

PCR ed elettroforesi su gel di agarosio

PCR da colonia batterica

1. Preparare una provetta da PCR con la miscela dei reagenti aggiungendo:
 - a. 10 μ l di mix di PCR (contenente *Taq* DNA polimerasi, buffer salino, dNTPs),
 - b. 2 μ l di ciascun primer,
 - c. 5 μ l di acqua distillata)
2. Toccare con la punta di un puntale giallo una colonia batterica e stemperarla nella provetta di PCR. Chiudere la provetta.
3. Preparare una reazione di controllo negativo con i soli reagenti del punto 2.
4. Impostare un ciclo termico idoneo all'amplificazione. Ad esempio: 5' 95°C (denaturazione iniziale DNA e anticorpo anti-*Taq* DNA polimerasi) seguiti da 35 cicli (di 30'' 95°C, 30'' 60°C, 1' 72°C) e infine 10' 72°C. Tenere conto che la velocità media di sintesi del DNA è di circa 1 Kbp/min.

Elettroforesi su gel di agarosio

Viene preparato il gel di agarosio (50 ml, concentrazione 1%) con GelGreen™ (Biotium) (conc. 1 μ g/ml) in tampone TAE

Si sciolgono 0,5 gr di agarosio in 50 ml di tampone TAE su piastra magnetica fino a che la soluzione non è diventata trasparente e omogenea (quasi ebollizione). Si fa raffreddare fino a circa 50°C (quando si tiene in mano la beuta senza scottarsi), si leva l'ancorina e si aggiunge il bromuro di etidio (5 μ l) agitando per amalgamare bene. Si versa il gel sulla vasca per elettroforesi con il pettine e si fa solidificare. Si toglie il pettine, si aggiunge il tampone fino a coprire completamente tutto il gel e riempire i pozzetti.

1. Si caricano 10 μ l della soluzione contenente gli amplificati PCR e 5 μ l del marcatore di peso molecolare
2. Si effettua l'elettroforesi per 40' a 50V
3. Si visualizza il risultato al transilluminatore