 42µl (sufficiente per 3 reazioni) va depositata nel tubo da 1,5ml contenente i **5µl di primers MIX (gialla) depositati sul fondo** e il tutto va mescolato delicatamente per evitare la formazione di bolle. Centrifugare brevemente per togliere eventuali bolle e raccogliere tutto il liquido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

**SCHEMA GENERALE DI UN'AMPLIFICAZIONE**



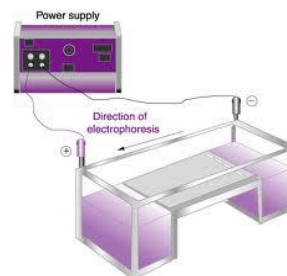
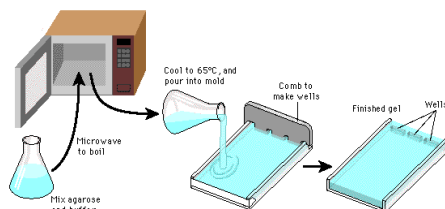
Si mettono le provettine nei pozzetti del termociclatore e si fa partire il seguente programma di amplificazione:

- 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 **3μl** 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