

PCR

In un eppendorf da 250 μ l preparare la seguente mix:

12 μ l H₂O sterile
2 μ l buffer TAQ (10X)
1 μ l MgCl₂ (50 mM)
1 μ l Primer FOR (25 μ M)
1 μ l Primer REV (25 μ M)
1 μ l dNTPs (10 mM)
1 μ l DNA plasmidico contenente l'inserto da amplificare (GPR3), circa 1000 bp.
1 μ l TAQ polimerasi

20 μ l

! Prestare attenzione a non contaminare!

Programma:

Step	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 minutes
Amplification (35 cycles)	95°C (denaturation)	30 sec
	55°C (annealing)	30 sec
	72°C (extension)	60 sec
Final extension	72°C	5 minutes

Preparazione gel di agarosio 0.8% (1 gel per 5 gruppi)

Pesare la quantità necessaria di agarosio per un gel allo 0.8%, aggiungere il TAE 1X e portare a volume.

Ricetta:

0.6 g agarosio
1.6 ml TAE 50X
78.4 ml H₂O

80 ml

Scaldare nel forno a microonde in una beuta senza fare bollire e mescolare ogni tanto per sciogliere bene l'agarosio. Aspettare qualche minuto e aggiungere **5 μ l di SyberSafe**; mescolare e versare nell'apposita vaschetta precedentemente preparata.

Il gel solidificato va posto nella vaschetta di corsa senza il pettinino e coperto con 250 ml di buffer di corsa (TAE 1X).

4 μ l di loading buffer per appesantire = 24 μ l ma se ne caricano nel pozzetto solo 20 μ l