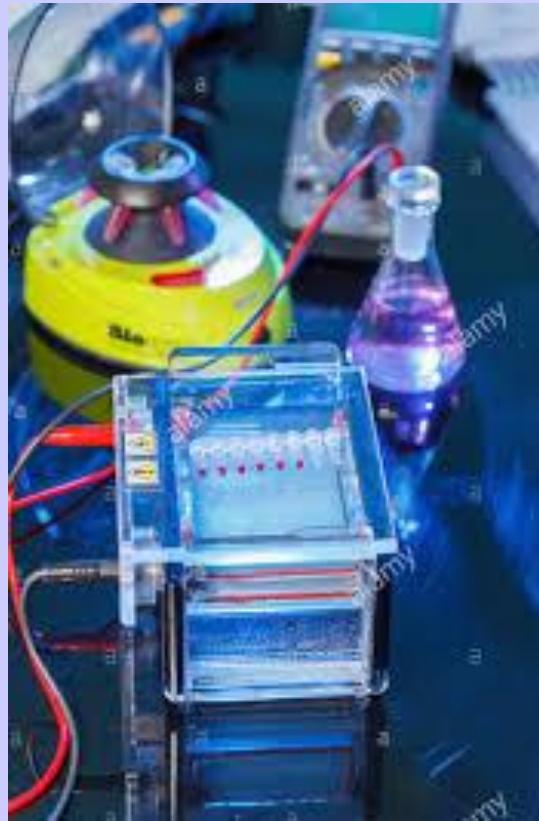
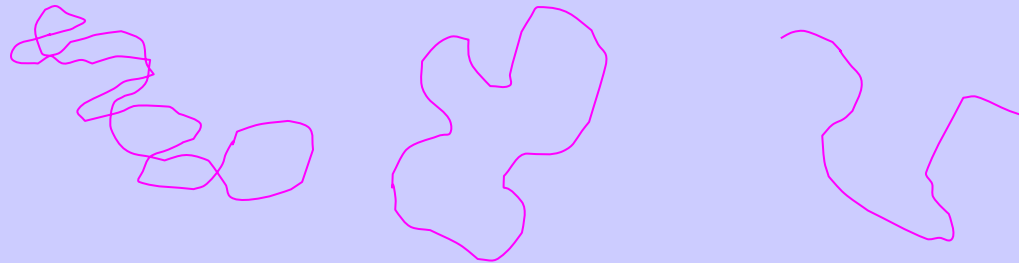


2° esercitazione: ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

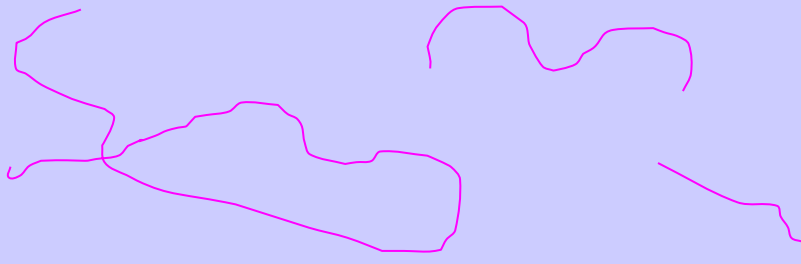


Elettroforesi - è una tecnica analitica

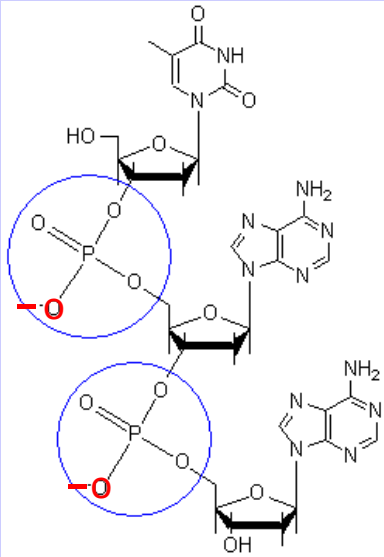
Permette di caratterizzare i campioni che sono stati preparati, stabilirne alcune caratteristiche con cui possano essere visualizzati e riconosciuti



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

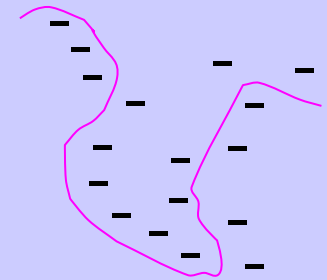


Elettroforesi - è una tecnica analitica



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

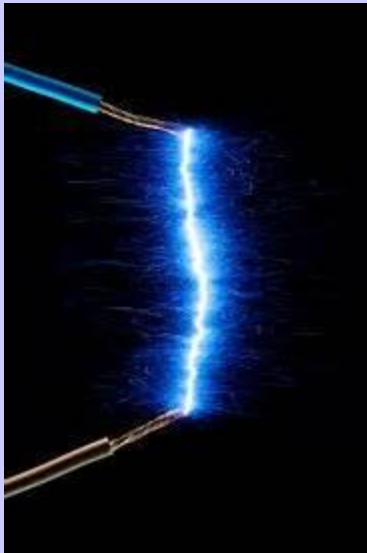
È un **POLIELETTROLITA** forte
ovvero un polimero che si
dissocia completamente in
soluzione a carica negativa
(**POLIANIONE**)



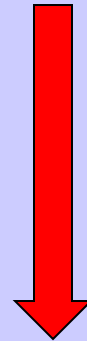
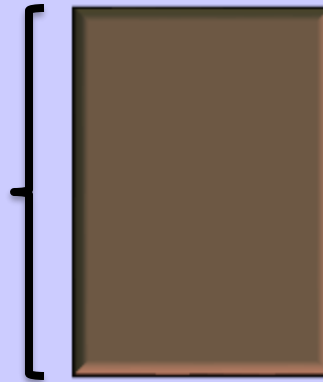
- I polielettroliti presentano proprietà tipiche sia:
- degli elettroliti = conducono la corrente elettrica
 - dei polimeri = alto peso molecolare

Elettroforesi - è una tecnica analitica

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



ΔV



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

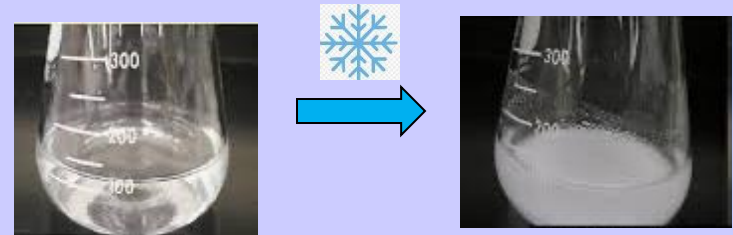
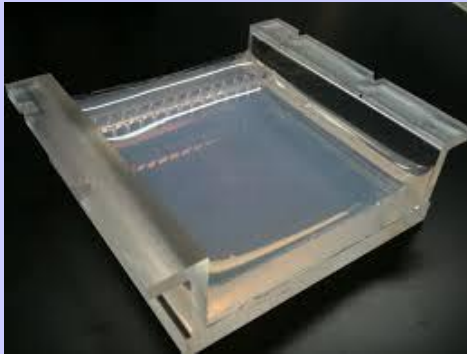


Cella elettroforetica
Gel di *running*
Buffer di *running*
Alimentatore
Loading buffer



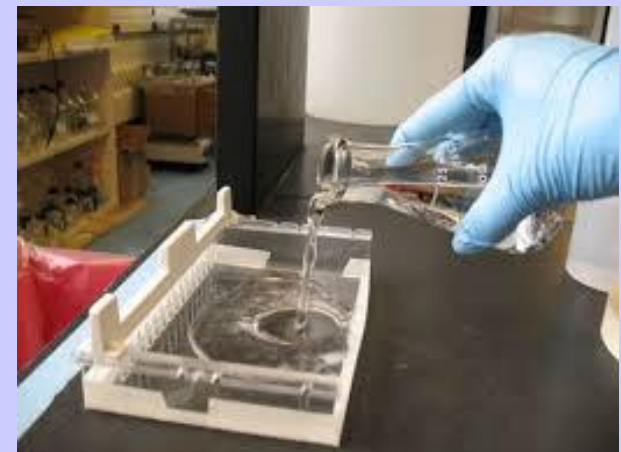
Elettroforesi - è una tecnica analitica

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

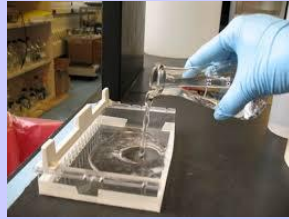
Buffer di *running*: costituisce l'ambiente in cui avviene la migrazione

Loading buffer: serve per caricare i campioni

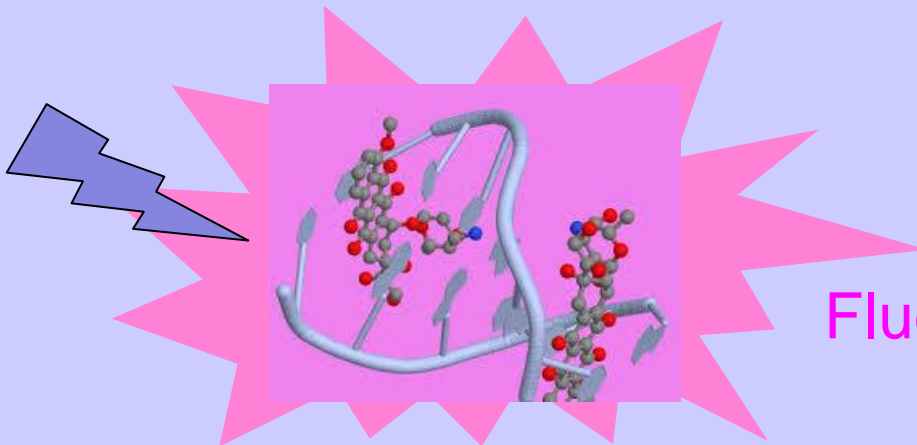
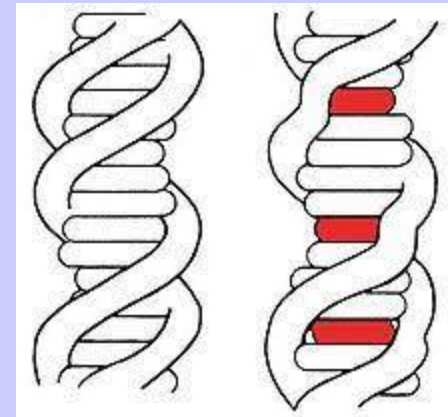
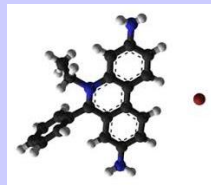
alimentatore

Elettroforesi - è una tecnica analitica

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



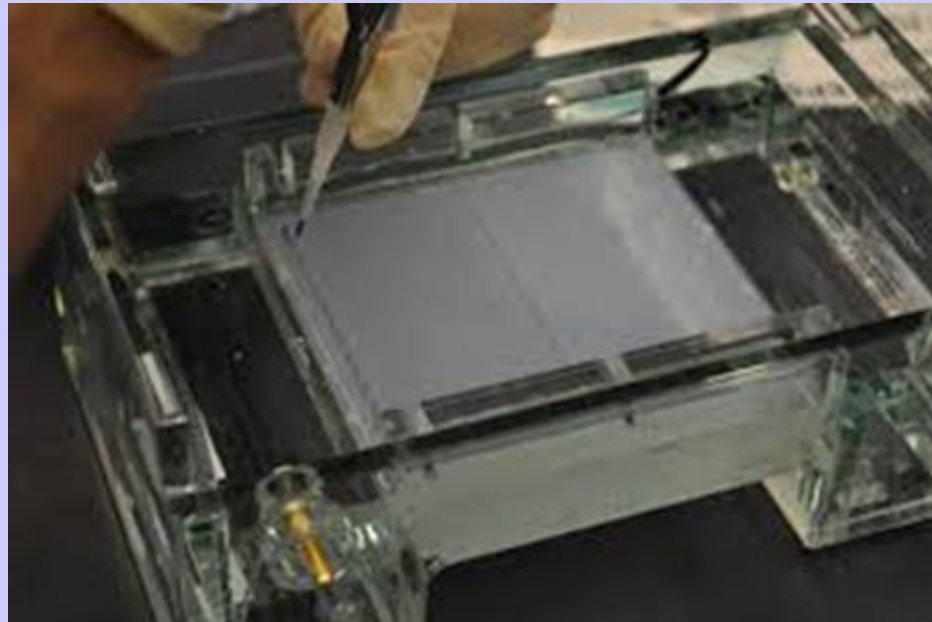
Intercalanti del DNA
Etidio bromuro



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 filamento! dsDNA

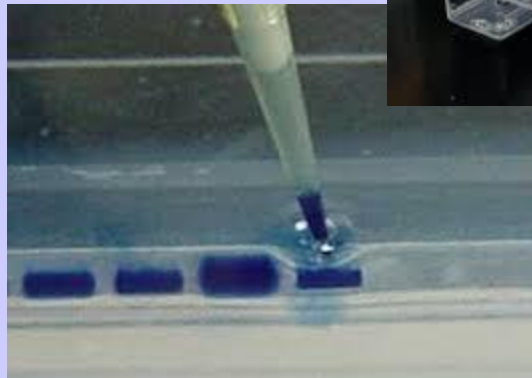
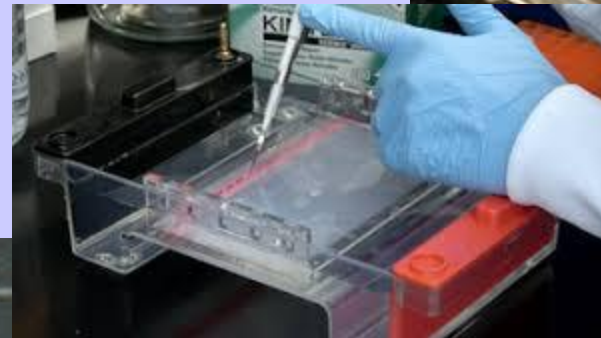


alimentatore



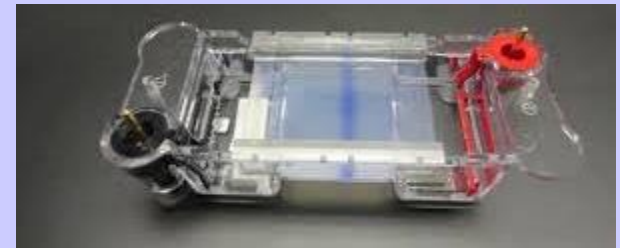
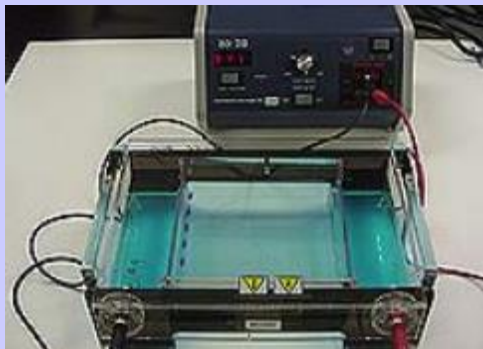
Elettroforesi - è una tecnica analitica

Loading buffer: serve per caricare i campioni



Elettroforesi - è una tecnica analitica

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



Tracking dyes

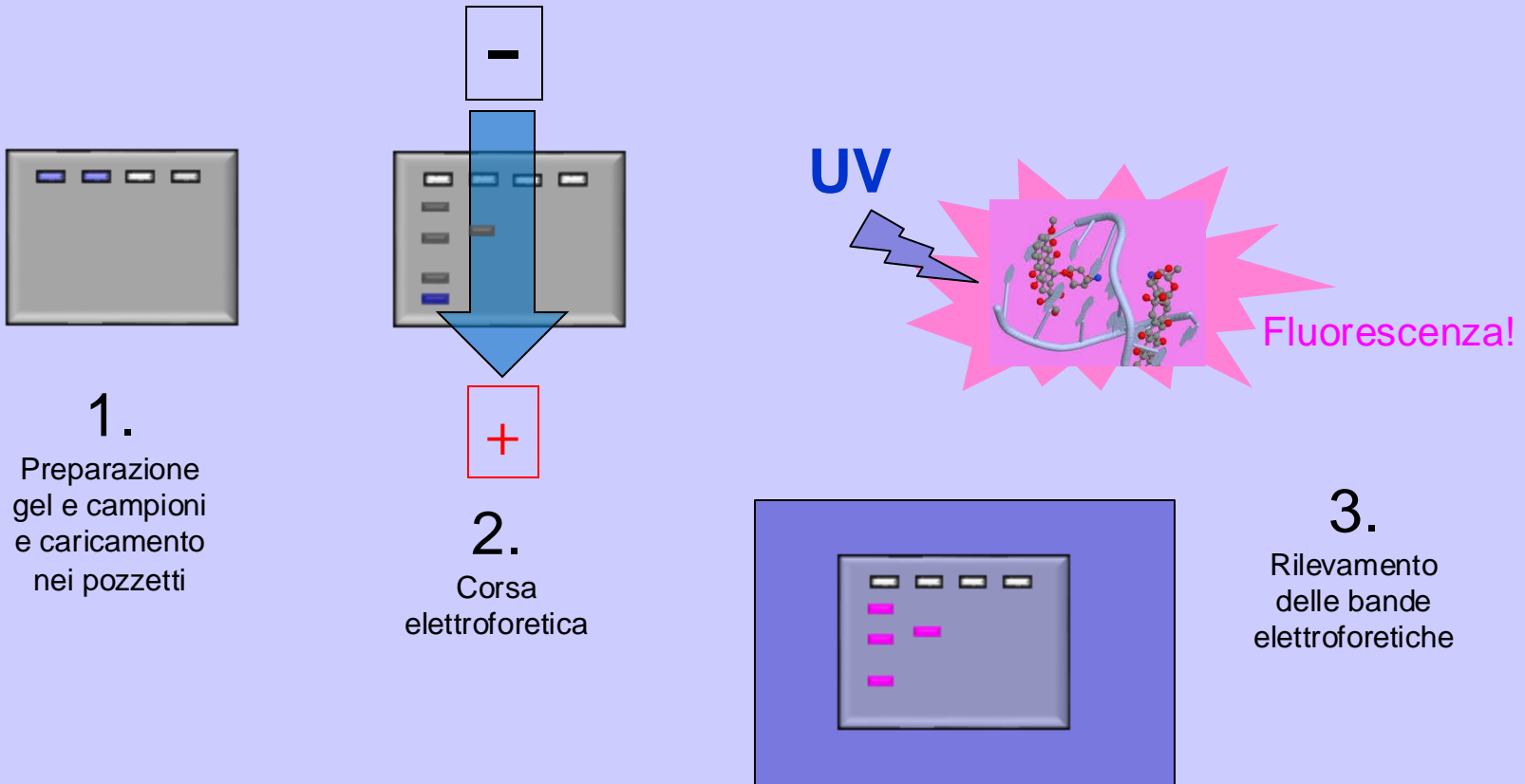
xylene cyanol
Bromophenol blue
Orange G



Elettroforesi - è una tecnica analitica

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

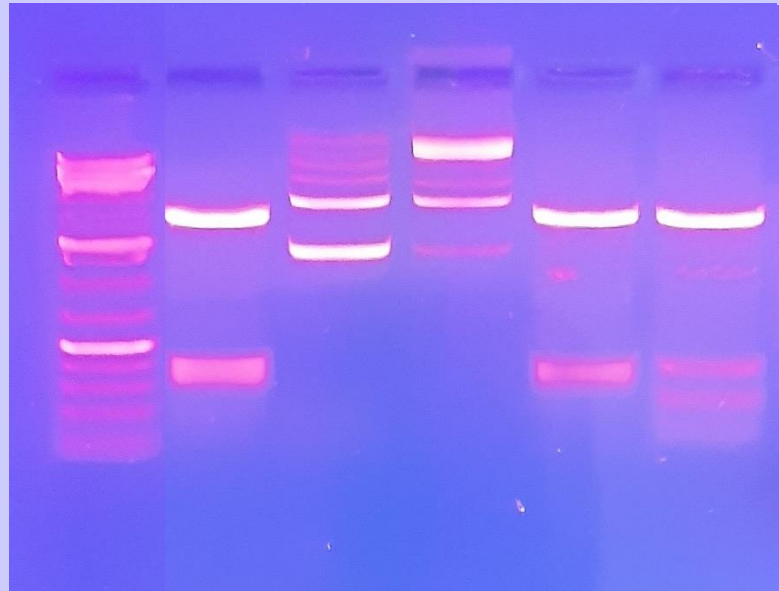
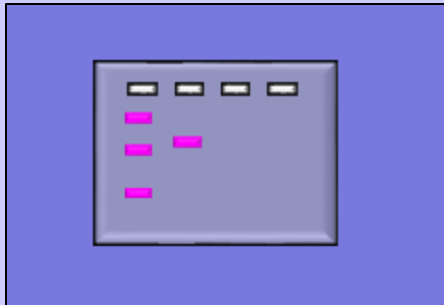
Il DNA contenuto nei campioni si distribuisce sottoforma di **BANDE ELETTROFORETICHE** secondo la **DIMENSIONE** (lunghezza dei filamenti dsDNA)



Elettroforesi - è una tecnica analitica

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

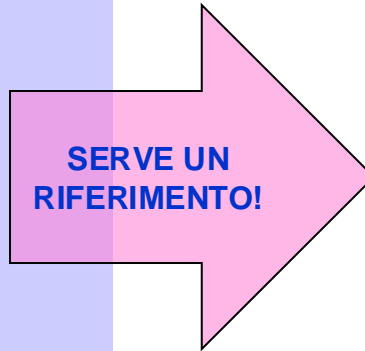
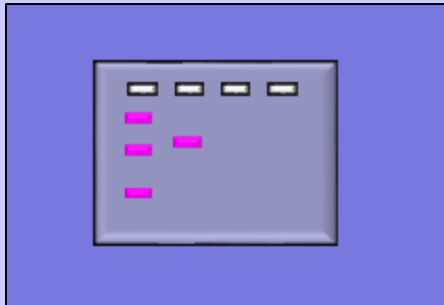
Rilevamento ed interpretazione della delle bande elettroforetiche



Elettroforesi - è una tecnica analitica

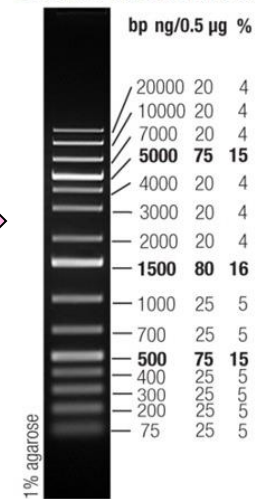
Come si interpreta - *Marker* di peso molecolare
dimensioni dsDNA in paia di basi (bp)

Rilevamento ed
interpretazione della
delle bande
elettroforetiche



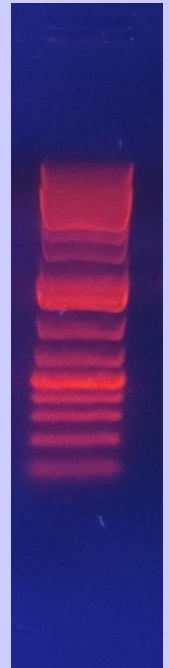
Marker di peso molecolare per frammenti DNA a doppio filamento

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

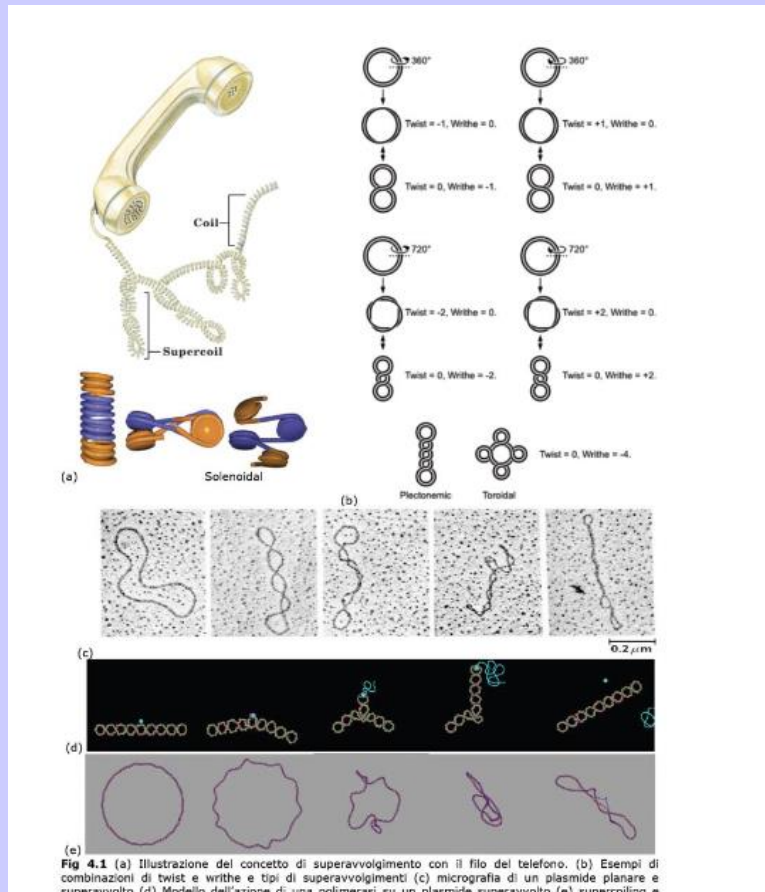
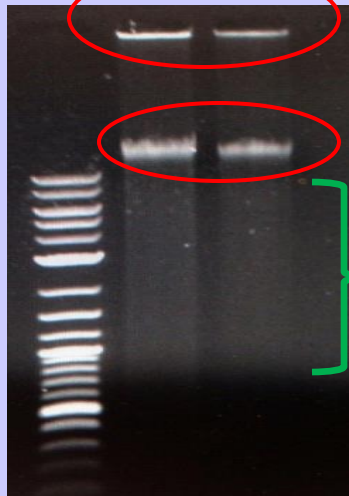


Fig 4.1 (a) Illustrazione del concetto di superavvolgimento con il filo del telefono. (b) Esempi di combinazioni di twist e writhe e tipi di superavvolgimenti (c) micrografia di un plasmide planare e superavvolto (d) Modello dell'azione di una oligomerasi su un plasmide superavvolto (e) supercolling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