

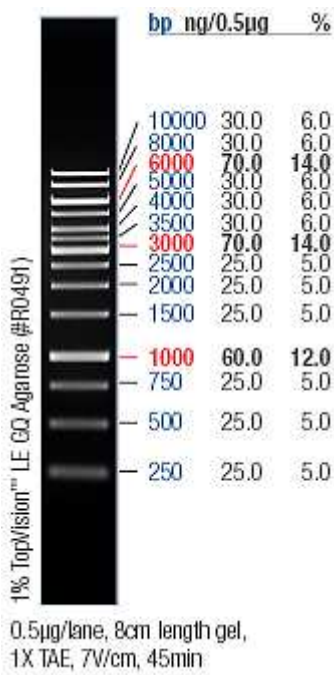
ELETTROFORESI DI PRODOTTI DI PCR

Procedura:

- Preparare il “marker”:
8 μ l di H₂O + 3 μ l di “GeneRuler 1Kb DNA Ladder” (a) (scaricare direttamente nella provetta il puntale con cui si è prelevato quest’ultimo componente).
- Preparare i campioni: 10 μ l di prodotto di PCR + 1 μ l di “6X Loading Dye” (scaricare direttamente nella provetta il puntale con cui si è prelevato quest’ultimo componente); conservare in ghiaccio i rimanenti 40 μ l di prodotto di PCR
- Caricare, sia il “marker” che i campioni, nei pozzetti del gel (prima di caricare, mescolare i contenuti, spipettando).
- Applicare la corrente elettrica ad un voltaggio costante di 100 Volts per circa 35 min.
- Colorare il gel in una vaschetta contenente 1X TAE + bromuro di etidio (200 ml di 1X TAE + 10 μ l di bromuro di etidio 10 mg/ml) per circa 10 min.
- Visualizzare il gel su un transilluminatore a luce ultravioletta.

Soluzioni:

(a): GeneRuler 1Kb DNA Ladder”



PURIFICAZIONE DI PRODOTTI DI PCR

- Aggiungere 500 µl di “Column Preparation Solution” in una colonnina contenente una membrana di gel di silice e provvista di provetta di raccolta, chiudere il tappo e centrifugare a 12.000 *g* per 1 min.
- Svuotare la provetta di raccolta.
- Aggiungere 5 volumi (200 µl) di “Binding Solution” al prodotto di PCR e vortexare per circa 5 sec.
- Trasferire il contenuto della provetta di PCR (~ 240 µl) nella colonnina provvista di provetta di raccolta, chiudere il tappo e centrifugare alla velocità massima per 1 min.
- Svuotare la provetta di raccolta.
- Aggiungere nella colonnina provvista di provetta di raccolta 500 µl di “Wash Solution”, chiudere il tappo e centrifugare alla velocità massima per 1 min.
- Svuotare la provetta di raccolta.
- Rimettere la colonnina nella provetta di raccolta, chiudere il tappo e centrifugare alla velocità massima per 2 min.
- Trasferire la colonnina in una provetta sterile (buttando la provetta di raccolta contenente il liquido passato attraverso la colonnina), aggiungere 40 µl di H₂O al centro della membrana della colonnina e incubare a temperatura ambiente per circa 1 min.
- Centrifugare alla velocità massima per 1 min., buttare la colonnina e conservare in ghiaccio il prodotto di PCR così purificato.

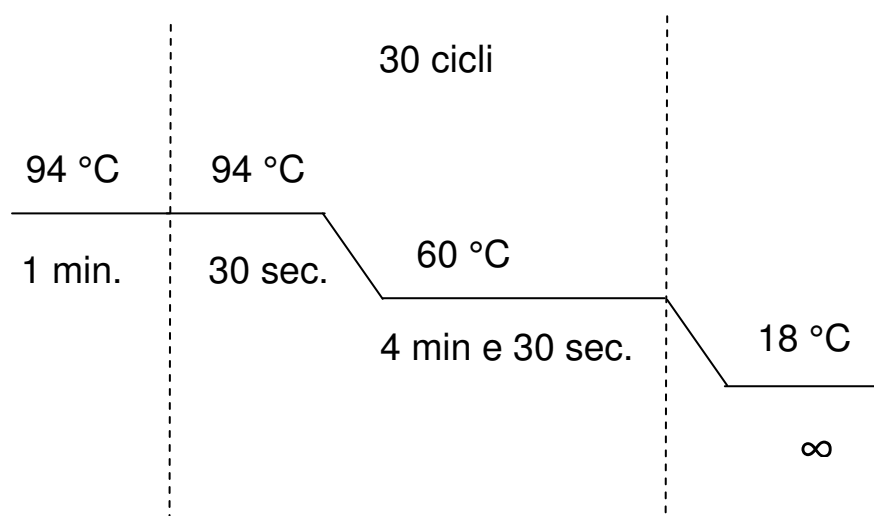
REAZIONE DI SEQUENZA

Per ogni campione preparare 3 sub-campioni, uno per ciascun primer.

Ad esempio, per il campione n° 1, preparare 3 provette PCR e indicarle con 1A (primer R536), 1B (primer R1052), 1C (primer F783).

Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
Primer (40 ng/µl)	2 µl
Prodotto di PCR purificato	4 µl
<hr/>	
Volume totale	10 µl

Condizioni:



Schema del gene e posizione dei primers:

