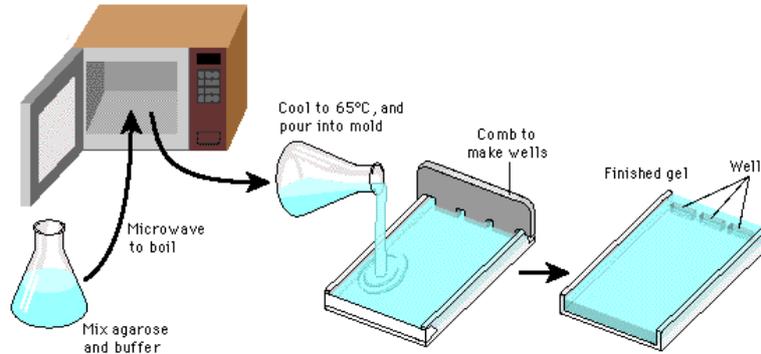


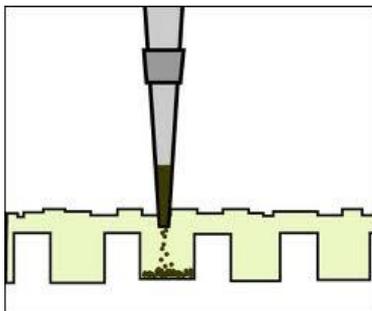
**CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE -2° esercitazione a.a. 2020-21
ANALISI ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO**

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

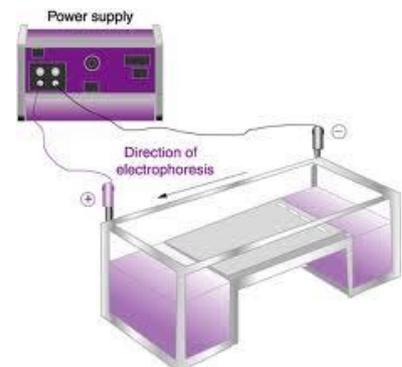
1) PREPARAZIONE DEL GEL



2) CARICAMENTO DEI CAMPIONI NEI POZZETTI



3) CORSA ELETTROFORETICA



- del gel sciolto nel forno a microonde, **circa 45-50ml** 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 7-8 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 μ l** addizionarli a 3 μ l di *loading buffer* e da questa miscela caricare **3 μ l** in un pozzetto e **6 μ l** in un altro pozzetto
 - **campioni DNA plasmidico**: SCEGLIERE UNA SOLA DELLE DUE PREPARAZIONI plasmide e prenderne **10 μ l** e addizionarli a 3 μ l di *loading buffer* e da questa miscela caricare **3 μ l** in un pozzetto e **6 μ l** in un altro pozzetto
 - **-IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI 5 μ l DI MARKERS** di peso molecolare
- N.B. Nel gel avanza un pozzetto che viene lasciato vuoto

1	2	3	4	5
MARKER MW	DNA gen 3 μ l	DNA gen 6 μ l	DNA pla 3 μ l	DNA pla 6 μ l

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 SUL DNA PLASMIDICO PER DISTINGUERE LA SEQUENZA MUTATA CLONATA

Si tratta di allestire 4 reazioni, a partire dal campione di DNA plasmidico analizzato in elettroforesi:

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