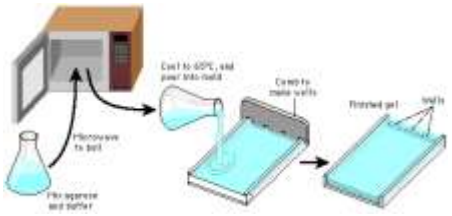
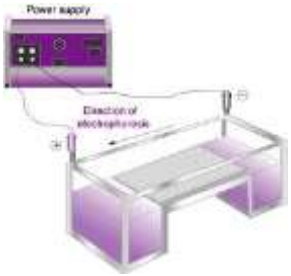
CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE - 3° esercitazione a.a. 2026-27

DIGESTIONE CON GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

Preparare 50mL **gel agarosio 1,5%** 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 DELLE REAZIONI DI RESTRIZIONE PER ANALISI ELETTROFORETICA:

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

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 addizionare **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 ∞

