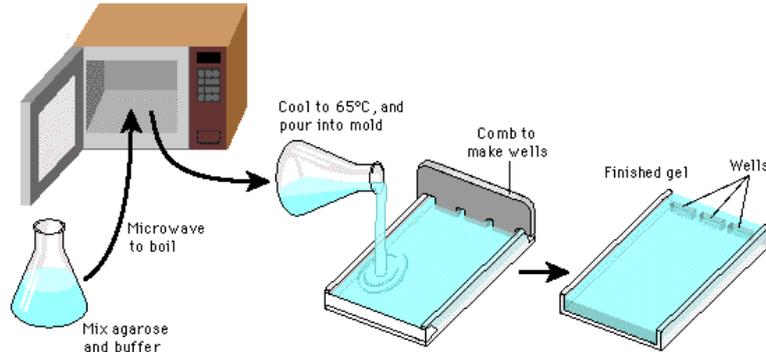


# CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE -2° esercitazione a.a. 2020-21

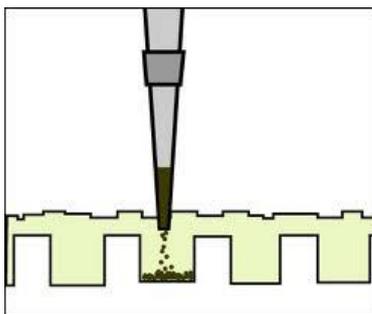
## ANALISI ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO 1%

- gel: agarosio 1% in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 5 $\mu$ L/100ml
- tampone di corsa: TAE 1x
- tampone di caricamento (*loading buffer*)
- markers* di peso molecolare

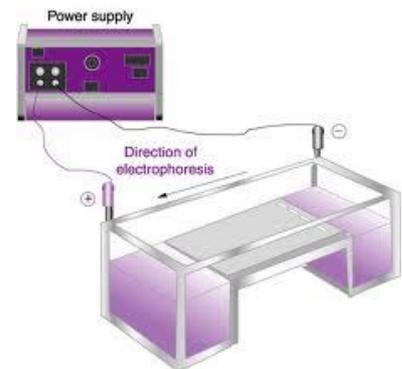
### 1) PREPARAZIONE DEL GEL



### 2) CARICAMENTO DEI CAMPIONI NEI POZZETTI



### 3) CORSA ELETTROFORETICA



- del gel sciolto nel forno a microonde, **circa 30-35ml** vanno trasferiti in un tubo falcon da 50mL in cui va fatto raffreddare fino a circa 50°C
- versare il gel nella vaschetta assemblata con le guarnizioni e col pettine, sino a che il livello del gel arrivi a **immergere circa 6-7 mm** dei denti del pettine
- lasciar raffreddare molto bene, togliere con cura pettine e guarnizioni ed immergere il gel nel tampone di corsa TAE 1X

### PREPARAZIONE CAMPIONI DEI DNA ESTRATTI

- **campioni DNA genomico 10 $\mu$ l** addizionarli a 3 $\mu$ l di *loading buffer* e da questa miscela caricare **3 $\mu$ l** in un pozzetto e **6 $\mu$ l** in un altro pozzetto
  - **campioni DNA plasmidico**: per ciascuna preparazione di plasmide prendere **10 $\mu$ l** e addizionarli a 3 $\mu$ l di *loading buffer* e da questa miscela caricare **3 $\mu$ l** in un pozzetto e **6 $\mu$ l** in un altro pozzetto
  - **-IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 5 $\mu$ l DI MARKERS** di peso molecolare
- Nb. Nel gel avanza un pozzetto che viene lasciato vuoto

1	2	3	4	5	6	7	8
MARKER MW	DNA gen 3µl	DNA gen 6µl	DNA pla1 3µl	DNA pla1 6µl	DNA pla2 3µl	DNA pla2 6µl	

La corsa va effettuata a 120v per circa 20' e poi il gel va sottoposto al transilluminatore a raggi UV per visualizzare il DNA

---

### Allestimento di reazioni di restrizione

#### ALLESTIMENTO REAZIONI DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE SUI DNA PLASMIDICI PER DISTINGUERE LA SEQUENZA MUTATA CLONATA

Si tratta di allestire 8 reazioni, da ciascuna preparazione di plasmide prelevare:

- **10µL** e trasferirli nel tubo eppendorf e aggiungere **5µL** di acqua (**CONTROLLO**), mescolare bene e accertarsi che tutto il volume rimanga nel fondo del tubo (eventualmente centrifugare); mettere a incubare a 37°C.
- **10µL** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con 1 solo ER (linearizzazione) (5µL)**, mescolare bene e accertarsi che tutto il volume rimanga nel fondo del tubo (eventualmente centrifugare); mettere a incubare a 37°C.
- **10µL** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con tutti e 2 ER (frammento clonato) (5µL)**, mescolare bene e accertarsi che tutto il volume rimanga nel fondo del tubo (eventualmente centrifugare); mettere a incubare a 37°C.
- **10µL** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con i 3 enzimi (rilevamento mutazione) (5µL)**, mescolare bene e accertarsi che tutto il volume rimanga nel fondo del tubo (eventualmente centrifugare); mettere a incubare a 37°C.