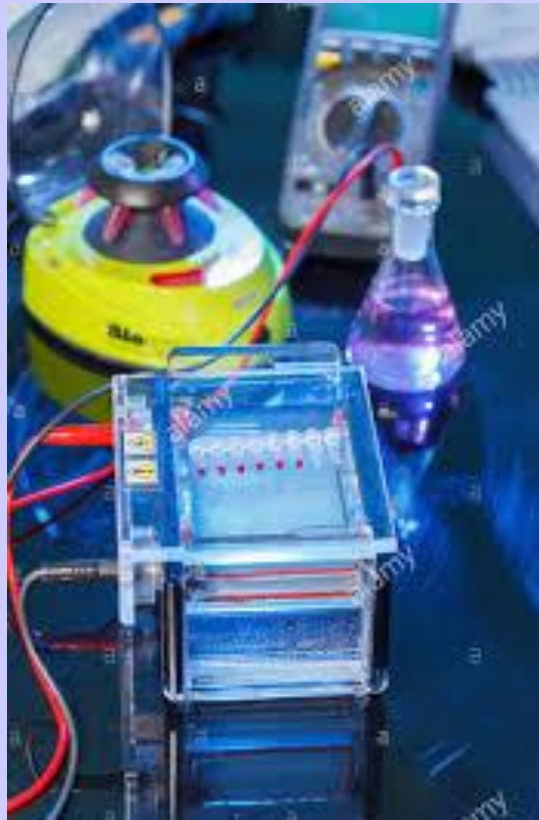
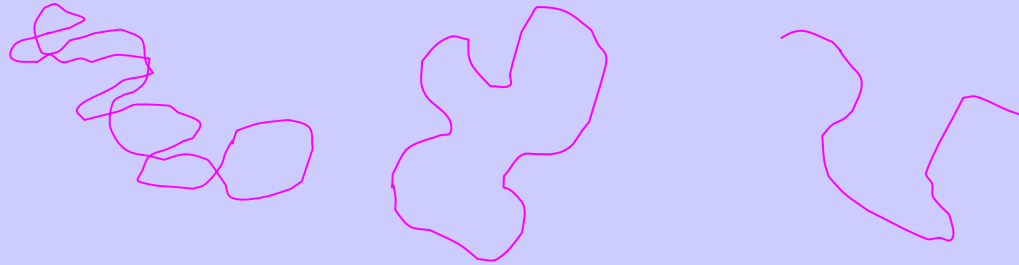


## 2° esercitazione: ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

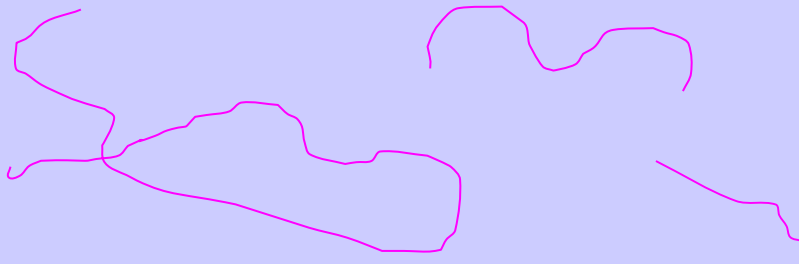


## Elettroforesi - è una tecnica analitica

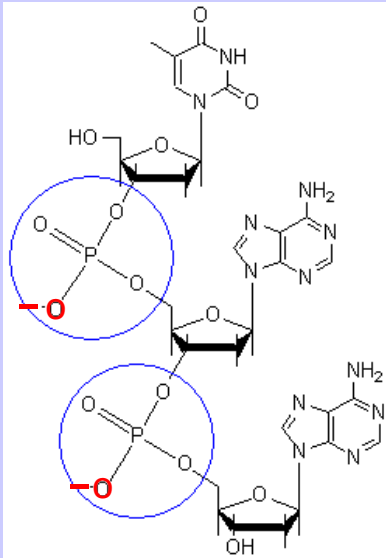
Permette di caratterizzare i campioni che sono stati preparati, stabilirne alcune caratteristiche con cui possano essere visualizzati e riconosciuti



Nel caso del DNA che si manipola in laboratorio:  
**lunghezza dei tratti di DNA A DOPPIA ELICA** ottenuti

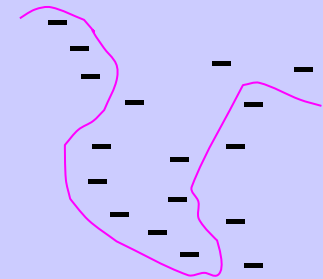


## Elettroforesi - è una tecnica analitica



Il **DNA** ha una natura **polimerica idrofilica**

È un **POLIELETTROLITA** forte  
ovvero un polimero che si  
dissocia completamente in  
soluzione a carica negativa  
(**POLIANIONE**)

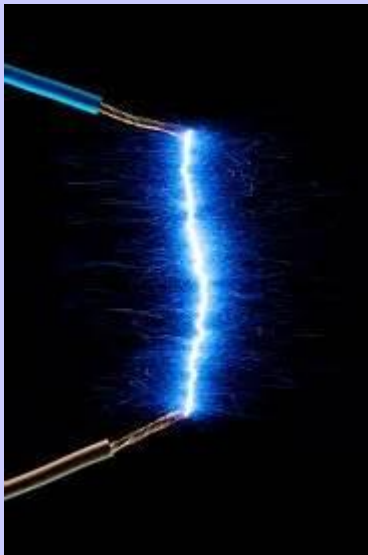


I polielettroliti presentano proprietà tipiche sia:

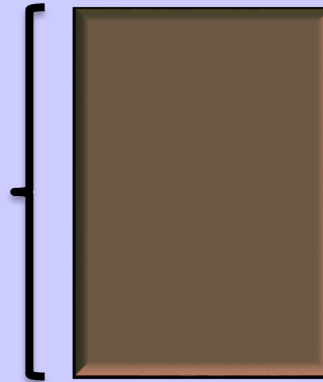
- degli elettroliti = conducono la corrente elettrica
- dei polimeri = alto peso molecolare

## Elettroforesi - è una tecnica analitica

Consiste nel far migrare attraverso un SUPPORTO SOLIDO ioni macromolecolari sfruttando un campo elettrico



$\Delta V$



Elettroforesi - è una tecnica analitica

Migrazione in ambiente liquido attraverso

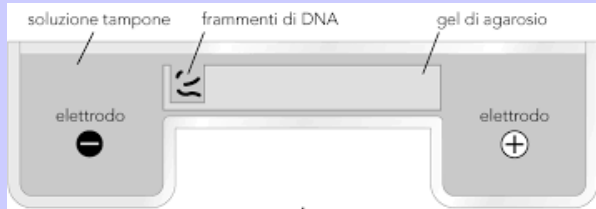
**SUPPORTO SOLIDO**

**GEL** = Il gel è un materiale bifasico costituito da un **LIQUIDO** disperso e inglobato in una fase **SOLIDA**



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

Come è fatto il sistema

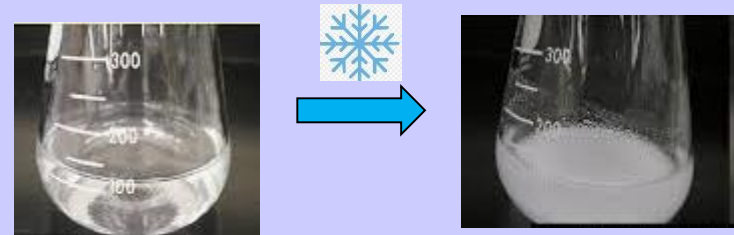


Cella elettroforetica  
Gel di *running*  
Buffer di *running*  
Alimentatore  
Loading buffer



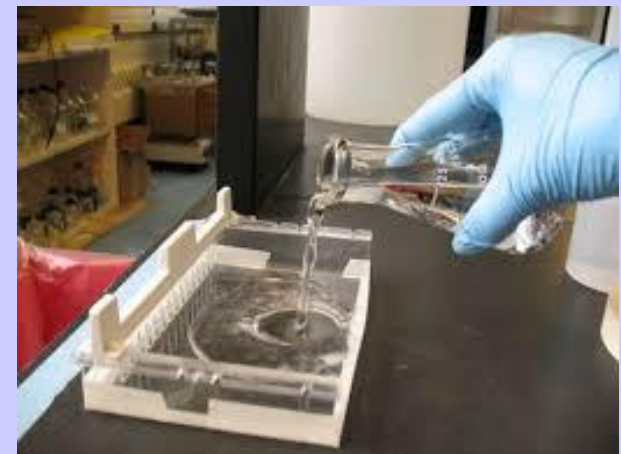
# Elettroforesi - è una tecnica analitica

Gel di *running*: separa, risolve le varie componenti



Agarosio, polvere, 0,8 - 2%  
TAE1X

buffer 40mM Tris/acetato, 1mM EDTA pH 8.3



Cella elettroforetica

TAE 1X buffer 40mM Tris/acetato, 1mM EDTA pH 8.3

è usato per preparare sia

Gel di *running*: separa, risolve le varie componenti

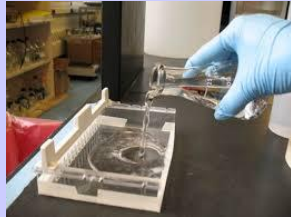
Buffer di *running*: costituisce l'ambiente in cui avviene la migrazione

Loading buffer: serve per caricare i campioni

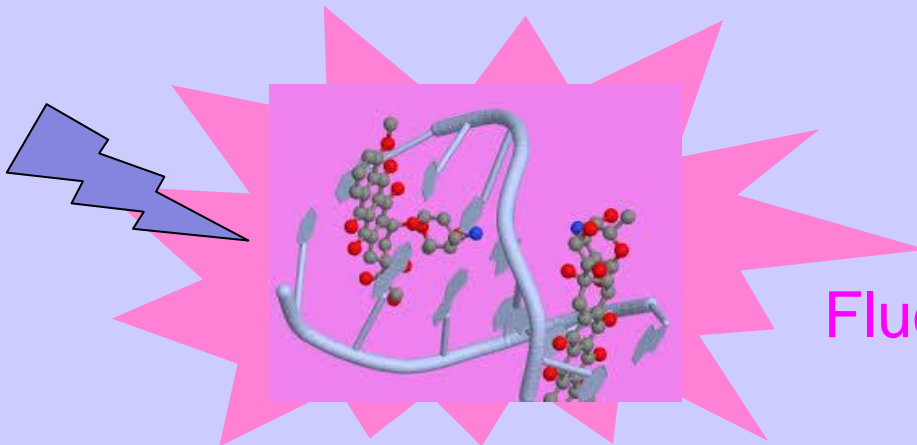
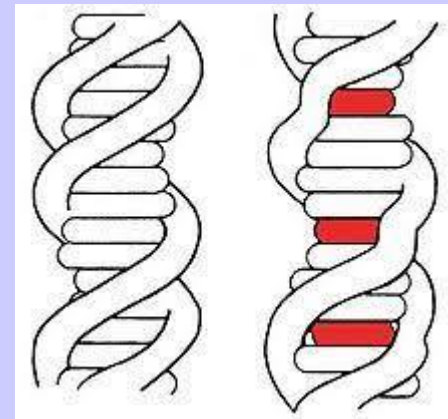
alimentatore

# Elettroforesi - è una tecnica analitica

Gel di *running*: separa, risolve le varie componenti e contiene una sostanza che permette di rilevare dsDNA



Intercalanti del DNA  
*Etidio bromuro*

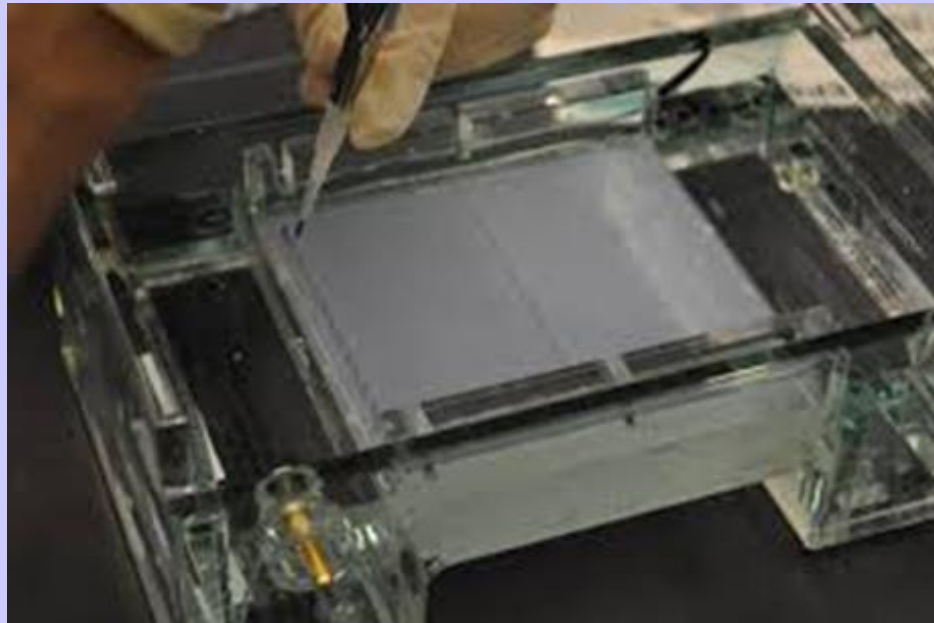


Fluorescenza!



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

## Cella elettroforetica



TAE 1X buffer 40mM Tris/acetato, 1mM EDTA pH 8.3  
è usato per preparare sia  
Gel di *running*: *separa, risolve le varie componenti*  
Buffer di *running*: *costituisce l'ambiente in cui avviene la migrazione*

*Loading buffer*: *serve per caricare i campioni*

alimentatore



## Elettroforesi - è una tecnica analitica

TAE 1X buffer 40mM Tris/acetato, 1mM EDTA pH 8.3

Solitamente si prepara una soluzione concentrata (es. 50x o 100x) che viene diluita al momento dell'utilizzo

*Buffer di running: costituisce l'ambiente in cui avviene la migrazione*

**Il DNA rimane in forma di doppio fialmento! dsDNA**

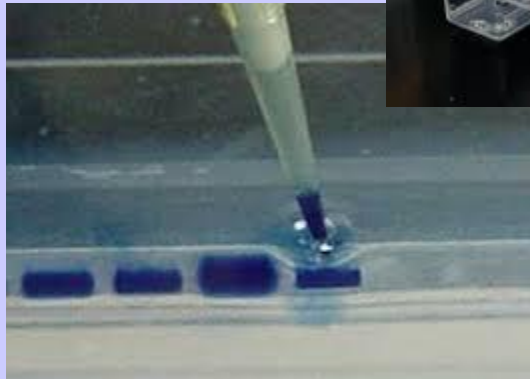
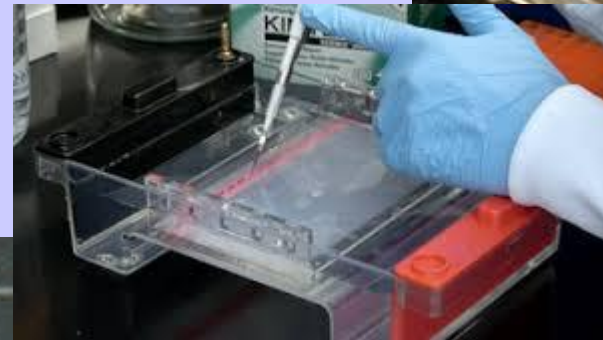
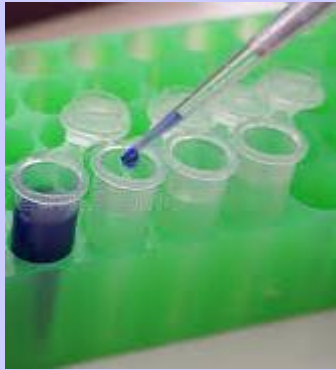


alimentatore



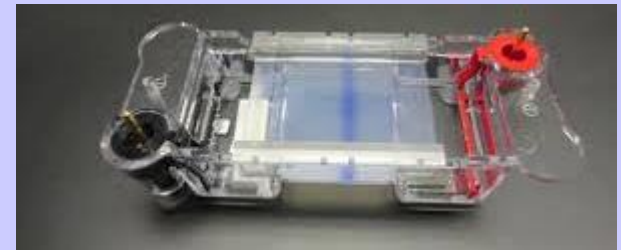
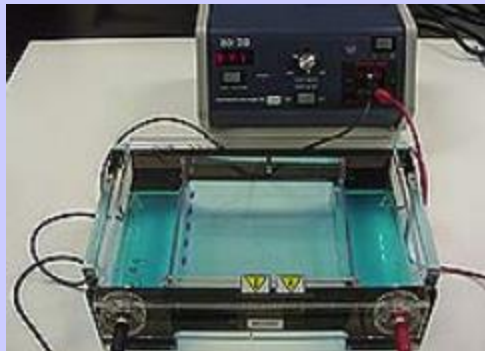
# Elettroforesi - è una tecnica analitica

*Loading buffer: serve per caricare i campioni*



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

Corsa elettroforetica, voltaggio 50-120V, amperaggio sotto 50mA

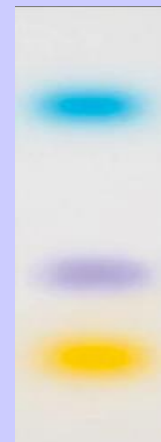


*Tracking dyes*

xylene cyanol

Bromophenol blue

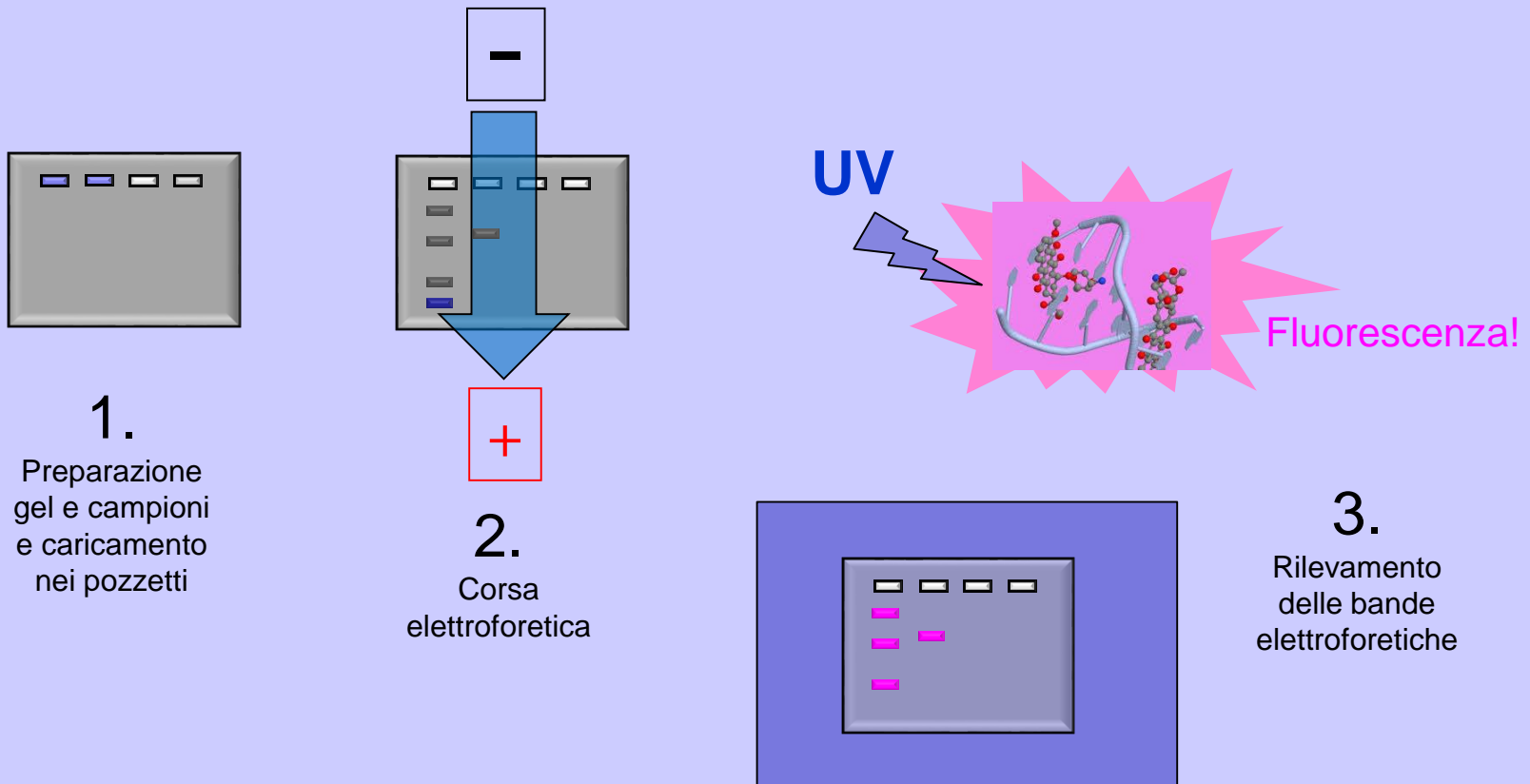
Orange G



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

Corsa elettroforetica, voltaggio 50-120V, amperaggio sotto 50mA

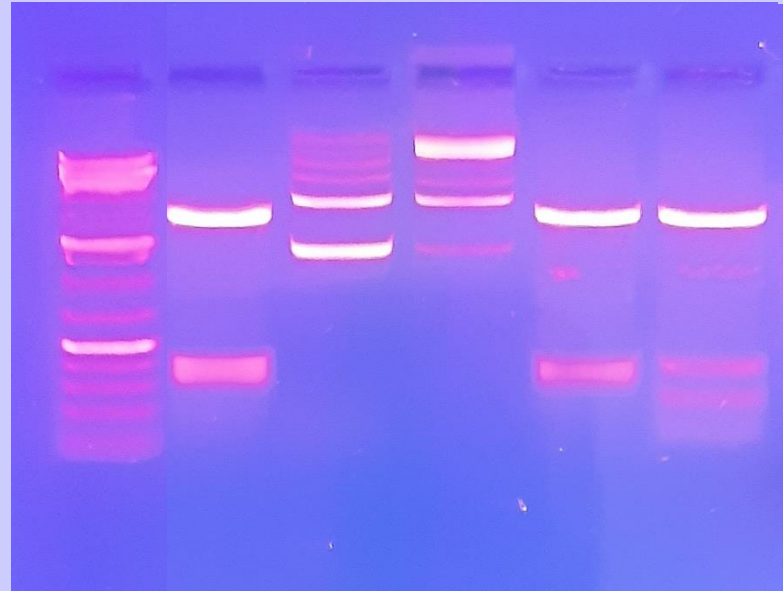
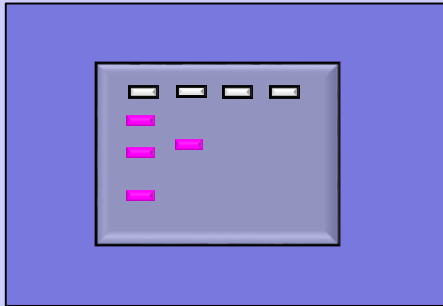
Il DNA contenuto nei campioni si distribuisce sottoforma di **BANDE ELETTROFORETICHE** secondo la **DIMENSIONE** (lunghezza dei filamenti dsDNA)



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

**La risoluzione delle bande dipende dalla % di agarosio del gel, dalle condizioni di corsa (V, tempo)**

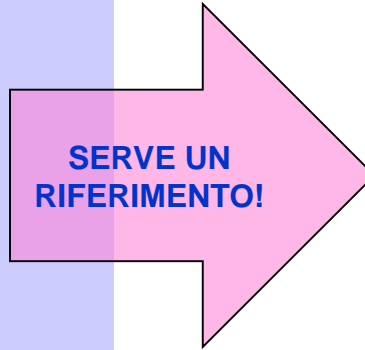
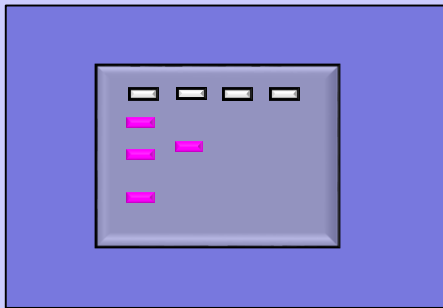
Rilevamento ed interpretazione della delle bande elettroforetiche



# Elettroforesi - è una tecnica analitica

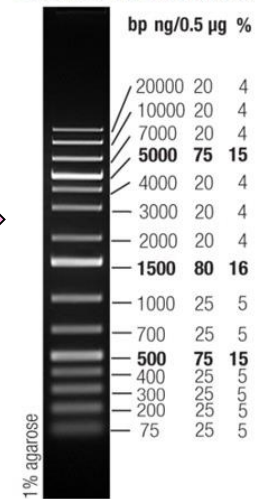
Come si interpreta - *Marker* di peso molecolare  
dimensioni dsDNA in paia di basi (bp)

Rilevamento ed  
interpretazione della  
delle bande  
elettroforetiche



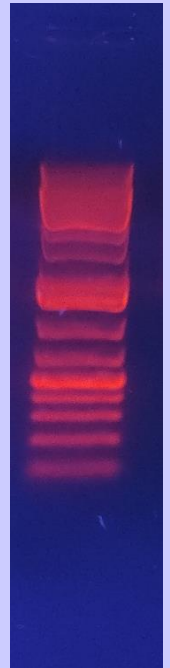
Marker di peso molecolare per frammenti DNA a doppio filamento

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,  
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

**Note.** Formation of diffused bands of small DNA fragments is a feature of agarose gel electrophoresis.



# Analisi dei campioni preparati durante la prima esperienza di laboratorio

## 1. DNA plasmidico

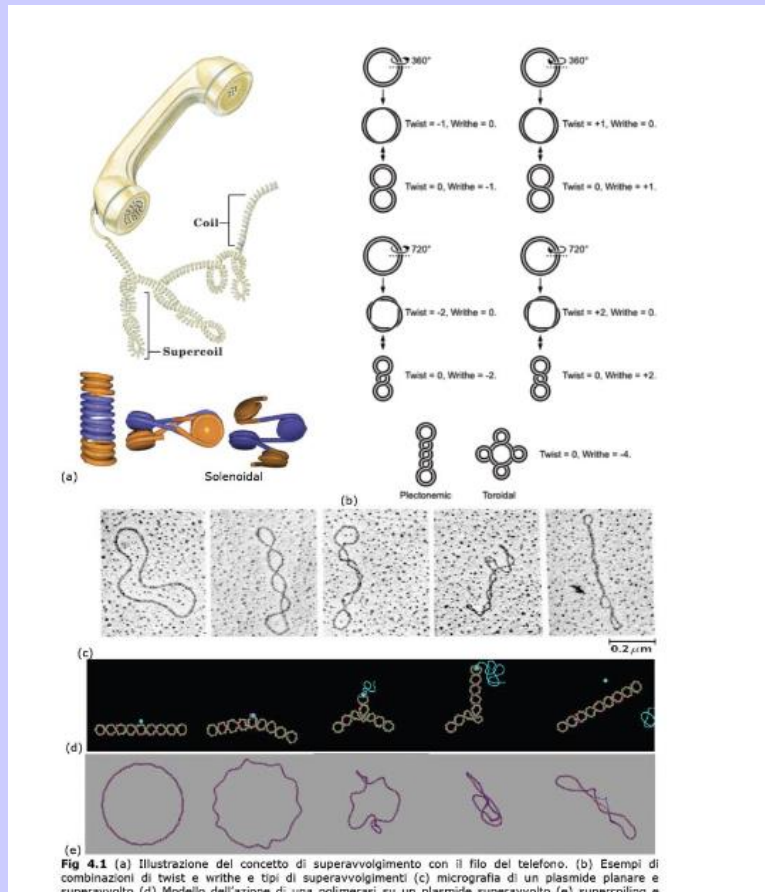
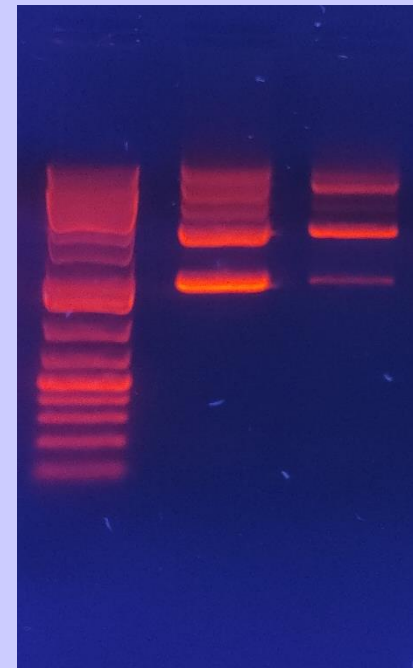


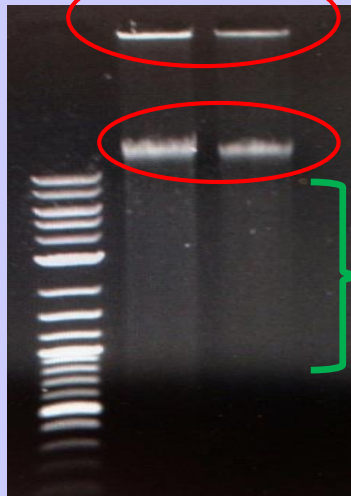
Fig 4.1 (a) Illustrazione del concetto di superavvolgimento con il filo del telefono. (b) Esempi di combinazioni di twist e writhe e tipi di superavvolgimenti (c) micrografia di un plasmide planare e superavvolto (d) Modello dell'azione di una polimerasi su un plasmide superavvolto (e) supercolling e





# Analisi dei campioni preparati durante la prima esperienza di laboratorio

## 2. DNA genomico



Il gDNA di lunghezza oltre 100kb non riesce a entrare nel gel e rimane a livello del pozzetto

Il gDNA di dimensioni minori di 100kb ma superiori a 10kb entra nel gel e migra come un'unica banda non risolta, in genere questo è l'aspetto della preparazione

Il gDNA di dimensioni sotto le 10kb entra nel gel e si presenta come uno *smear* (strisciata)