

Elettroforesi di **DNA** su **gel** **d'agarosio**

Obiettivo Analizzare campioni di DNA, ottenuti tramite purificazione di DNA plasmidico, amplificazione di PCR o tramite digestione enzimatica di DNA plasmidici, su gel d'agarosio con l'obiettivo di individuare numero e peso molecolare dei frammenti di DNA.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Campioni di DNA
- Puntali
- Gel d'agarosio all'1%
- Tampone di caricamento 6X
- Tampone di corsa TBE 1X
- Marcatore di peso molecolare
- Provette da 1.5 ml
- Pennarello



Strumenti

- Micropipette
- Cella elettroforetica
- Generatore di differenza di potenziale
- Generatore di luce UV o luce blu



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

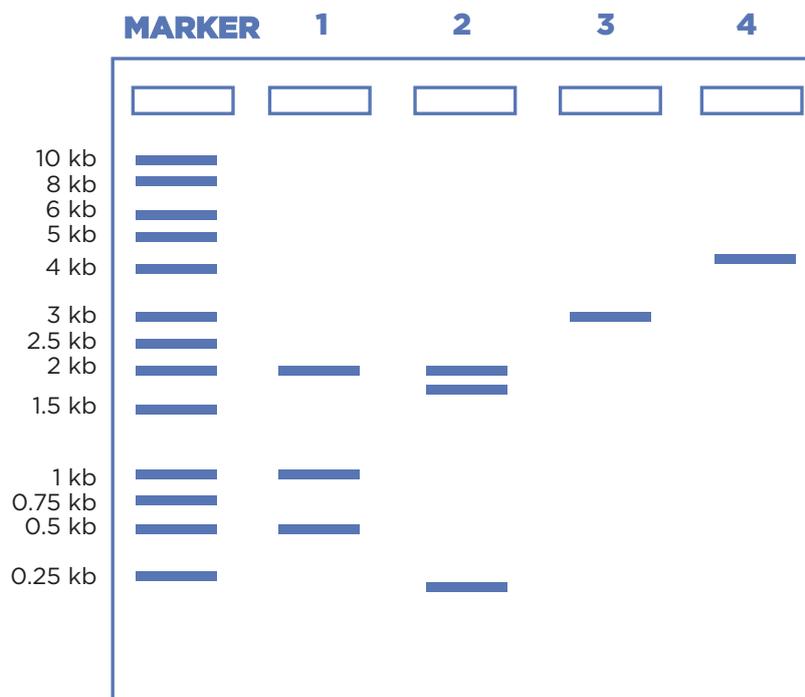
40 minuti per la preparazione del gel
15 minuti per la preparazione e il caricamento dei campioni
60 minuti per la corsa elettroforetica e l'analisi dei risultati



Procedimento

- 1.** Preparare il gel d'agarosio all'1% come descritto nel protocollo "Preparazione del gel d'agarosio". Calcolare il numero di gel da preparare in funzione del numero di campioni da caricare. I campioni di DNA possono essere DNA plasmidici purificati da batteri, prodotti dell'amplificazione di PCR o il risultato del taglio enzimatico di DNA plasmidici.
- 2.** Mentre il gel si raffredda, predisporre la cella elettroforetica: riempire la cella elettroforetica con il tampone di corsa TBE 1X, preparato come da protocollo "Preparazione del gel d'agarosio".
- 3.** Quando il gel d'agarosio si è raffreddato, trasferirlo nella cella elettroforetica senza lo scotch, rimuovere il pettine e verificare che il tampone sia entrato nei pozzetti.
- 4.** Predisporre i campioni di DNA per il caricamento su gel: per ogni campione di DNA da caricare, disporre altrettante provette da 1.5 ml vuote, che andranno numerate in ordine crescente. In ogni provetta, trasferire 20 μ l di campione di DNA e aggiungere 4 μ l di tampone di caricamento 6X, avendo l'accortezza di cambiare il puntale ad ogni aggiunta e di non disperdere il campione sulle pareti della provetta. Nel caso, procedere con una veloce centrifugata di qualche secondo alla massima velocità per riportare il campione sul fondo.
- 5.** Impostare una micropipetta a 20 μ l. Nel primo pozzetto caricare il DNA marker, una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto, secondo le indicazioni della ditta fornitrice (generalmente si carica una decina di μ l di DNA marker). Con un puntale pulito, prelevare 20 μ l di campione di DNA 1, trasferirlo nel pozzetto 2 ed eliminare il puntale. Procedere in questo modo fino al caricamento di tutti i campioni.
- 6.** Chiudere il coperchio della cella elettroforetica e collegare gli elettrodi al generatore di differenza di potenziale, prestando attenzione al codice colore degli elettrodi. L'elettrodo contrassegnato con il colore nero indica il polo negativo, mentre quello di colore rosso, il polo positivo. Prima di avviare la corsa, verificare che i pozzetti con i campioni di DNA siano vicini al polo negativo. Impostare il generatore di differenza di potenziale a 80V e avviare la corsa.

7. La corsa elettroforetica si considera conclusa quando i frammenti di DNA si sono adeguatamente separati su gel, formando bande discrete e distinguibili l'una dalle altre. Alla fine della corsa elettroforetica, spegnere il generatore di differenza di potenziale, aprire il coperchio della cella elettroforetica, prelevare la slitta con il gel e posizionare il gel su un apparecchio di rilevamento come ad esempio un transilluminatore a luce UV o un apparecchio che emette luce blu (es. Safe Imager). La luce emessa dall'agente intercalante ci darà indicazione della posizione dei frammenti di DNA all'interno del gel.
8. Per stimare il peso molecolare di un frammento di DNA, occorre confrontare il posizionamento della banda d'interesse rispetto a quelle del DNA marker di riferimento. È possibile fare questa stima semplicemente per confronto, come indicato nella figura sottostante.
9. Se si vuole determinare con maggiore precisione la dimensione dei frammenti di DNA occorre misurare la distanza (in cm) di ogni singola banda di DNA marker dal pozzetto e costruire una curva di taratura utilizzando i valori di riferimento di peso molecolare delle singole bande del DNA marker. La retta di taratura si costruisce riportando, per ogni banda del DNA marker (che corrisponderà a un punto della retta), in ascissa la distanza in cm percorsa su gel e in ordinata il logaritmo del peso molecolare. Si ottiene così una retta di taratura, da cui è possibile estrapolare il valore del peso molecolare del frammento ignoto, a partire dalla distanza che ha percorso su gel.



Note

- *Il tampone di caricamento contiene glicerolo e due coloranti (Blu di bromofenolo e Xylene cianolo). Può essere acquistato oppure preparato in laboratorio in questo modo: pesare 25 mg di Blu di bromofenolo, scioglierli in 6.7 ml di acqua deionizzata e mescolare; aggiungere 25 mg di Xylene cianolo e mescolare; aggiungere 3.3 ml di glicerolo e mescolare; creare aliquote da 0.5 ml e conservarle a -20°C.*
- *Il tampone di caricamento svolge molteplici funzioni:*
 - *aumenta la densità del campione che si sta caricando su gel, grazie alla presenza di glicerolo, consentendo al campione di depositarsi meglio sul fondo del pozzetto;*
 - *colora il campione, permettendo di vederlo meglio durante il processo di caricamento;*
 - *facilita il monitoraggio della corsa elettroforetica, dal momento che i due coloranti entrambi carichi negativamente corrono insieme al DNA durante la corsa (il Blu di bromofenolo corre come se fosse un frammento di circa 300 pb, mentre lo Xylene cianolo come un frammento di circa 4000-5000 pb).*
- *Il DNA marker è un campione che contiene una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Confrontando la distanza raggiunta dai frammenti di DNA cui siamo interessati con quella dei frammenti del DNA marker è possibile stimare la lunghezza in basi e quindi il peso molecolare del DNA di interesse. In particolare esiste una relazione di proporzionalità inversa tra la velocità di migrazione e il logaritmo del peso molecolare dei frammenti di DNA.*
- *Nell'attività sperimentale proposta si utilizza il DNA marker 1kb ladder della Promega (numero di catalogo: G5711) con frammenti che vanno da 10 kb a 250 pb, ma in commercio esistono moltissimi tipi di DNA marker utili allo scopo, come ad esempio GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder di Thermofisher (numero di catalogo: SM1331) con frammenti da 20 kb a 70 pb, oppure 1 kb DNA Ladder di NEB (numero di catalogo: N3232L) con frammenti da 10 kb a 500 pb. La quantità di volume da caricare su gel è indicata dalla casa produttrice.*