

21.07.2014

NOTA: Usa tutto materiale NON autoclavato (puntali, soluzioni, bottiglie con tappo blu) perché l'autoclavaggio fa rilasciare polimeri contaminanti da materiali come la plastica.

NOTA: il giorno prima dell'esperimento tirare fuori dal -20°C la matrix contenente gli oligo (plate profonda bianco latte) e metterla a -4°C per tutta la notte.

NOTA: di solito le matrix sono due, una per i forward e una per i reverse.

(Usare puntali con filtro)

Spinare gli oligonucleotidi prima di usare.

Preparare la mix con oligonucleotidi in vials (in ordine di aggiunta):

Oligonucleotide mix (per sample, 30 μl total vol.)	
2.5	DNase free water
15.0	2x annealing buffer
<i>Vortexata e spinata</i>	
5.0	200mM forward (biotinylated)
7.5	200 mM reverse

NOTA: per prelevare gli oligo dalle matrix, che sono molto profonde, usa i puntali con capillare (puntali a cucchiaino).

NOTA: trovi il 2x Annealing buffer in una falcon dal tappo blu su una delle rack presenti sul bancone (controlla il giorno prima se ce n'è abbastanza).

NOTA: ricorda che di reverse oligo ne va una quantità maggiore rispetto al forward!

Chiudi le vials

Chiudi la matrix contenente gli oligo: prendi un foglio adesivo (da PRC), poggialo sui pozzetti e chiudilo bene, rimetti la matrix in a -20°C (terzo frigo vicino al bottone rosso sul muro, parte in basso, cassetto in mezzo: però dipende da quali oligo stai usando...questi erano di NingQing).

Centrifugata alle vials

Vicino alla porta (bancone di Luan, piano 2) c'è una macchina da PCR Biorad T-100 (verde e grigia): accendila da dietro, aspetta che si accenda.

Poi clicca sullo schermo la voce "Saved Protocol" e seleziona il programma con nome "Anneal" (per essere sicura che sia il programma giusto, controlla gli step del programma della macchina con quelli riportati nel protocollo): poi imposta il volume di reazione, nel nostro caso "30 μl ".

Poi clicca su RUN e poi OK.

Nel frattempo inizia lo step successivo.

PLATE AND BEAD EQUILIBRATION

Prendi una delle box termiche vicino al lavello (ex. quella verde) e vai nella stanza 2.39: vicino alla porta c'è la macchina del ghiaccio. Prendi la paletta, apri il coperchio della macchina, riempi la box, chiudi il coperchio, rimetti la paletta sulla macchina.

NOTA: non dimenticare mai la paletta dentro la macchina del ghiaccio!

Prendi la stessa plate in cui hai fatto l'annealing, se l'hai fatto la notte prima (motivo: ci sono ancora pozzetti vuoti usabili). Altrimenti nuova piastra...

Manca il coperchio della plate con data e nome (tutti e due i coperchi).

Usa un foglietto adesivo trasparente (da PCR) e taglialo secondo i pozzetti della plate che userai.

Esempio:

IMMAGINE

Con la lametta buca il foglio in corrispondenza di tutti i pozzetti vuoti (quelli coperti dal foglio adesivo).

Prendi gli oligo (VEDI NINGQING)

Diluire con DBB gli oligo in modo da raggiungere una concentrazione di **1 pmol/μl**.

Esempio:

Hai una concentrazione 450 pmol/30 μl, allora aggiungerai 420 μl di DBB per ottenere: 450 pmol/450 μl, cioè una concentrazione di 1 pmol/μl.

Prendi delle eppendorf in cui effettuerai la diluizione: marca il tappo con sigla dell'oligo e concentrazione (1 pmol/μl), poi inserisci prima il DBB, infine aggiungi la soluzione contenente gli oligo.

Esempio:

In questo esempio prendere 6 eppendorf (6 tipi di oligo) e inserire prima i 420 μl di DBB, e poi aggiungi tutta la soluzione contenente l'oligo, cioè i 30 ml. La concentrazione finale in ogni eppendorf sarà 1 pmol/μl.

Vortexare le eppendorf con dentro gli oligo (pochi secondi).

Prendi la plate: nei pozzetti scoperti aggiungi etanolo 70% (o metanolo, ma se usi questo lavoro sotto cappa!).

Prendi la scatola di cartone bianco contenente le biglie dal frigo (terzo frigo, vicino al pulsante rosso sul muro, parte alata), aprila sul banco e ruota delicatamente la bottiglietta per risospingere il precipitato che vedi sul fondo (fallo prima di entrare in camera fredda).

NOTA: ruota, NON capovolgere o vortexare.

Prendi DBB, biglie, piastra, pipette e puntali, e vai in camera fredda.

NOTA: per aggiungere i 200 μl di DBB usare P1000 perché il DBB è un detergente e tende a fare bolle che vanno nel filtro o nel pozzetto (da evitare assolutamente!). Se usi P1000, anche se il volume sarà leggermente meno accurato, potrai evitare le bolle.

Altro trucco, da usare sia ora (con P1000) che dopo, quando rilasci la soluzione spingi fino al primo scatto 9 anche se un po' ne rimane nel puntale non è importante: ne perdere l'accuratezza del volume ma eviti le bolle). In questo caso però assicurati di usare la stessa tecnica in tutti i pozzetti (tutti i pozzetti devono essere trattati nelle medesime condizioni).

Aspira etanolo con pompa a vuoto

IMMAGINE (<http://www.google.com/patents/US7588728>)

Aggiungi in ogni pozzetto (sempre con P1000) 200 μl di DBB.

Aspira il DBB con pompa a vuoto (pochi secondi).

Aggiungi in ogni pozzetto (sempre con P1000) 200 μl di DBB.

Aspira il DBB con pompa a vuoto (pochi secondi).

Stacca la plate dalla box di aspirazione e, con un foglio di carta assorbente, asciugala bene il fondo (usa carta fino a quando non è asciutta).

----- *fine dei lavaggi*

Aggiungi in ogni pozzetto 200 µl di DBB (sempre con P1000).

Poi aggiungi 10 l di soluzione contenente beads

NOTA: Assicurati di aver disciolto il fondo prima, ruotando la bottiglia delicatamente fino a che la soluzione appare omogenea; assicurati che non ci sia precipitato tra un passaggio e l'altro e se c'è dissolvilo prima di prelevare! In questo caso usa la P10.

Aspira con pompa a vuoto

Di nuovo (2° volta), aggiungi 200 µl di DBB in ogni pozzetto (con P1000).

Aspira con pompa a vuoto

Prendi con due mani la box di aspirazione e sbattila (con moderazione) una volta sul bancone (per assicurare che tutto il liquido scenda)

Esci dalla camera fredda e vai in lab

NOTA: non lasciare più di 5 min i pozzetti asciutti (meno tempo li lasci asciutti meglio è!)

Aggiungi 150 µl di DBB (P1000)

Aggiungi 50 ml di soluzione contenente oligo (1 pmol/µl) in ogni pozzetto, seguendo lo schema della tua plate. (Scarta il puntale ogni volta)

Esempio:

Immagine

NOTA: se si formano bolle, con un puntale nuovo per ogni pozzetto, cerca di toglierle.

Incubazione di un'ora a temperatura ambiente sullo shaker

Nel frattempo prepara la NPS (nuclear protein solution): prima calcoli i componenti di questa soluzione, poi calcoli quanto PBB* (una delle componenti fare).

Esempio:

CALCOLI

NOTA: aggiungi le componenti più preziose per ultime (es. aggiungi per ultimo il nuclear extract).