

Amplificazione RealTime PCR. Estrazione delle proteine totali.

Vi serviranno:

- 1 eppendorf da 1,5 ml per la miscela di reazione del primo punto.
- 1 eppendorf da 1,5 ml per l'estrazione delle proteine (punto 2).
- 1 assay tube da 500 μ l per l'ultimo punto.

1. Amplificazione RealTime PCR

- 1.1. Ogni gruppo amplificherà il proprio cDNA (esperienza del 18.5.'18).
- 1.2. Lavorerete su un volume di reazione finale di 40 μ l, diviso in due pozzetti da 20 μ l cadauno.
Calcolare, quindi, la quantità di ogni reagente da pipettare in ogni pozzetto di reazione:

Reagente	Concentrazione	μ l / pozzetto	μ l / 2 pozzetti
MasterMix	2X	10 μ l	20 μ l
Sonda TaqMan	20X	1 μ l	2 μ l
H ₂ O	1X	7 μ l	14 μ l
cDNA	1X	2 μ l	4 μ l
-	-	TOT = 20 μl	TOT = 40 μl

- 1.3. NB: ogni gruppo allestirà due pozzetti di reazione.
- 1.4. Aliquotate ogni reagente in una eppendorf da 1,5 ml.
- 1.5. Spostare ogni reazione nei pozzetti assegnativi.
- 1.6. Sigillare con l'adesivo ottico.
- 1.7. Centrifugare brevemente.
- 1.8. Avviare la reazione di amplificazione:

Thermal Cycling Parameters:				
Parameter	UNG incubation [†]	Polymerase activation [‡]	PCR (40 cycles)	
	Hold	Hold	Denature	Anneal/extend
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time (mm:ss)	02:00 DISATTIVAZIONE UNG	10:00	00:15	01:00

[†] Required for optimal UNG activity. If using TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG, this step is not necessary.

[‡] Required to activate the DNA Polymerase.

PIASTRA

OTTICA

apparecchio
le sonde e
amplifica
MANCA 72° perché

STRUMENTO VELOCE

SCALDA IL
TAPPO

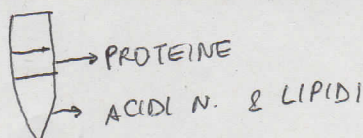
- 1.9. Attendere il completamento ed analizzare i dati raccolti.

2. Estrazione delle proteine

- 2.1. Risospendere il pellet cellulare in 100 μ l di RIPA Buffer addizionato di inibitori di proteasi.
Calcolarne la diluizione:

Reagente	Concentrazione	Quantità
RIPA Buffer	1X	96 μ l
Inibitori	25X	4 μ l
		TOT = 100 μl

RIPA → lisi e solubilizzazione



- 2.2. Incubare 45' in ghiaccio.
- 2.3. Centrifugare per 40' @ 4°C.
- 2.4. Prelevare il surnatante e spostarlo su nuova eppendorf.
- 2.5. Tenere in ghiaccio.

3. Quantificazione al Qubit 3 *FLUORIMETRO, 2. di fluoroforo diretto prop alle prot contenute*

- 3.1. In primis, preparare la diluizione del reagente di quantificazione, la *Working Solution*; vi servirà una quantità sufficiente a tre reazioni (per costruire la retta di taratura) + una reazione per gruppo. Preparerete questa diluizione una volta sola per tutti i gruppi:

Reagente	Quantità 1 dose	Quantità 10 + 3 dosi
Qubit protein reagent	1 µl	10 43 µl
Qubit protein buffer	199 µl	1990 2587 µl
-	TOT = 200 µl	TOT = 2600 µl

- 3.2. Aliquotare 190 µl di *Working Solution* in un Assay Tube da 500 µl.
- 3.3. Aggiungere al tubo 10 µl di proteine; invertire il tubo 10 volte e centrifugare brevemente.
- 3.4. Incubare la miscela per 15' al buio.
- 3.5. Leggere l'emissione al fluorimetro, annotando la concentrazione proteica ottenuta.