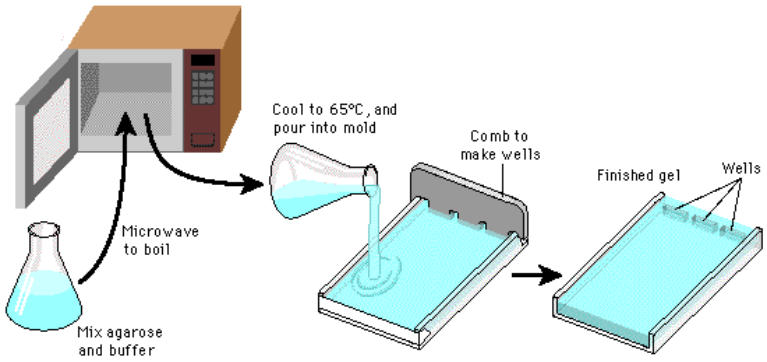
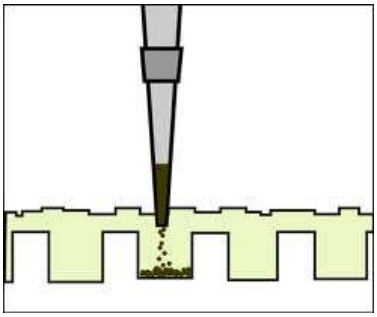
CORSO DI LABORATORIO di BIOLOGIA MOLECOLARE -2° esercitazione a.a. 2026-27
ANALISI ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO

--**gel agarosio 1%** in tampone di *running*: TAE (Tris/acetato/EDTA) 1x / GELRED 3μL/50ml
-tampone di corsa: TAE 1x
-tampone di caricamento (*loading buffer*)
-*markers* di peso molecolare

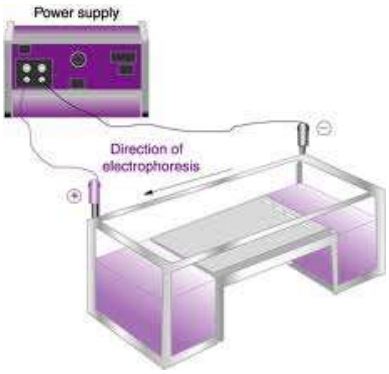
1) PREPARAZIONE DEL GEL



2) CARICAMENTO DEI CAMPIONI NEI POZZETTI



3) CORSA ELETTROFORETICA



-del gel sciolto nel forno a microonde, **circa 45 ml** 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 5 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 10μl** addizionarli a 3μl di *loading buffer* e da questa miscela caricare **3μl** in un pozzetto e **6μl** in un altro pozzetto
- **campioni DNA plasmidico**: da ciascuna mini-preparazione di DNA plasmidico prendere **5μl** e addizionarli a 3μl di *loading buffer* e da questa miscela caricare tutto (**8 μl)** nel rispettivo pozzetto
- -IN UNO DEI POZZETTI VANNO CARICATI **5μl** DI MARKERS di peso molecolare

La corsa va effettuata a 100v per circa 30' e poi Il gel va sottoposto al transilluminatore a raggi UV per visualizzare il DNA.

1	2	3	4	5
MARKER MW **5μl**	DNA gen **3μl**	DNA gen **6μl**	DNA 1° pla **8μl**	DNA 2°pla **8μl**

Allestimento di reazioni di restrizione

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

Dal campione di DNA plasmidico scelto in base all'analisi elettroforetica si allestiscono 4 reazioni di restrizione:

- **5µL miniprep** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione** con **1 solo ER (linearizzazione)** (**5µL**), mescolare bene
- **5µL miniprep** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione** con **tutti e 2 ER (frammento clonato)** (**5µL**), mescolare bene
- **5µL miniprep** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con i 3 enzimi (rilevamento mutazione)** (**5µL**), mescolare bene
- **5µL miniprep** e trasferirli nel tubo eppendorf e aggiungere **5µL** di acqua **(CONTROLLO)**, mescolare bene

Centrifugare brevemente tutte le provette per accertarsi che **tutto il volume rimanga sul fondo del tubo** e metterle su un rack per l'incubazione delle reazioni a 37°C