

Laboratorio Didattico di Diagnostica Biomolecolare

Esperienza di laboratorio: diagnosi molecolare della “G6PD Deficiency”

1. Allestimento di una reazione di PCR (e controllo) a partire da cDNAteca;
2. allestimento di una digestione enzimatica sul frammento amplificato per evidenziarne un polimorfismo di restrizione;
3. analisi del prodotto di PCR e del polimorfismo di restrizione mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

1. REAZIONE DI PCR:

MATERIALE PCR

	Concentraz. Stock	Quantità per 1 campione	Mix per 3 campioni
• cDNA	(10ng/μL)	(5 μL)	-
• dNTPs	(2mM)	5 μL	15 μL
• Primer/Fw	(5 μM)	5 μL	15 μL
• Primer/Rv	(5 μM)	5 μL	15 μL
• Buffer	(5X)	10 μ	30 μL
• Taq	(0,375U/μL)	3μL	9 μL
• H2O		17 μL	51 μL
Volume finale		50 μL	add 45 μL ad ogni tubo da PCR

Reazione di PCR

98°C	2 min	}	per 25 Cicli
98°C	30 sec		
60°C	30 sec		
72°C	1 min		

2. ANALISI DI RESTRIZIONE ALLELICA

DIGESTIONE ENZIMATICA DELL'INSERTO AMPLIFICATO CON LA REAZIONE DI PCR CON L'ENZIMA DI RESTRIZIONE FokI:

Allestire in tubi eppendorf da 1,5mL (nel tubo dove è presente l'inserto amplificato per PCR)

• PCR inserto da PCR (purificato) (500 ng)	5 μL
• Buffer 10X	3 μL
• FokI 5U	5 μL
• H2O	17 μL
<hr/>	

Volume finale 30 μL

iF = inserto digerito con fokI

Incubare la reazione di digestione enzimatica per 1 h a 37°C

3. Analisi dell'inserto di DNA amplificato per PCR e della digestione enzimatica su gel d'Agarosio al 2%:

- Preparare gel d'Agarosio alla concentrazione di 2%:

Sciogliere 2 gr di Agarosio in 100 ml di Buffer da corsa TAE 1X

Add al gel di agarosio sciolto Bromuro di Etidio concentrazione finale 0.5 µg/ml (fare attenzione: cancerogeno)

Ordine di caricamento su gel di Agarosio:

Caricamento dei campioni su gel d'agarosio:

100bp (DNA Marker)= 10 µL

1= 50 µL di PCR + 10 µL di Dye 5X

B= 50 µL di PCR + 10 µL di Dye 5X

iF= 30 µL di PCR + 6 µL di Dye 5X

Correre il gel a 100 Volt (il Voltaggio cambia in base alla grandezza della cameretta)

1. CONCENTRAZIONI SOLUZIONI:

CONCENTRAZIONE soluzioni da utilizzare nella PCR:

TUBO	MATERIALE	CONCENTRAZIONE STOCK (iniziale)	CONCENTRAZIONE (finale)	Volume Singola reazione
1	cDNA	(10ng/ µL)	50ng	5 µL
N	dNTPs	(2mM)	0,2mM	5 µL
PF	Primer/Fw	(5 µM)	0,5 µM	5 µL
PR	Primer/Rv	(5 µM)	0,5 µM	5 µL
BT	Buffer	5X	1X	10 µL
T	Taq	(0,375 U/µL)	1 Unità	9 µL
H2O			Vol finale 50 µL	17 µL

2. CONCENTRAZIONE soluzioni da utilizzare nella digestione enzimatica:

TUBO	MATERIALE	CONCENTRAZIONE STOCK (iniziale)	CONCENTRAZIONE (finale)	Volume Singola reazione
i	inserto da PCR	100 ng	500 ng	5 µL
BE	Buffer Enzima di Restrizione	10X	1X	6 µL
F	FokI	2U/µL	10U/5µL	5 µL

3. CONCENTRAZIONE soluzioni da utilizzare nella corsa su gel d'AGAROSIO 2%:

TUBO	MATERIALE	CONCENTRAZIONE STOCK (iniziale)	CONCENTRAZIONE (finale)	Volume Singola reazione
i	Inserto da PCR			50 µL
D	Dye	5X	1X	10 µL

- Il Marker è già pronto alla concentrazione di 100 ng + 2 µL di DYE e 7 µL di H2O (volume finale di 10µL):

M	Marker	100ng/10µL	100 ng	10 µL
---	--------	------------	--------	-------