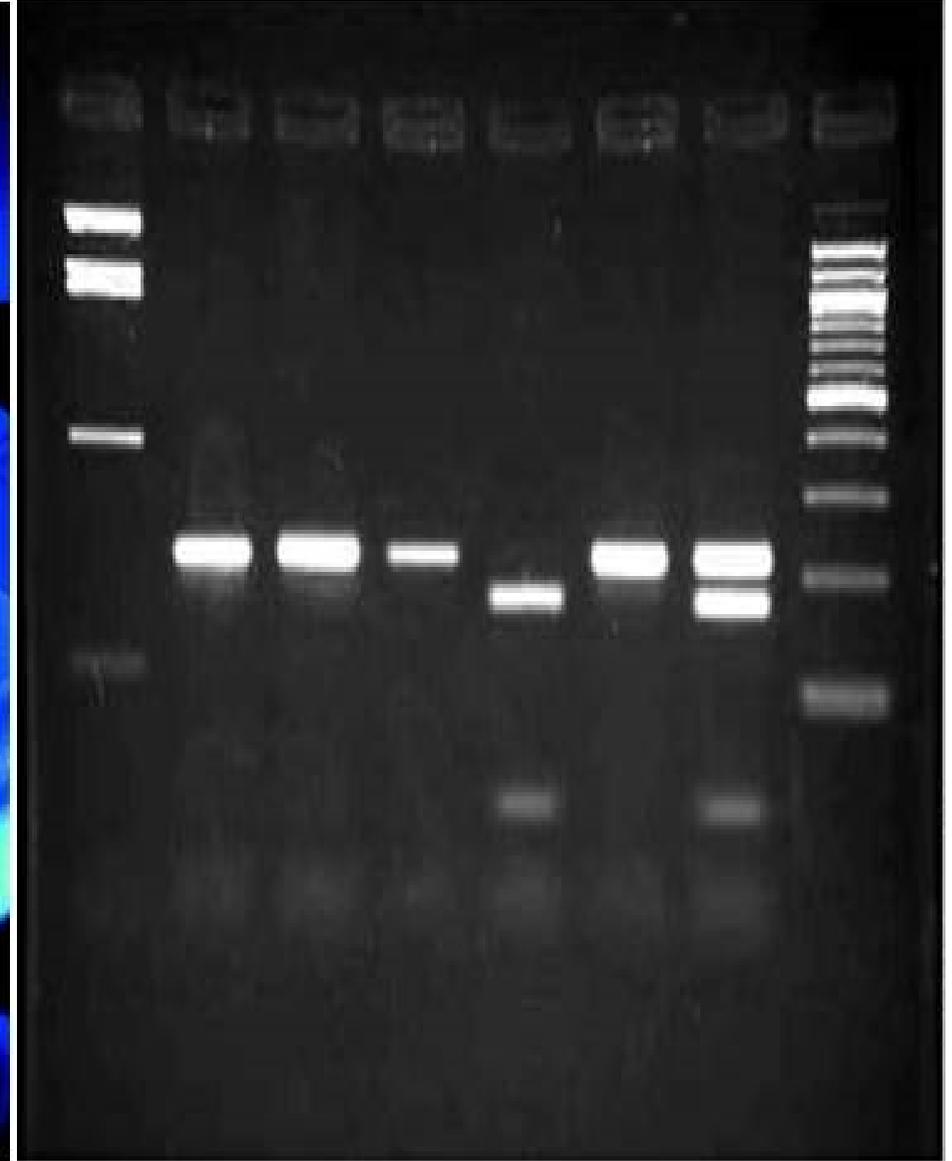


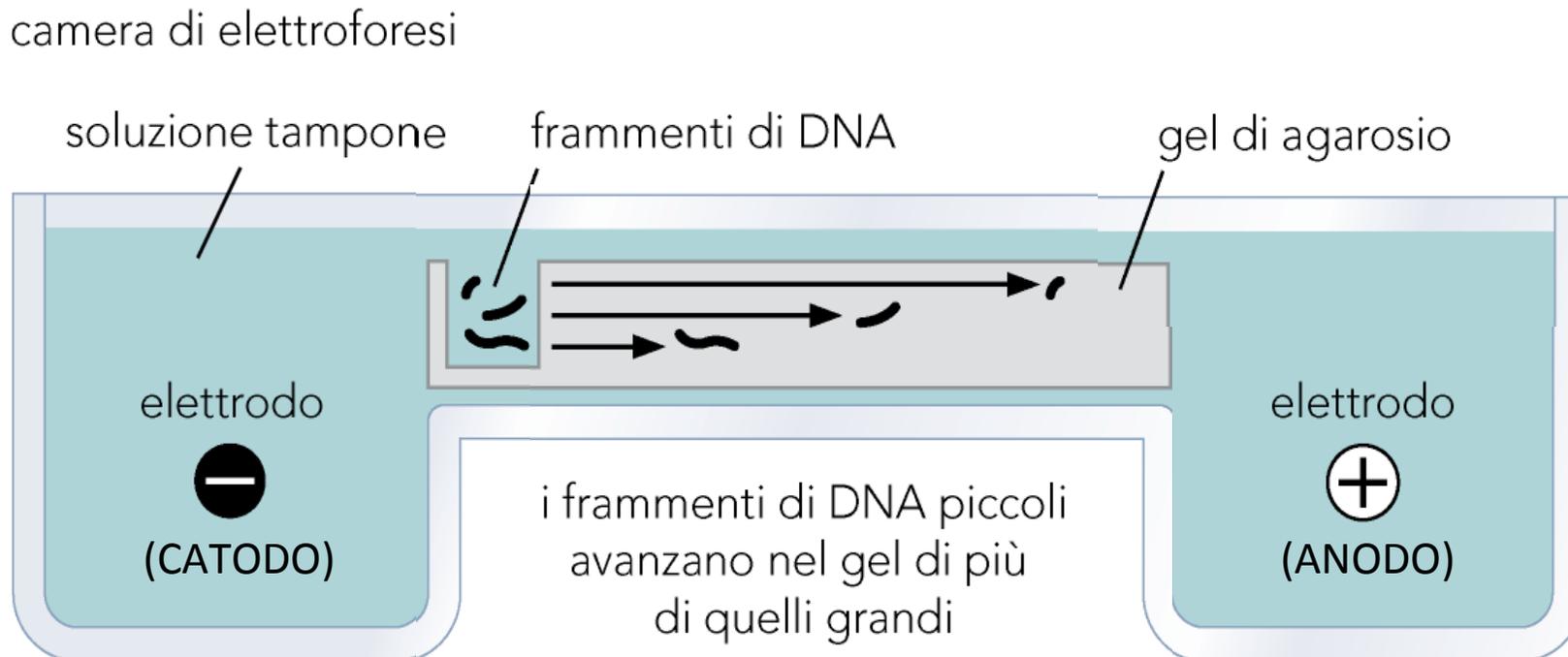
Elettroforesi di DNA su gel di agarosio



Principio:

Consente di separare molecole cariche grazie all'applicazione di un campo elettrico

Il DNA, carico (-) a pH neutro, migra verso il polo positivo (anodo)



Da cosa dipende la velocità di migrazione

- DIMENSIONE DEL DNA
- CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL
- CONFORMAZIONE DEL DNA
- VOLTAGGIO APPLICATO → circa 5 Volt/cm (distanza anodo-catodo)
- PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO
- COMPOSIZIONE (FORZA IONICA) DEL BUFFER →

□ DIMENSIONE DEL DNA

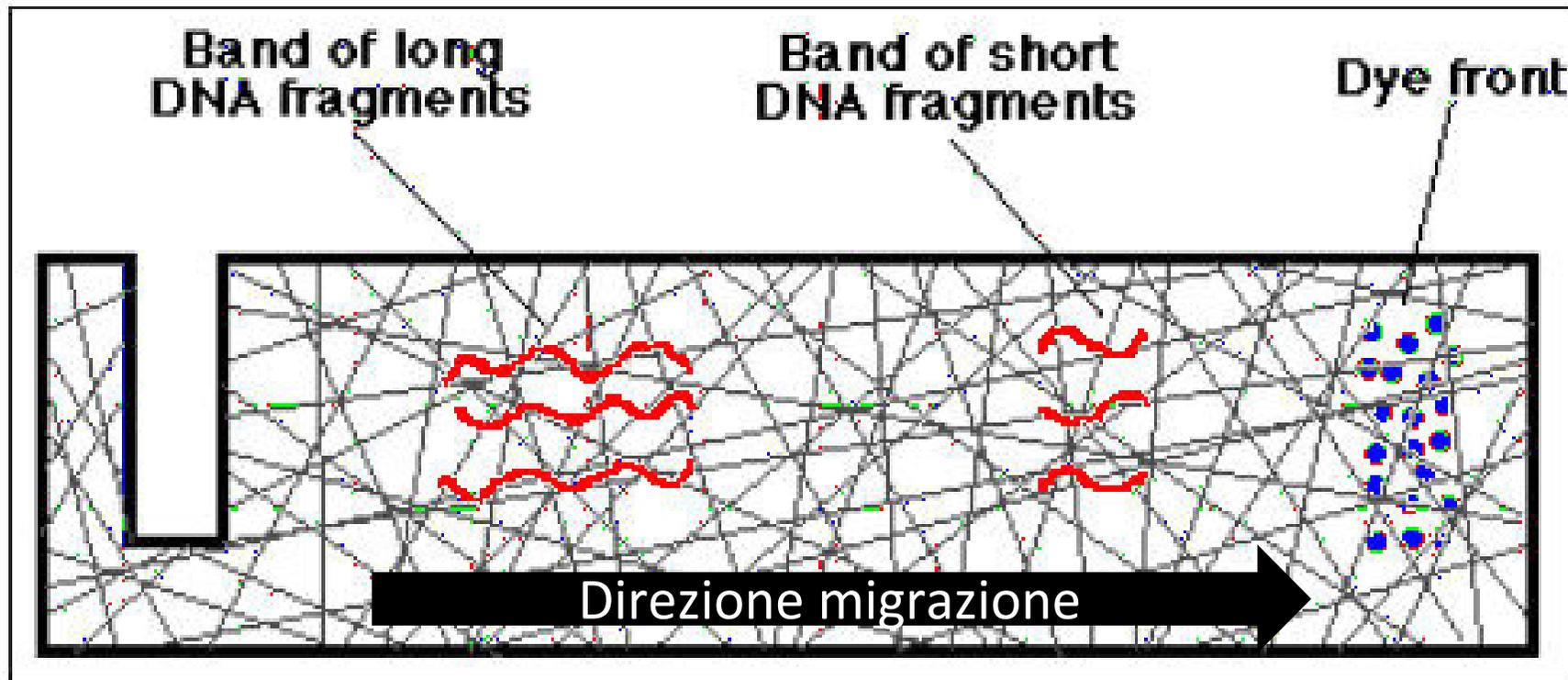
$$V = \frac{K}{\text{Log}_{10} \text{ bp}}$$

relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- molecole grandi migrano lentamente

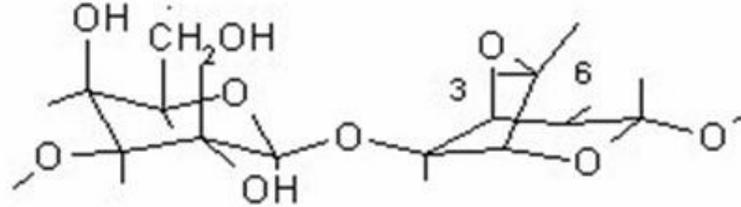
- molecole piccole migrano velocemente

(K varia al variare della concentrazione di agarosio nel gel)

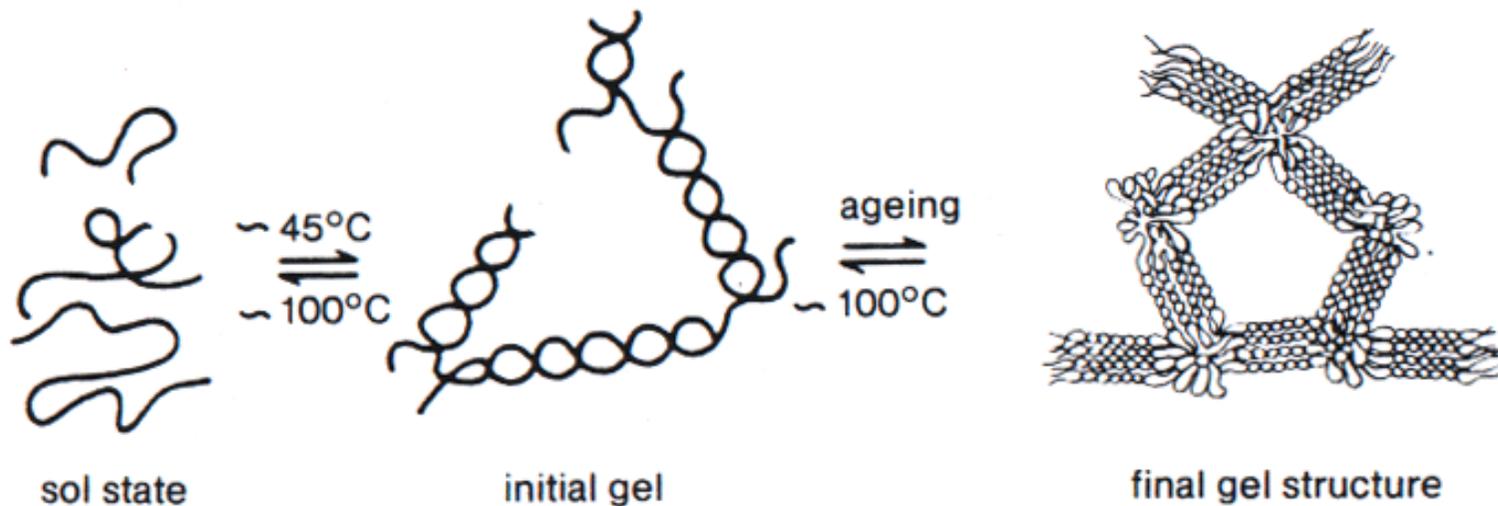


□ CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL

D-Galattoso-3,6-Anidro-L-Galattoso



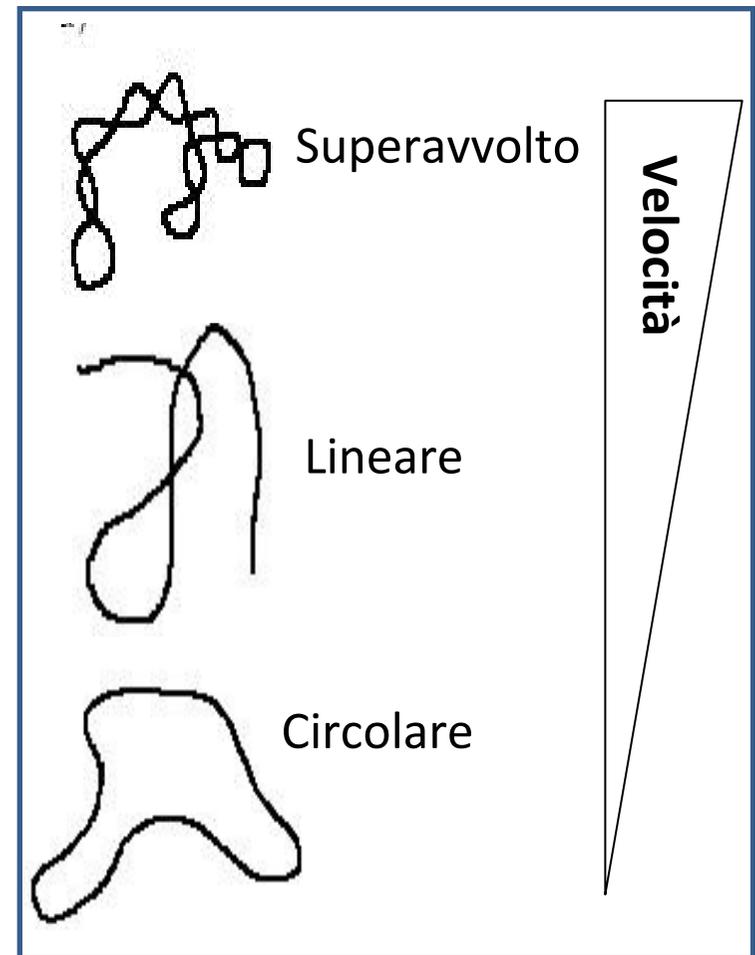
- L'agarosio è un polimero lineare che forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- La sua concentrazione determina il potere risolutivo del gel



□ CONFORMAZIONE DEL DNA

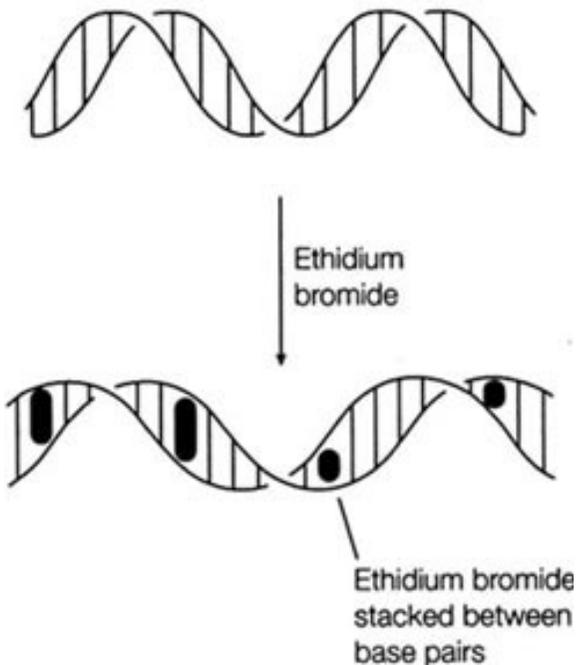
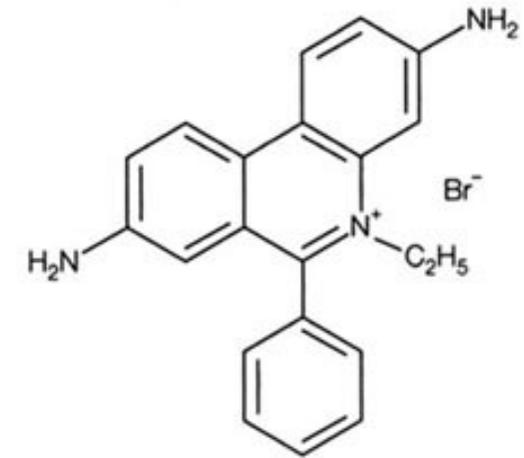
DNA superavvolto, lineare e circolare hanno velocità di migrazione diversa anche se di dimensione uguale:

- La forma SUPERAVVOLTA corre più veloce perché è più compatta;
- La forma CIRCOLARE corre più lenta perché è la più “ingombrante” e fa più fatica a muoversi all’interno dei pori del gel;
- La forma LINEARE si colloca a metà (la forma lineare è, ad esempio, quella che si ritrova come prodotto nella PCR).



□ PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO

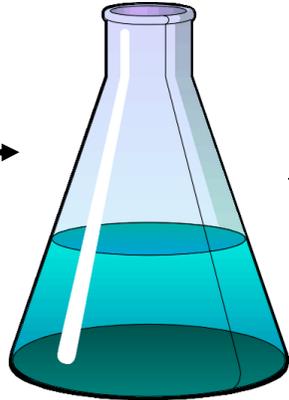
- Colorante fluorescente (intercalante) che consente di visualizzare il DNA
- Assorbimento a 254 nm (U.V.) ed emissione nel visibile (590 nm)
- Riduce la velocità di migrazione di circa il 15%



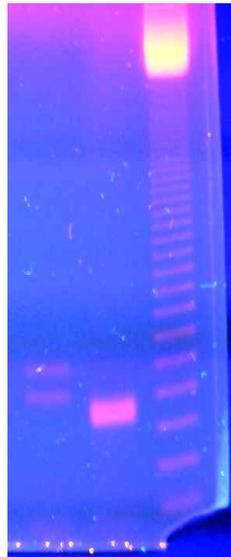
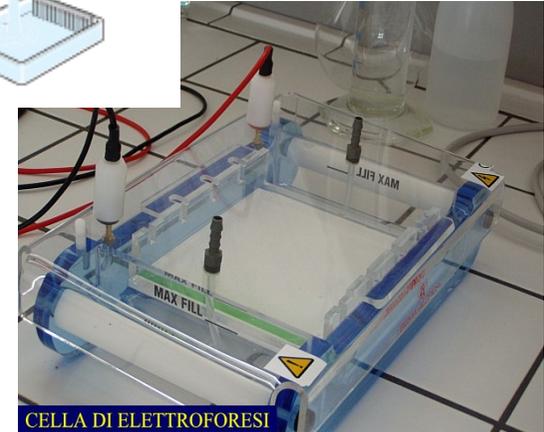
Preparazione del gel di agarosio



Pesare la quantità desiderata di agarosio e scioglierla in un volume adatto di tampone



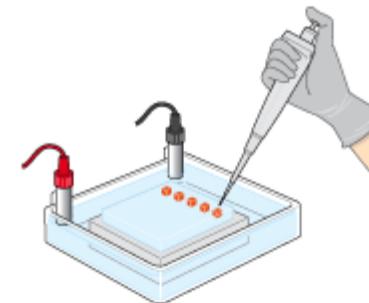
Bollire, aggiungere etidio bromuro e versare nell'apposito apparato per la corsa elettroforetica



Avvenuta la corsa, illuminare il gel con raggi UV per rendere visibile il DNA

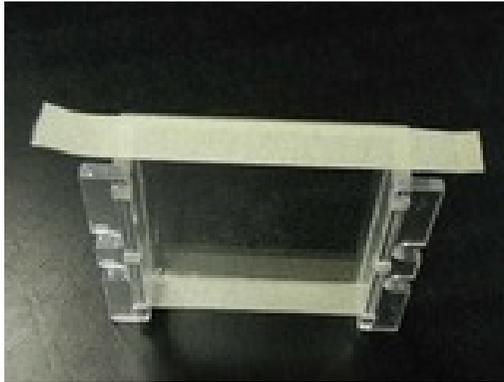


Caricare la reazione alla quale sia stato aggiunto un colorante, in uno dei pozzetti del gel d'agarosio o e far avvenire la corsa elettroforetica fornendo energia elettrica.

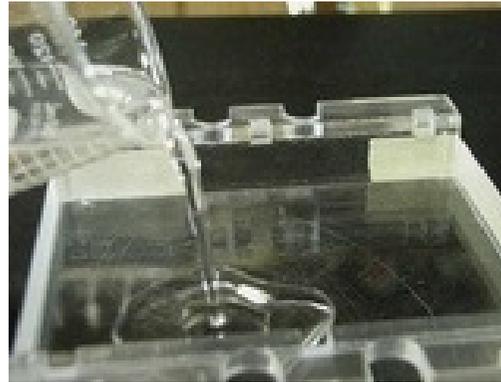


Preparazione del gel di agarosio

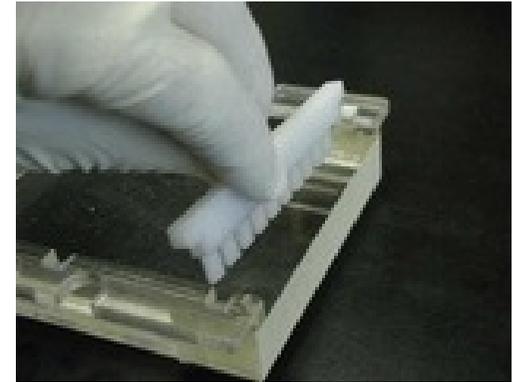
1



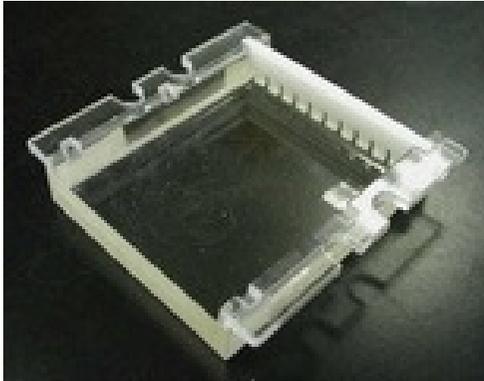
2



3



4



5



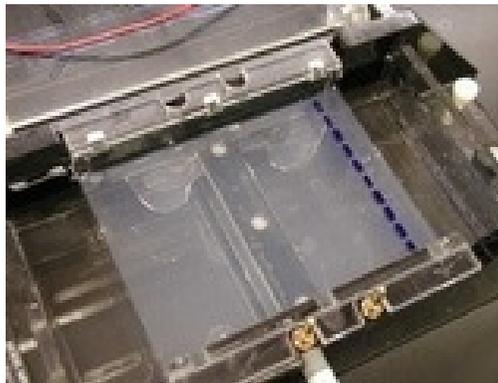
6



7



8



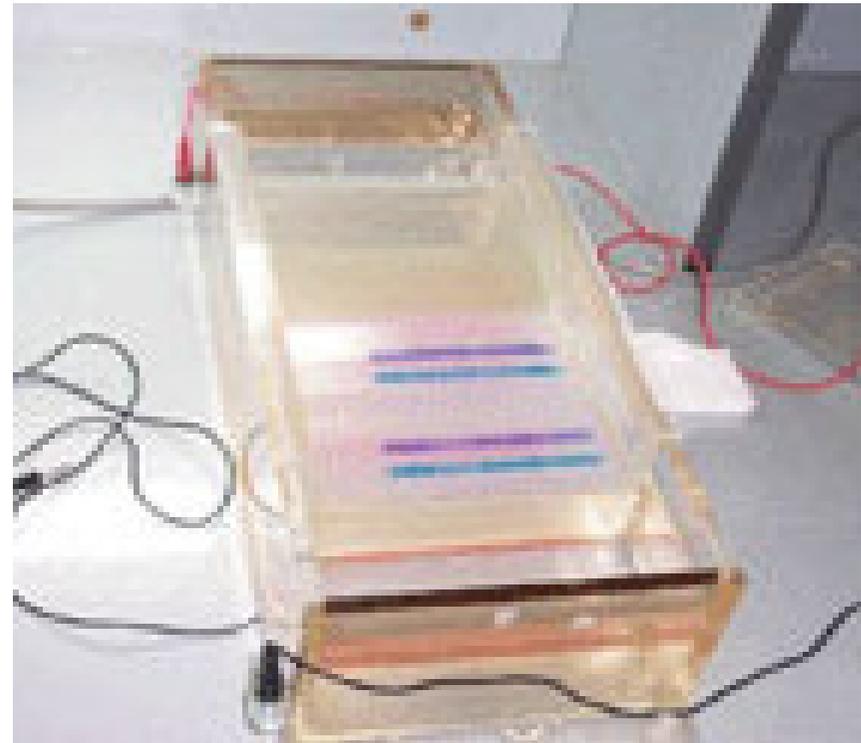
9



Caricamento del gel

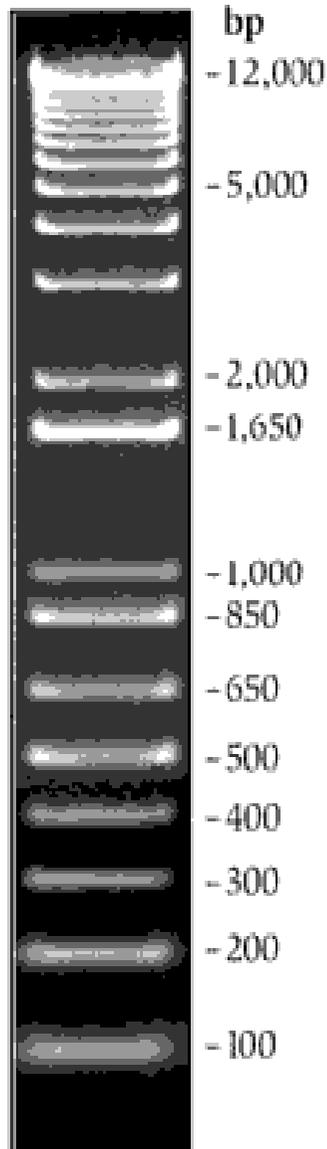


I campioni di DNA vengono miscelati ad un **colorante (orange)** con funzione di addensante ed indicatore del fronte elettroforetico

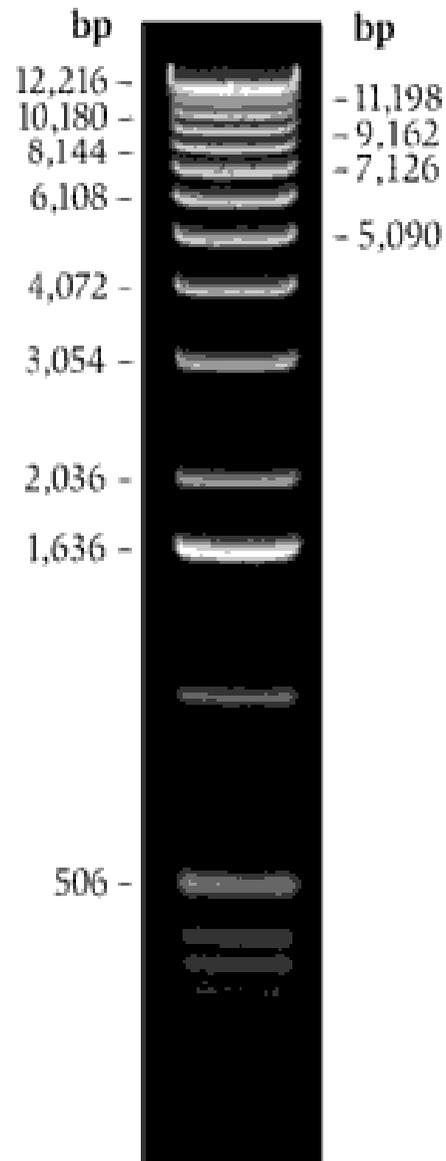


Caricamento del gel

1 Kb Plus DNA Ladder



1 Kb DNA Ladder



Marcatore di dimensioni:
È costituito da frammenti di DNA aventi dimensioni note e consente di determinare la dimensione del DNA campione



Viene fatto migrare insieme ai campioni di DNA come riferimento dimensionale

Il risultato della PCR

