

# ELETTROFORESI

Tecnica analitica che consente di separare molecole cariche grazie all'applicazione di un campo elettrico

Anioni → ANODO (+)  
Cationi → CATODO (-)

$$v = E \cdot q / f$$

$$\mu = v / E$$

**v** = velocità di migrazione

**μ** = mobilità elettroforetica

**E** = gradiente di voltaggio del campo elettrico

**q** = carica della particella

**f** = coefficiente frizionale del mezzo

viscosità

forma

dimensioni

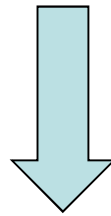
pori

molecola

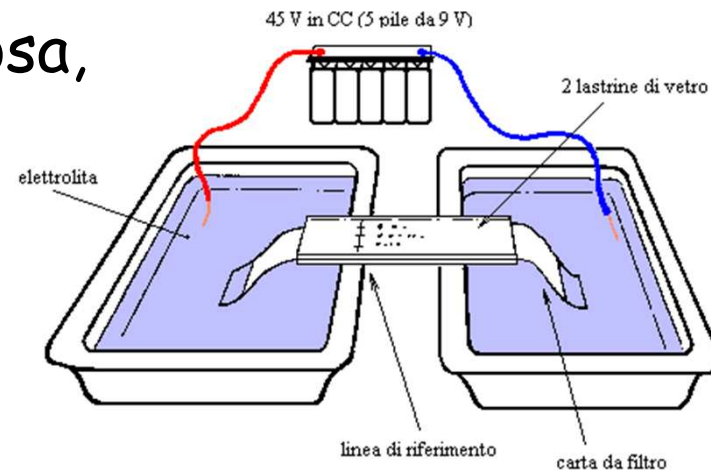
# PRIME ELETTROFORESI

In soluzione libera

*Diffusioni convettive  
Corrente semplice*



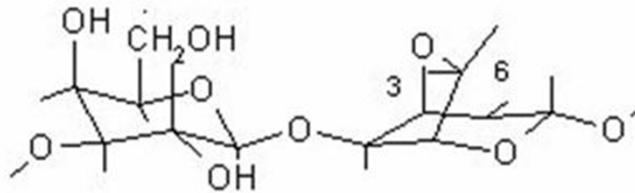
Carta,  
Acetato di cellulosa,  
Silice,  
Allumina  
Agar



# GEL D'AGAROSIO

L'agarosio è un polimero lineare estratto da un'alga marina, la cui struttura di base è:

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

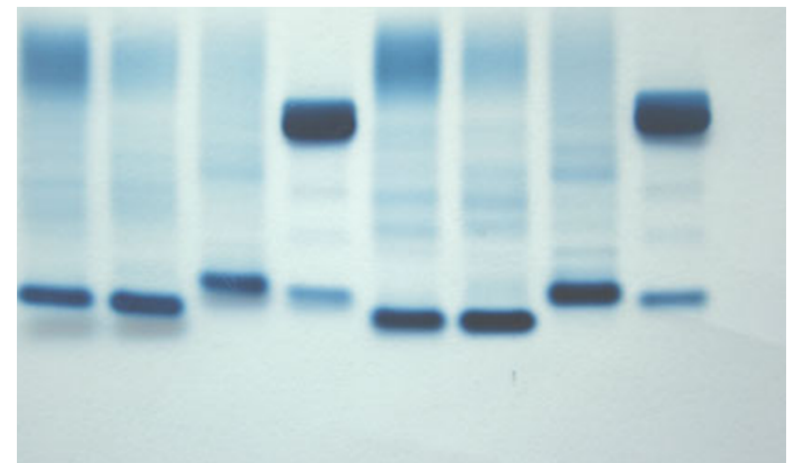
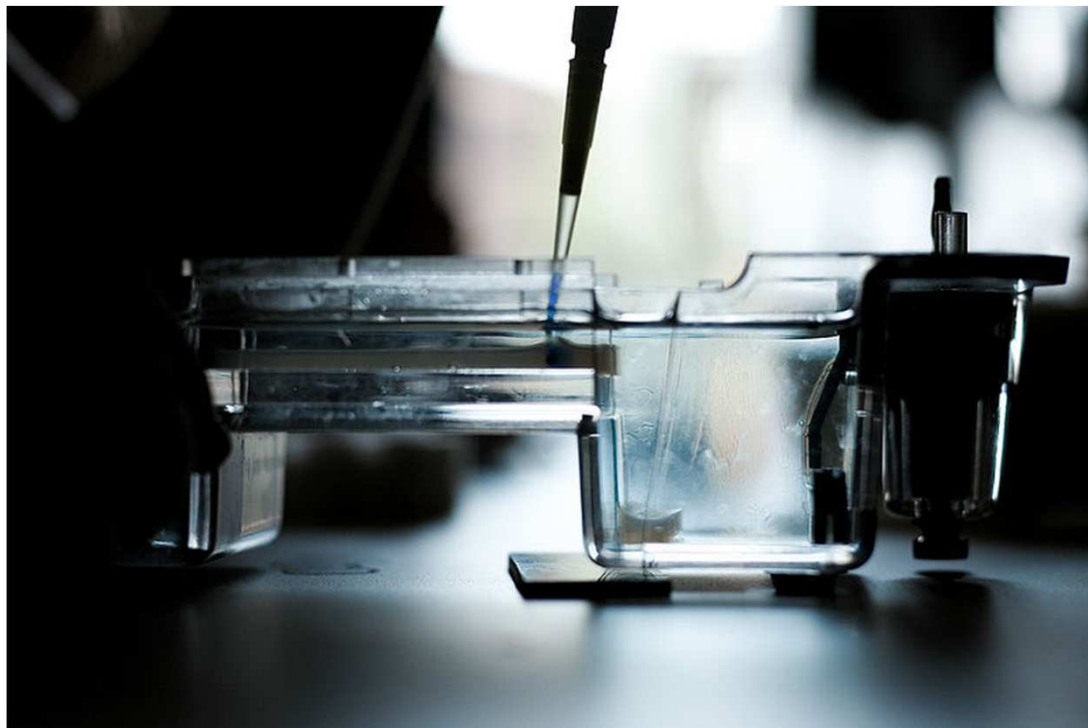
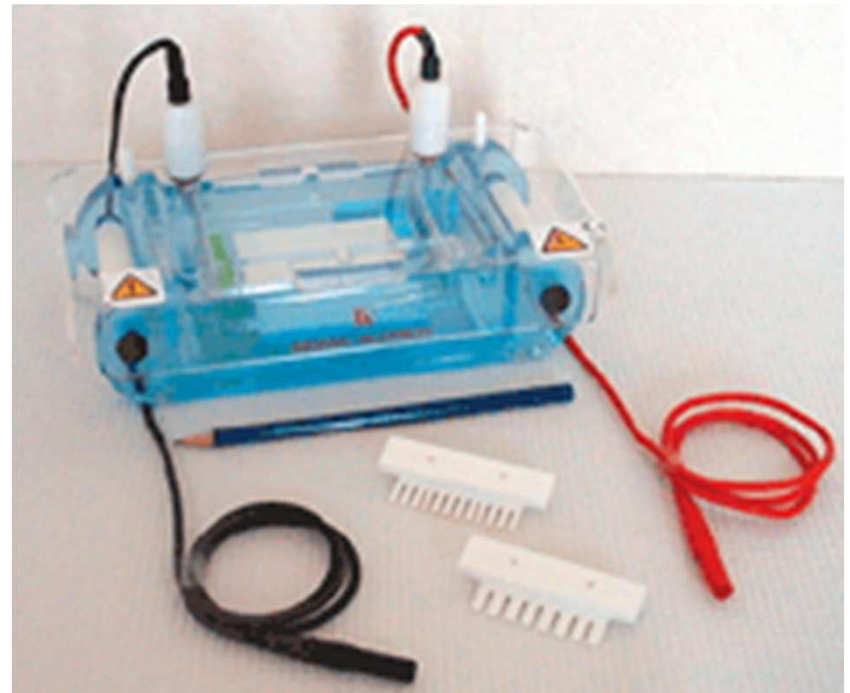
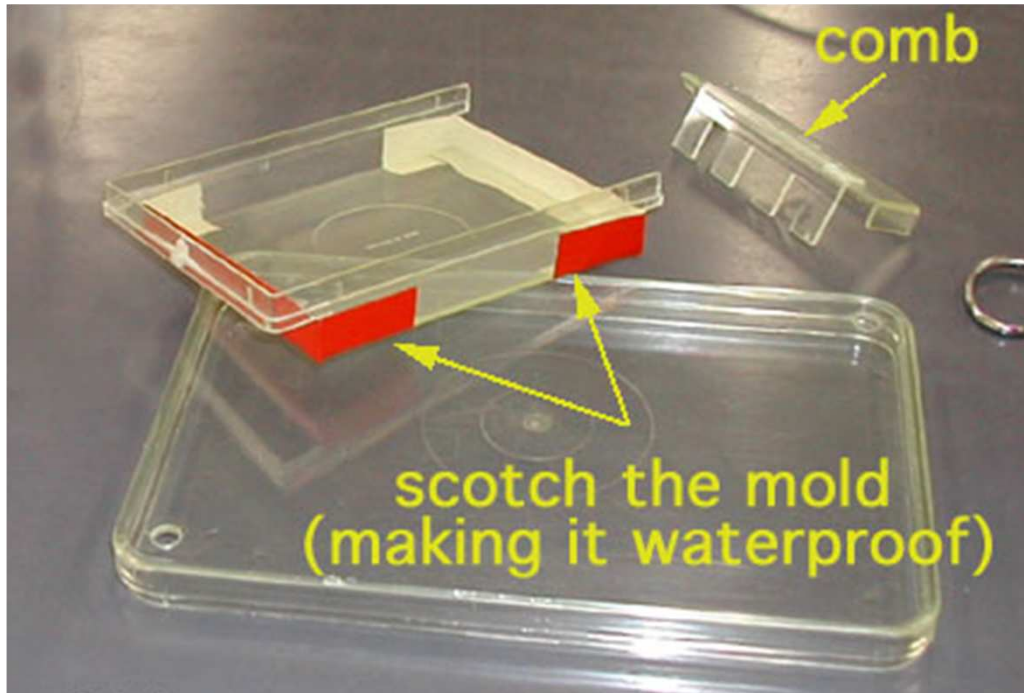


L'agarosio commerciale non è del tutto puro

Più alta è la [agarosio] più piccoli sono i pori nel gel

Il DNA che possiede carica negativa a pH neutro, migrerà verso l'anodo (polo +)

Buffer TAE = tris base + acido acetico glaciale + EDTA



## VELOCITA' DI MIGRAZIONE

La **velocità** migrazione del DNA all'interno di un gel d'agarosio è influenzata da numerosi parametri:

### 1) Dimensioni del DNA:

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

parametro K varia al variare della [agarosio] nel gel.

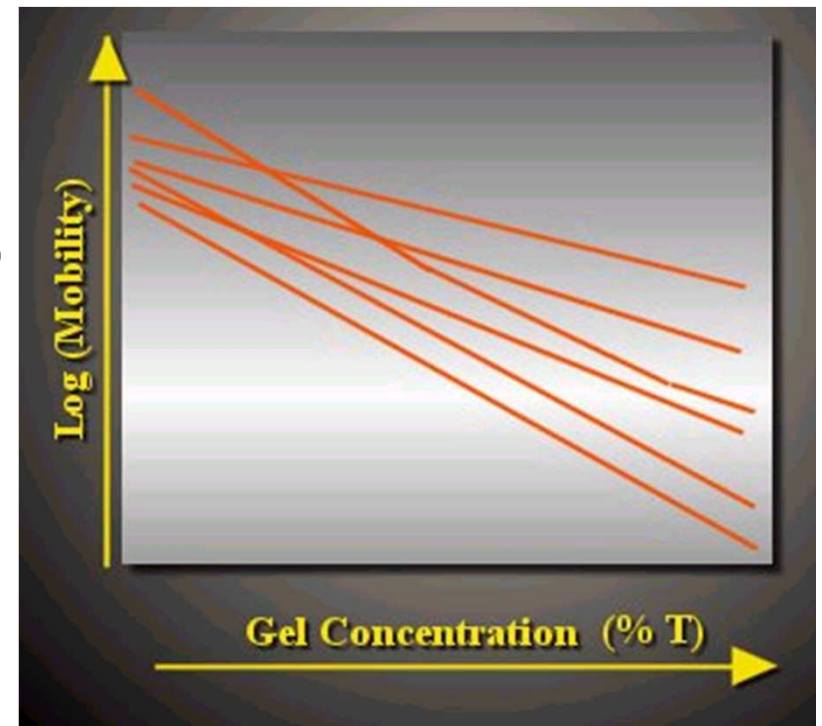
## 2) Concentrazione di agarosio del gel:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_R T$$

$\mu_0$  = mobilità libera del DNA

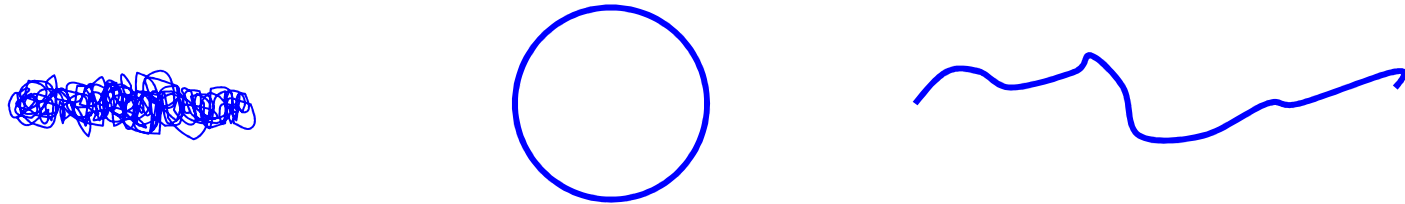
$K_R$  è il coefficiente di ritardo

Relazione lineare tra il logaritmo della mobilità elettroforetica ( $\mu$ ) e la concentrazione del gel ( $T$ )



### 3) Conformazione del DNA:

DNA superavvolto, circolare e lineare dello stesso peso molecolare migrano con velocità diverse



### 4) Voltaggio applicato:

Proporzionalità diretta a bassi voltaggi (5 V/cm)

### 5) Composizione in basi e temperatura:

generalmente NON influenzano la migrazione

# EFFETTO JOULE



$$C = i^2 R t$$

C = calore dissipato

i = intensità di corrente

R = resistenza elettrica

t = tempo

[http://ww2.unime.it/weblab/ita/kim/joule/heat\\_ita.htm](http://ww2.unime.it/weblab/ita/kim/joule/heat_ita.htm)



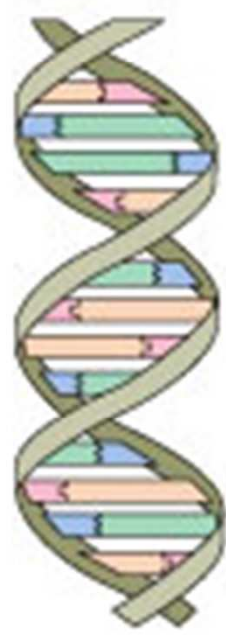
## 6) Presenza di bromuro di etidio:

Colorante fluorescente (**intercalante**) utilizzato per visualizzare il DNA.

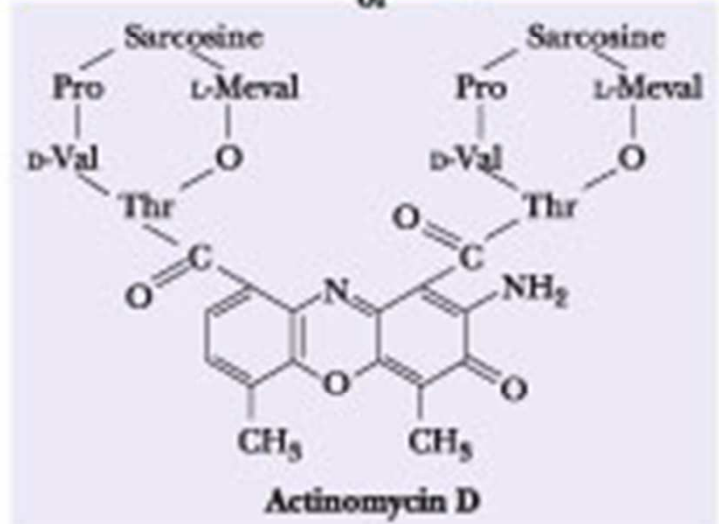
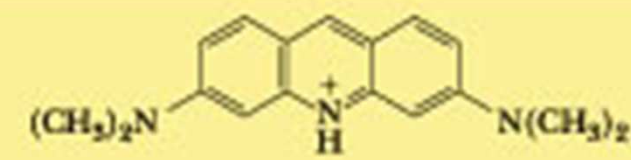
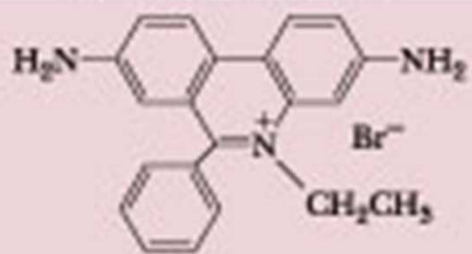
Radiazione UV assorbita a  $\lambda=254$  nm dal DNA  
Riemessa a 590 nm (arancione).

Il colorante riduce la velocità di migrazione del DNA di circa il 15% .

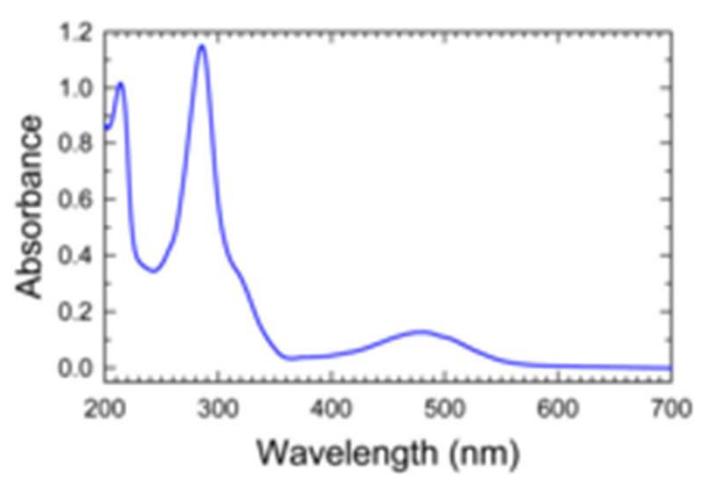
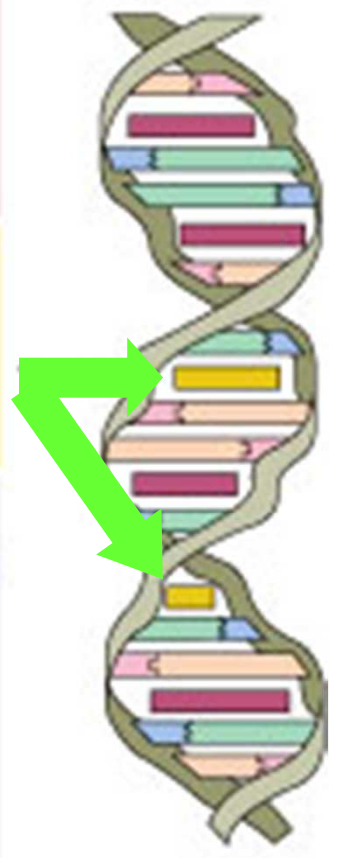
B-DNA before intercalation



Intercalating agents



B-DNA after intercalation



## 7) Composizione e forza ionica del buffer:

Forza ionica molto **ridotta** → conduttività elettrica bassa → migrazione lenta

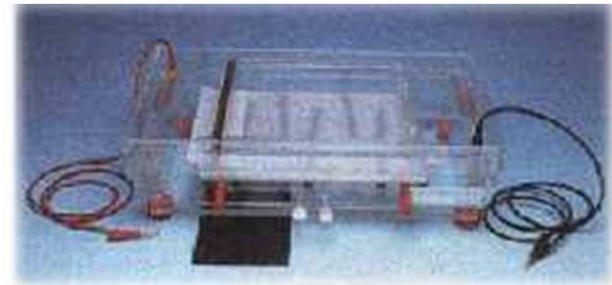
Forza ionica **elevata** → conduttività alta → si genera una gran quantità di calore che può sciogliere il gel e denaturare il DNA.

Il più comune tampone utilizzato è il **TAE**.

# Preparazione di un gel d'agarosio

- Preparare una quantità di buffer sufficiente per la preparazione del gel e per la corsa elettroforetica –nella cella il buffer deve coprire completamente la superficie del gel- **Utilizzare lo stesso buffer per gel e corsa** in quanto piccole differenze di forza ionica o pH potrebbero interferire con la mobilità del DNA.
- preparare il tray della cella elettroforetica scegliendo il pettine appropriato; il pettine determina le dimensioni dei pozzetti nei quali saranno caricati i campioni
- sciogliere un'opportuna quantità di agarosio in un adeguato volume di buffer e riscaldare la soluzione fino a quando apparirà trasparente
- aggiungere il bromuro di etidio
- versare il gel nel supporto e lasciarlo solidificare
- quando il gel sarà solidificato porlo nella cella immerso nel buffer ed estrarre il pettine
- caricare i campioni precedentemente preparati con un opportuno colorante, il quale serve semplicemente come indicatore di corsa (es: orange)
- chiudere la cella con l'apposito coperchio e collegarla al generatore di corrente
- al termine della corsa estrarre il gel dal supporto e osservarlo ai raggi UV

Cella elettroforetica per corsa orizzontale



Esistono **particolari gel di agarosio** che rispondono a diverse necessità:

Minigel: si tratta di piccoli gel poco concentrati utilizzati per analizzare in tempi brevi piccole quantità di DNA.

Gel di agarosio alcalino: viene utilizzato soprattutto per l'analisi di molecole a singolo filamento e spesso per analizzare i cDNA.

Low-melting-temperature gel: si tratta di gel costituiti da agarosio modificato chimicamente per sciogliersi e gelificare a basse temperature. Tale proprietà è utile per poter meglio recuperare il DNA ed utilizzarlo per altre analisi quali digestioni enzimatiche. In questo caso si può excidere la banda relativa al frammento di DNA di interesse ed incubarla direttamente con la mix di reazione a 37°C (temperatura a cui agiscono la maggior parte degli enzimi di restrizione). A tale temperatura il gel utilizzato torna fluido e libera il DNA nella soluzione dove può essere liberamente digerito dall'enzima.

# Conti di laboratorio più frequenti

Molarità (M) = n° moli soluto/Litro di soluzione

n° moli = massa/PM

**DILUIZIONI:  $C1.V1 = C2.V2$**

**% p/p:** 10% p/p di KCl

10 g di soluto in 100 g di soluzione, cioè 10 g di KCl + 90 g di H<sub>2</sub>O

**% p/V:** 10% p/V di KCl

10 g di soluto in 100 mL di soluzione, cioè 10 g di sale portati a volume sino a 100 mL, con H<sub>2</sub>O

$\% p/V = \% p/p \cdot d$  (densità)

$d = \text{Massa/Volume}$

# PROTOCOLLO DI PCR

	Concentrazioni finali	Volumi (μl)
DNA (100 ng/uL)	4 ng/μL	2
Buffer (10 x)	1 x	5
dNTPs (2 mM)	0.2 mM	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 mM	1.5
DMSO	4 %	2
Primer F (6.8 Pmol/uL)	0.272 Pmol/uL	2
Primer R (6.8 Pmol/uL)	0.272 Pmol/uL	2
Enzima (5 U/μL)	0.5 U/camp.	2(0.1)
H <sub>2</sub> O		28.5

---

50 ul

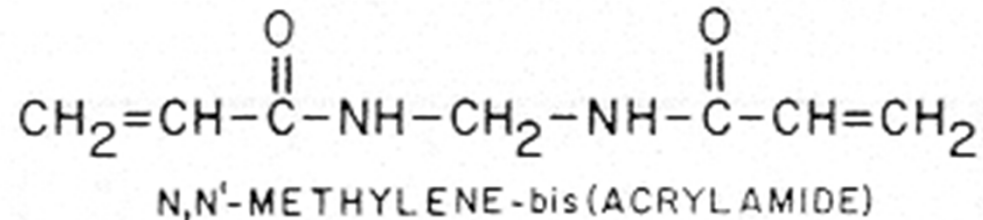
95° C	5'	
95° C	30''	30 cicli
67° C	30''	
72° C	30''	
72° C	10'	

# GEL DI POLIACRILAMIDE (PAA)

L'**acrilamide** è un monomero ( $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ ) che viene fatto polimerizzare con un **agente** in grado di stabilire legami crociati in presenza di un **catalizzatore** e di un **iniziatore**.

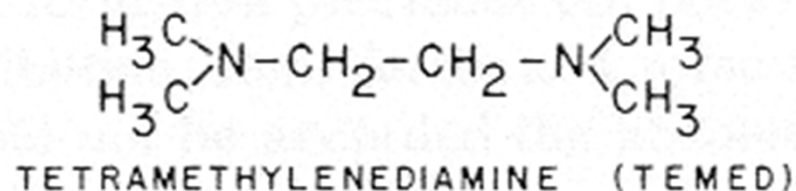
**Agente cross-linker:**

**N,N'-metilenbisacrilamide**  $\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2)_2$



**Catalizzatore: TEMED**

(amina terziaria N,N,N',N'-tetrametilendiamina)



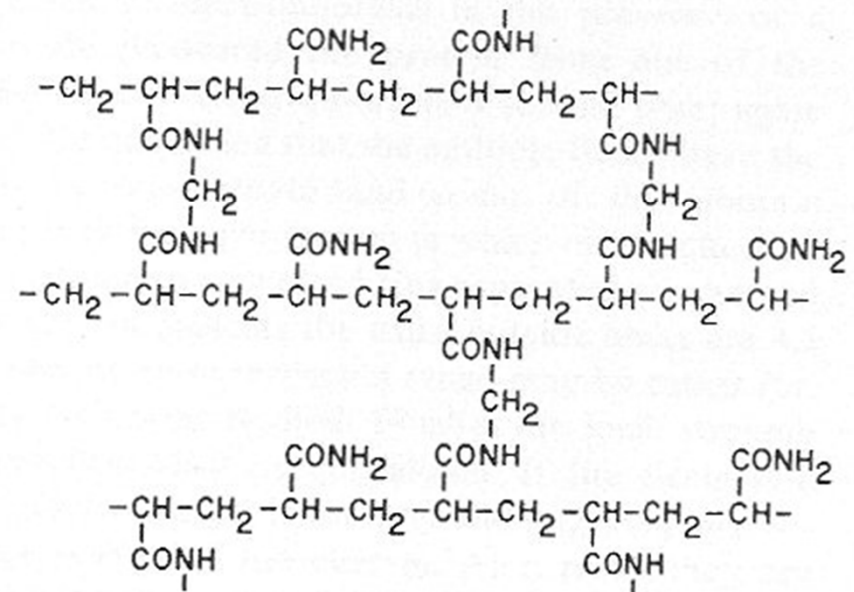
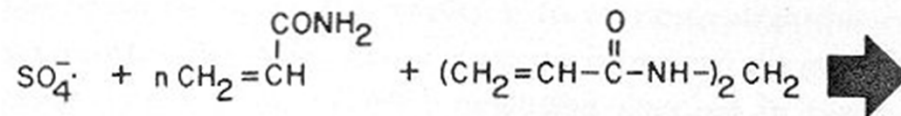
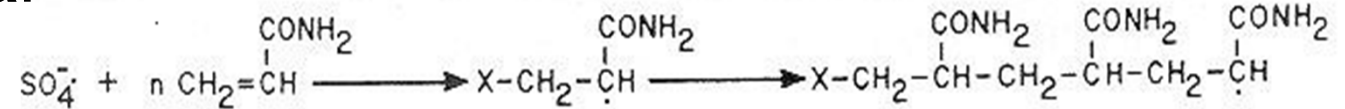
**Iniziatore: ammonio persolfato,**

estere disolfato dell'  $\text{H}_2\text{O}_2$  che omolisa

rapidamente a radicali liberi.  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + e^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\cdot -}$

**Reazione a catena:**

i monomeri di  
acrilamide  
polimerizzano a  
formare lunghe  
catene.



Perché si formi il gel è  
necessario l'agente cross-linker.



## **Porosità del gel:**

dipende dalle concentrazioni di acrilamide e di metilenbisacrilamide.

**3 - 30%** di acrilamide → porosità 2 - 0,5 nm

## **Tampone TBE:**

**Tris, acido borico, EDTA.**

> potere tamponante e > ddp applicabile (8 Volt/cm)

## VANTAGGI

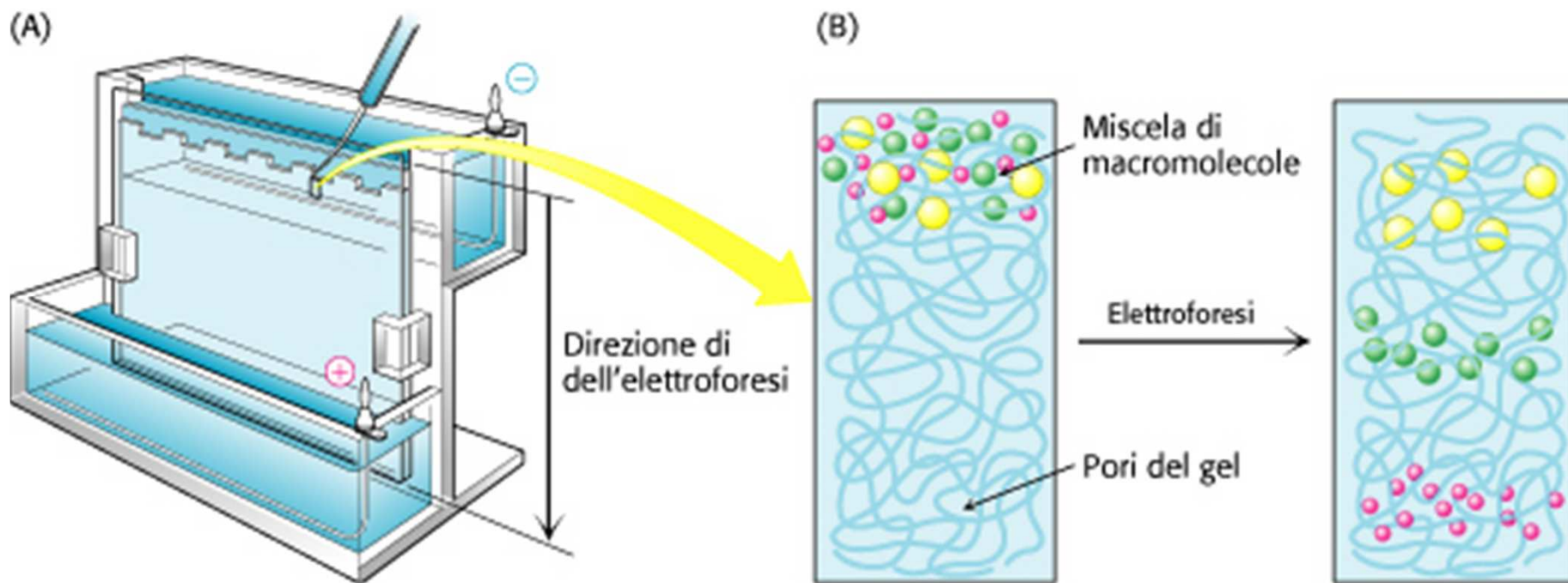
- maggiore efficienza nel separare piccoli frammenti di DNA (da 5 a 2000 bp)
- elevato potere risolutivo
- possibilità di analizzare maggiori quantità di DNA senza perdite significative di risoluzione
- possibilità di ottenere DNA estremamente puro

## SVANTAGGI

- neurotossicità dell'acrilamide che può essere assorbita dalla pelle
- preparazione più lunga e laboriosa del gel di agarosio

# DIFFERENZE PRATICHE

- Corse elettroforetiche in **verticale**.



## DIFFERENZE PRATICHE

- Corse elettroforetiche in **verticale**.
- L'aria (bolle nel gel) non solo ostacola il passaggio della corrente, **impedisce** anche la **polimerizzazione**.
- Necessario un **lavaggio** dei pozzetti per eliminare residui di acrilamide e **spessore** del gel.
- Tampone **TBE**
- **Gel-loading-buffer**: usato per il caricamento e costituito da xilen-cianolo, blu di bromofenolo e glicerolo/saccarosio che ha la duplice funzione di addensare il campione per facilitarne l'entrata nel pozzetto e di fornire indicatori di corsa.
- Utilizzo del bromuro di etidio **successivo** alla corsa elettroforetica. Possibile perchè il gel è di **1 mm**, contro **1 cm** per l'agaroso.

# ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

- La > parte dei campioni di DNA comunemente analizzata per elettroforesi è più grande di una proteina, e in tale situazione l'agaroso risulta il sistema di elezione.

Agaroso 0.3%: doppie eliche da 5.000 a 60.000 bp

Agaroso 2%: doppie eliche da 100 a 3.000 bp

- DNA a singolo frammento più flessibile di quello a doppia elica.

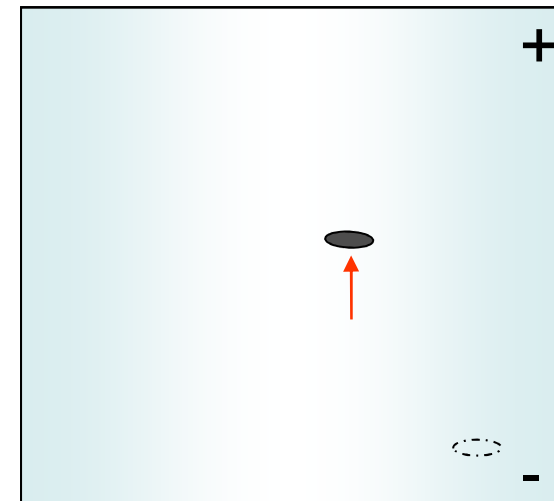
- **Colorante** (**orange**, **blu di bromofenolo**, **xilen-cianolo**) nel campione: come addensante ed indicatore del fronte elettroforetico.

- DNA a doppia elica può esser confrontato/**misurato** con un **marcatore di dimensioni** (DNA fagici o plasmidi frammentati per restrizione enzimatica ).

# ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

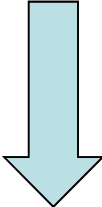
- Separa DNA anche di **2.000.000 bp** (cromosomi!).  
Gli altri metodi max 60.000 bp.

- Su agaroso, con 2 campi elettrici, applicati con angoli diversi ed alternativamente.

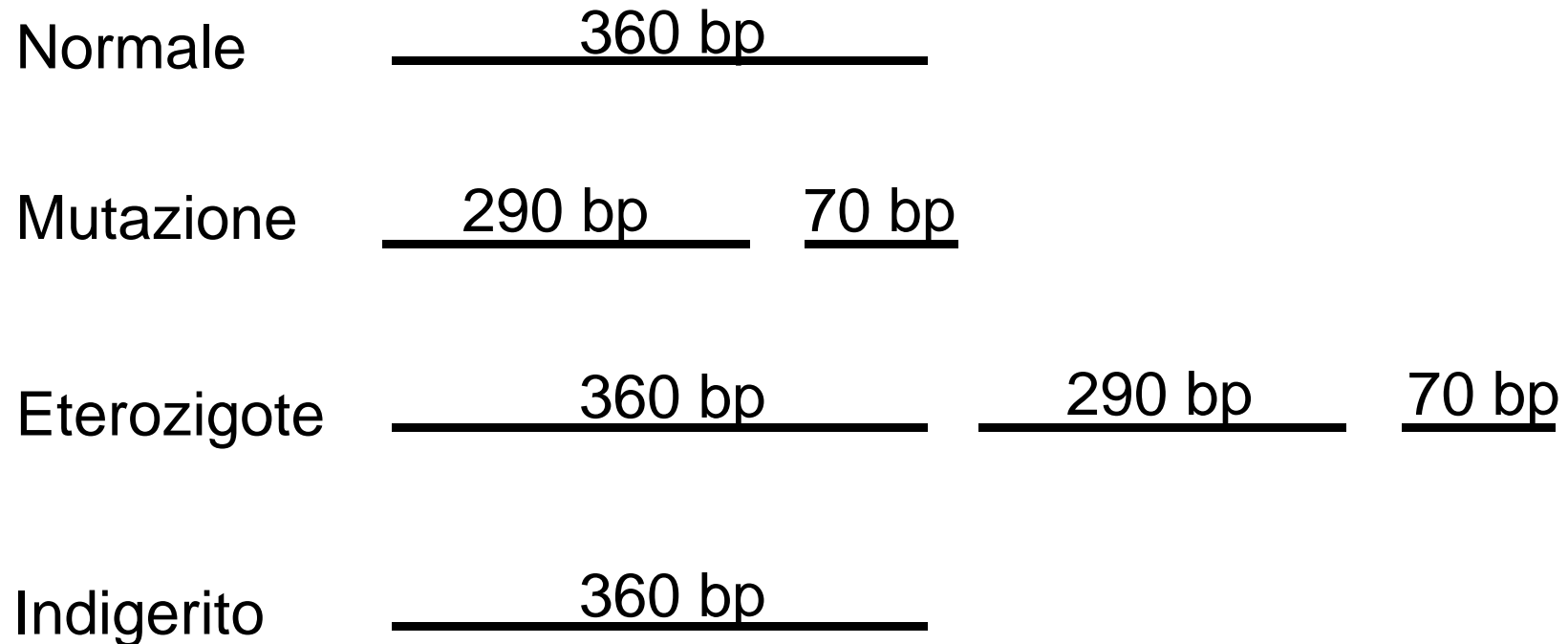


- DNA più piccoli si riallineano prima al nuovo campo e migrano + velocemente attraverso il gel.
- DNA più grandi posson anche risultare immobili.

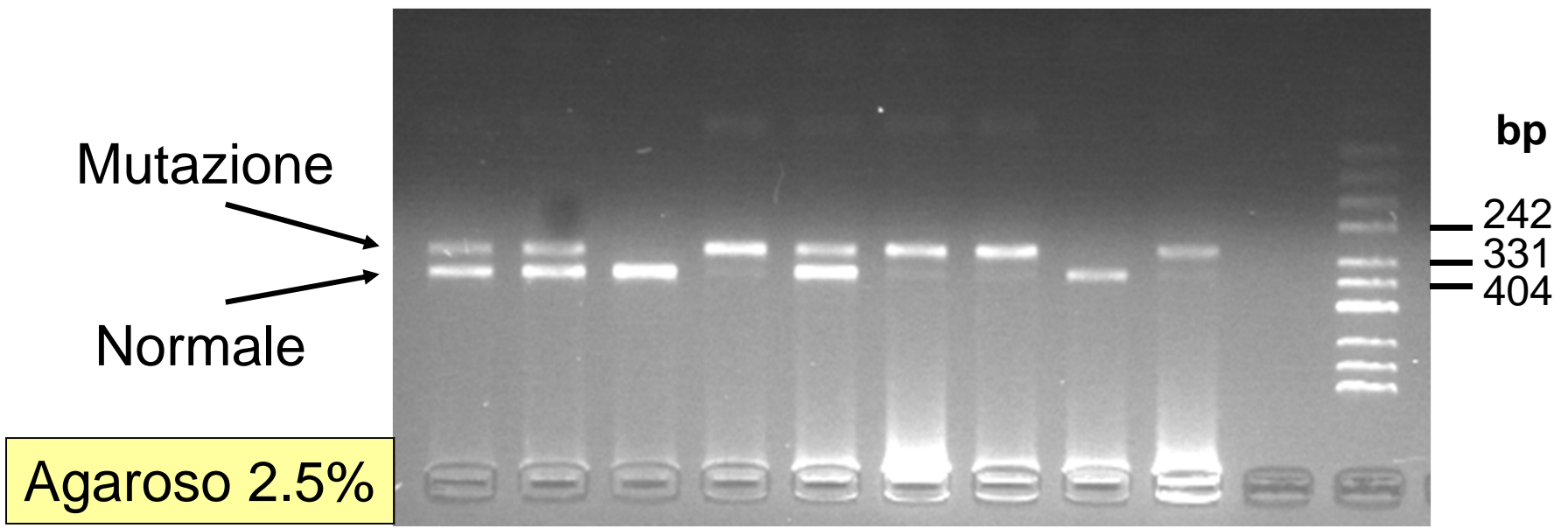
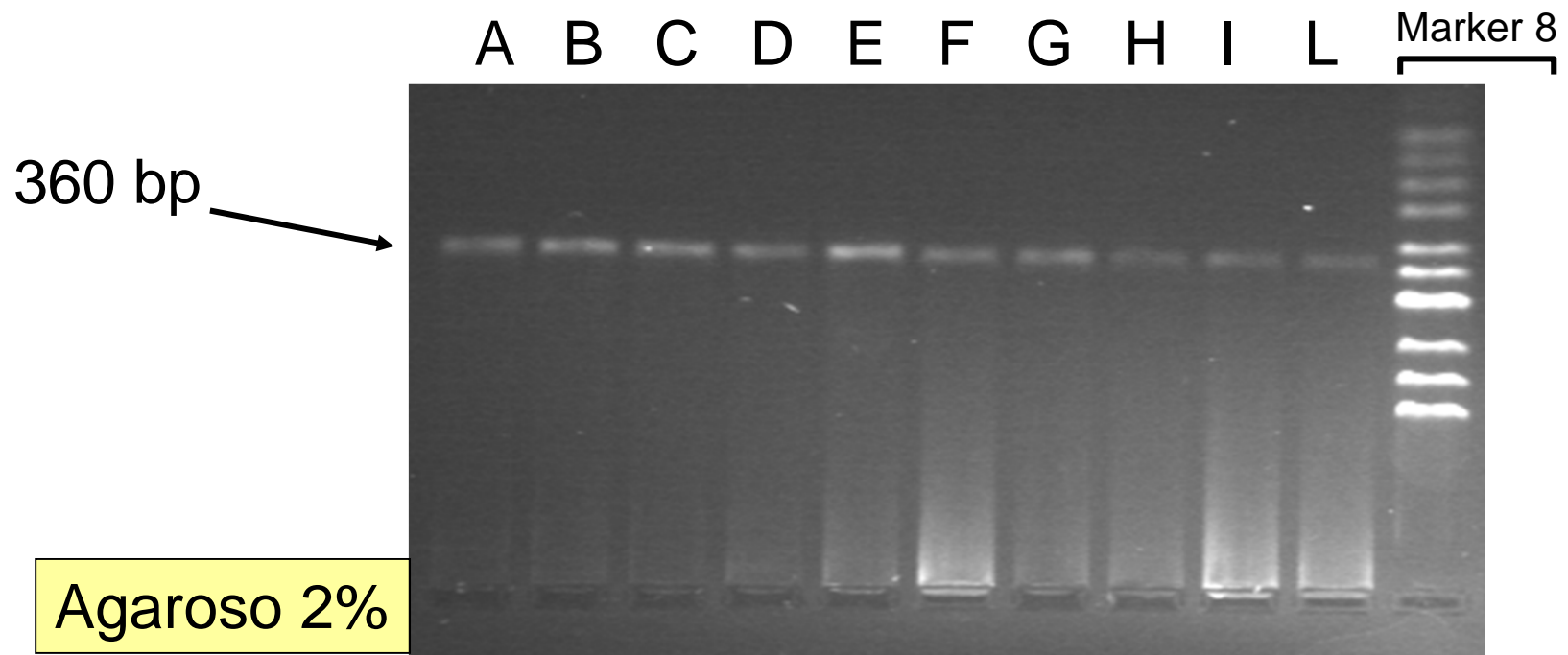
## ELETTROFORESI DI RNA

- Prevalentemente su gel di **agaroso**, per dimensione.
- Usata per verificare l'integrità dell'RNA e l'assenza di DNA come contaminante, prima di proceder con altri studi.
- Quando occorra + risoluzione, si passa alla PAA; es. Separazione RNA transfer 4S dall'RNA ribosomiale 5S.
- **Problema**: tendenza a formare strutture secondarie (es. a "trifoglio" dei tRNA)  

- Utilizzo di denaturanti nel gel e nel tampone di corsa (es. **formaldeide**).

# Restrizione enzimatica (Mlu I)







# Protocollo di digestione

	Conc. finali	Volumi	
DNA			Quando il DNA proviene da una amplificazione da PCR se ne utilizzano 5 $\mu$ l. Se invece il DNA è plasmidico se ne digerisce 1 $\mu$ l.
Buffer	10%		
BSA	1%		
Enzima 10 U/ $\mu$ l	4 U/Campione		
H <sub>2</sub> O			
		25 $\mu$ L	

Tempo di digestione: X ore

Temperatura: X °C