

Lezione XLIII-XLIV

giovedì 19-1-2012

corso di genomica

II Esercitazione gruppo II PCR sui DNA estratti

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

Esami 31- gennaio 2012

7- febbraio 2012

28 - febbraio 2012

D. Frezza

Esercitazione II

giovedì 19-1-2012

GRUPPO II

Amplificazione del DNA estratto nella esercitazione I

PCR selettiva di un frammento di 5.4 kb

PCR nested di frammenti polimorfici da 3'RR-1
da 465 bp a 287 bp

Precauzioni e controlli

Contaminazione a livello di estrazione del DNA,
- controllo bianco dei reagenti che deve restare negativo

Contaminazione della amplificazione,
- controllo bianco dei reagenti della amplificazione
- controllo positivo della amplificazione con un DNA genomico di riferimento per verificare l'efficienza dei reagenti

Protocollo di amplificazione

PCR genomica selettiva della regione regolativa 3'RR1
Long PCR 5.4 Kb Taq platinum High Fidelity

primer A2R	1.5 μ l
primer SA2.5	1.5 μ l
Mg (50 mM)	1.5 μ l
d NTPs (10 mM)	1.0 μ l
buffer 10x	5.0 μ l
taq high fidel	<u>0.3 μl</u>
	10.8
water	<u>37.2 μl</u>
tot	48.0 μ l
DNA	2.0 μ l
<u>volume finale</u>	<u>50.0 μl</u>

preparazione di una mix di reazione

Se si devono amplificare diversi campioni si prepara una soluzione di reagenti unica che comprenda anche il controllo negativo e positivo mix x 1 campione x n. campioni

primer A2R	1.5 μ l		15 μ l
primer SA2.5	1.5 μ l		15 μ l
Mg (50 mM)	1.5 μ l		15 μ l
d NTPs (10 mM)	1.0 μ l		10 μ l
buffer 10x	5.0 μ l	x 10 campioni	50 μ l
taq high fidel	<u>0.3 μl</u>		3 μ l
tot	10.8		108 μ l
water	<u>37.2 μl</u>		<u>372 μl</u>
tot	48.0 μ l		480 μ l
DNA	2.0 μ l		20 μ l
<u>volume finale</u>	<u>50.0 μl</u>	<u>dispensare</u>	50 μ l x reaz.

condizione dei cicli di amplificazione

conditions for thermo-cycler PCR reaction

94 °C 2 minutes

94 °C 30 sec

59 °C 30 sec

68 °C 5 minutes

x 10 cycles

+

94 °C 30 sec

57 °C 30 sec

67 °C 5 minutes

x 20 cycles

72 °C 10 minutes

buffer per la PCR nested

Short PCR (nested)

PCR conditions for HS1,2 A x 25 samples

primer	D3	1.5 μ l	x 25 samples	37.5 μ l
"	P3	1.5		37.5
Mg (50mM)		1.5		37.5
dNTPs		1.0		25.0
Buffer 10x		5.0		125.0
Taq Platinum		<u>0.3</u>		<u>7.5</u>
		10.8		270.0
Water		<u>37.2</u>		<u>930.0</u>
tot		48.0		1200.0 μ l
DNA		2.0		50.0
TOT		50.0 μ l		1250.0

aliquot 48 μ l for reaction and add 2 μ l of DNA

cicli per la PCR nested

Thermocycler conditions for nested PCR (short)

94° C	2 min	
94° C	30 sec	
56° C	30 sec	30 cycles
72° C	1 min	
72° C	5 min	final extenction

Amplificazione dei 4 alleli di lunghezza tra 465 e 287 bp

Corsa elettroforetica

Analisi dei polimorfismi : corsa dei DNA su gel di agarosio al 2.5%

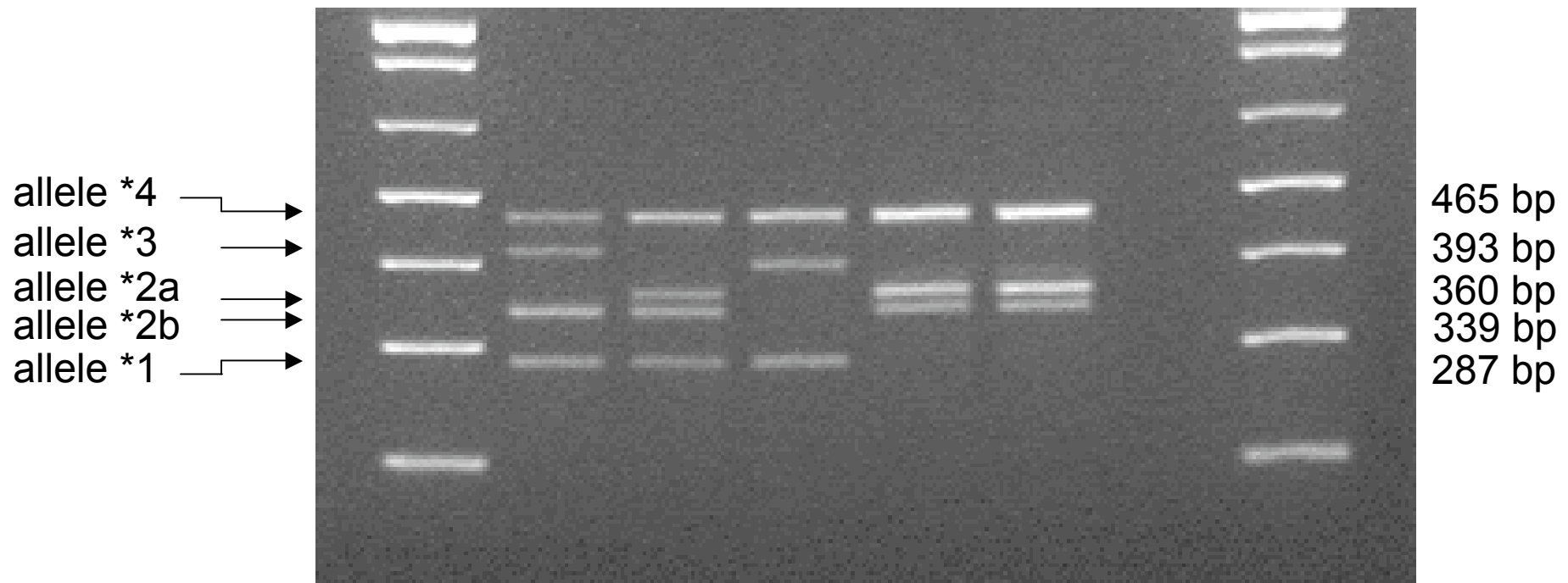
Tampone di corsa TBE

Vaschetta elettroforetica

Il DNA corre dal polo - al polo+

i due alleli *2a, *2b e *3a, *3B

amplificazioni da DNA genomico dalle due 3'RR senza selezione



avevamo visto che nel locus 3'RR-B l'allele *3 aveva l'elemento 31mer rispetto al 17mer del locus 3'RR-A adesso abbiamo (ho) visto che anche l'allele *2 esiste nelle due forme con il 17mer ed il 31mer, cambiano le consensus!