

Preparazione del **gel d'agarosio**

Obiettivo Preparare un gel d'agarosio all'1% da utilizzare per realizzare una corsa elettroforetica di campioni di DNA.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Acqua deionizzata
- Bottiglia in vetro da 250 ml (resistente al calore)
- Bottiglia in vetro da 1L
- Cilindro da 100 ml
- Cilindro da 1L
- Parafilm®
- Puntali
- Agarosio in polvere per elettroforesi
- Tampone di corsa TBE 10X
- Agente intercalante SYBR™ Safe 10.000X di Thermofisher
- Slitta elettroforetica e pettine
- Scotch resistente al calore



Strumenti

- Bilancia
- Microonde (o piastra magnetica riscaldante)
- Micropipette



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore
- Occhiali di protezione



Tempo

40 minuti per la preparazione e il raffreddamento del gel



Procedimento

- 1.** Diluire il tampone di corsa TBE 10X, trasferendo 100 ml di tampone TBE 10X in un cilindro pulito da 1L e aggiungendo 900 ml di acqua deionizzata (per la preparazione del tampone di corsa TBE 10X consultare le note).
- 2.** Coprire l'imboccatura del cilindro con del Parafilm® e mescolare per inversione.
- 3.** Pesare 1 g d'agarosio in polvere e trasferirlo in una bottiglia in vetro da 250 ml.
- 4.** Aggiungere 100 ml di tampone TBE 1X e mescolare.
- 5.** Porre la bottiglia (senza tappo) in un forno a microonde e scaldare per 30 secondi alla massima potenza per favorire lo scioglimento dell'agarosio. In alternativa, usare una piastra magnetica riscaldante.
- 6.** Di tanto in tanto, agitare la bottiglia usando i guanti di protezione dal calore per permettere all'agarosio di sciogliersi in modo uniforme. L'agarosio è sciolto quando la soluzione diventa completamente limpida.
- 7.** Nel frattempo allestire la slitta elettroforetica, chiudendo con lo scotch i due lati liberi e posizionando il pettine. Verificare che lo scotch saldi perfettamente i due lati liberi e che non ci siano spazi da cui potrebbe fuoriuscire il gel.
- 8.** Quando il gel d'agarosio si è raffreddato a sufficienza (e si riesce a maneggiare la bottiglia senza scottarsi), aggiungere 10 µl di agente intercalante SYBR™ Safe 10.000X di Thermofisher in 100 ml di gel. Mescolare.
- 9.** Trasferire il gel d'agarosio ancora caldo nella slitta e verificare che copra circa i 2/3 dei pettini. Lasciare solidificare a temperatura ambiente. Quando il gel è solido, rimuovere delicatamente il pettine, sollevandolo in verticale rispetto al piano di lavoro. Procedere con attenzione per evitare di danneggiare i pozzetti.
- 10.** Il gel è pronto per essere utilizzato oppure in alternativa può essere conservato, avvolto da pellicola trasparente, a 4°C per un paio di giorni.

Note

- Per preparare 1L di tampone di corsa elettroforetica TBE 10X pesare 121.1 g di Tris-base, 61.8 g di acido borico e 7.4 g di EDTA e scioglierli in circa 900 ml di acqua deionizzata. Mescolare e aggiustare il volume a 1L. Il pH della soluzione dovrebbe essere circa 8.3. Conservare la soluzione a temperatura ambiente, indicando sulla bottiglia la data di preparazione. Si conserva per qualche mese.
- L'agarosio è uno zucchero, più precisamente un polimero lineare, estratto da un'alga marina. Forma una matrice semisolida paragonabile a una rete 3D le cui maglie hanno una grandezza inversamente proporzionale alla concentrazione di agarosio utilizzata nella soluzione. Tanto maggiore è la concentrazione dell'agarosio, tanto più fitte saranno le maglie della rete tridimensionale, tanto più si riuscirà a separare frammenti lineari di DNA di piccole dimensioni. La scelta della percentuale del gel d'agarosio dipende quindi dalla grandezza dei frammenti che si vogliono separare durante la corsa elettroforetica. La tabella sottostante può essere un utile riferimento:

% AGAROSIO	RISOLUZIONE DI FRAMMENTI DI DNA
0.5	1000 - 30000 pb
0.7	800 - 12000 pb
1.0	500 - 10000 pb
1.2	400 - 7000 pb
1.5	200 - 3000 pb
2.0	50 - 2000 pb

- La funzione dell'agente intercalante è quella di posizionarsi nei frammenti di DNA all'interno del gel. L'agente intercalante è una molecola che non solo ha altissima affinità per il DNA, ma anche è in grado di emettere luce a una precisa lunghezza d'onda quando viene colpito da una luce specifica (molecola fluorescente). Il SYBR™ Safe emette luce arancione quando è colpito da raggi UV o da luce blu.
- Esistono diversi tipi di agenti intercalanti: sconsigliamo l'uso dell'etidio bromuro, vista la sua alta mutagenicità e tossicità. In commercio sono disponibili tante alternative valide e più sicure: dal SYBR™ Safe (ThermoFisher) al Fluorescent Nucleic Acid Stain 20.000X di EuroSafe, al Midori Green Direct di Nippon Genetics da aggiungere direttamente al campione di DNA e non nel gel.