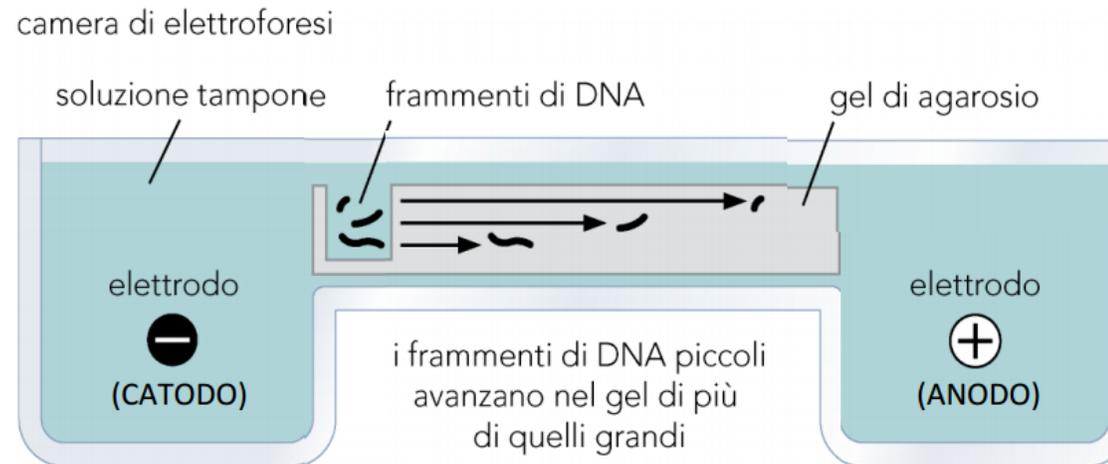


Analisi di topoisomeri

Elettroforesi su Gel di Agarosio

Permette la separazione delle molecole en base alla loro massa, dimensione e carica al interno di una matrice (agarosio) che presenta dei pori di una determinata dimensione.

L'applicazione di una corrente elettrica permette il passaggio delle molecole (cariche negativamente) attraverso i pori, con il limite della loro dimensione.



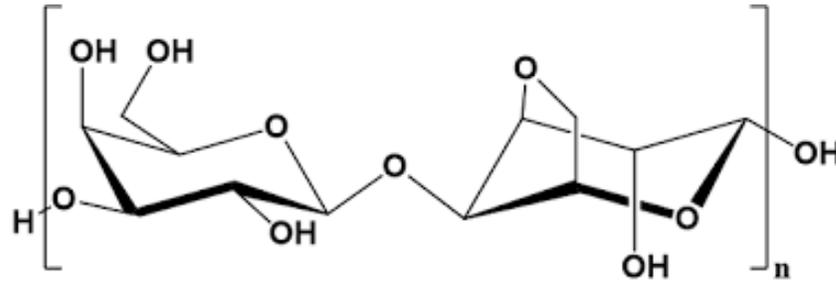
Analisi di topoisomeri

Elettroforesi su Gel di Agarosio

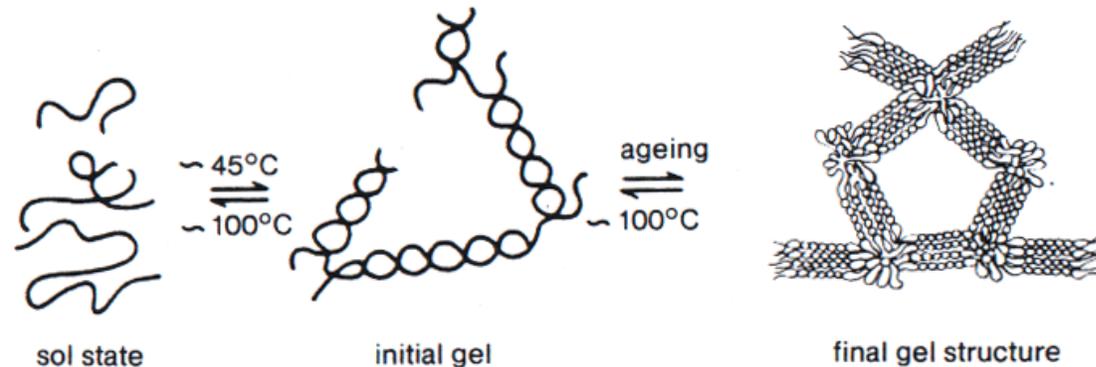
- Agarosio + tampone di corsa
- Camera elettroforetica con pettine per creare dei pozzetti
- Power supply / generatore di corrente
- Campioni di DNA

AGAROSIO

- L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici.



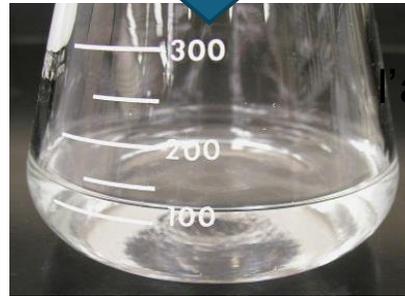
- L'agarosio è **solubile** in acqua alla **temperatura di ebollizione**, raffreddandosi forma una matrice mediante legami a idrogeno tra le catene lineari



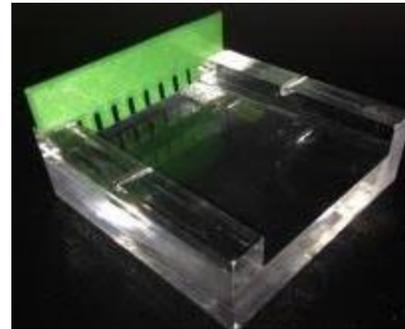
La dimensione dei pori della matrice dipenderà della concentrazione di agarosio



Bollire agarosio



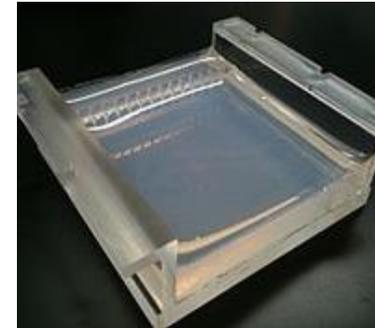
+ o - molecola
intercalante del DNA



Pettine per formazione
pozzetti di caricamento

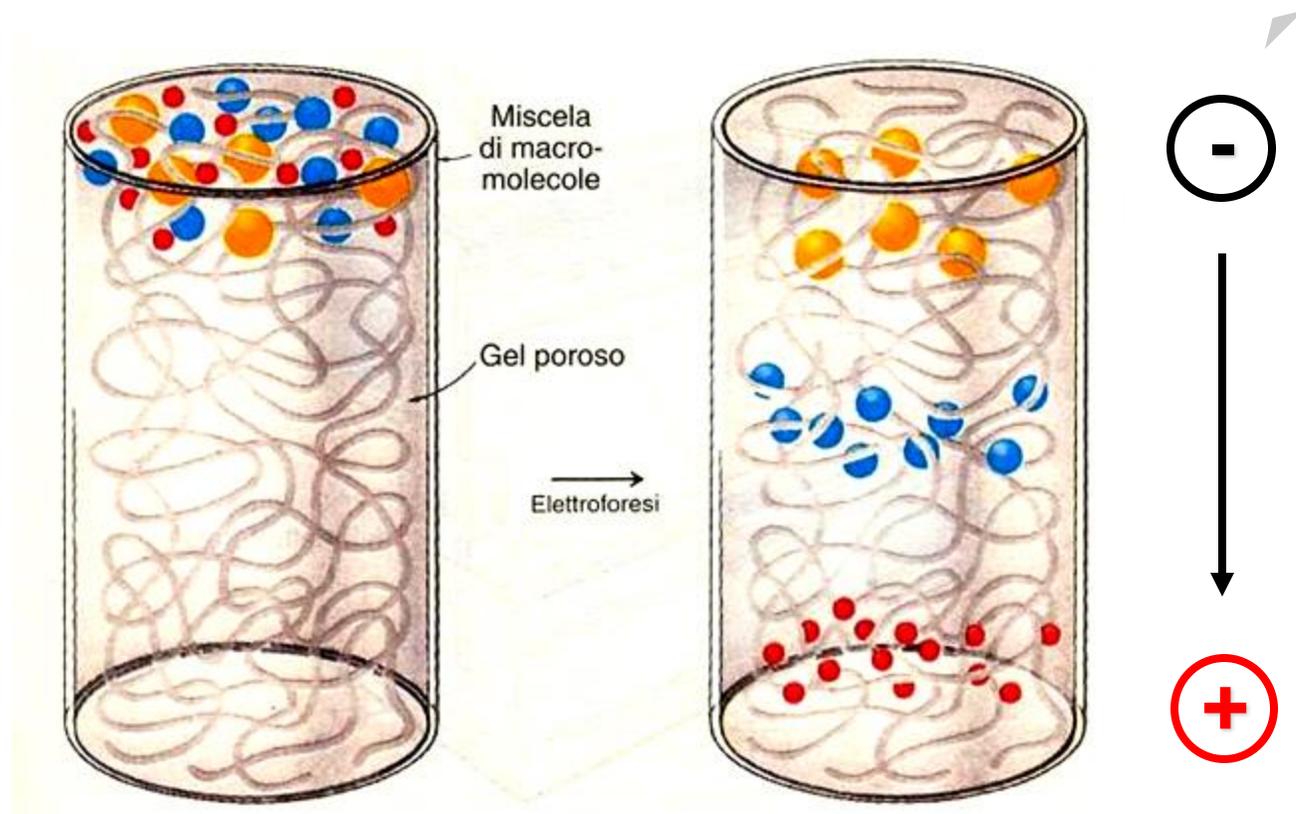
Dopo pochi
minuti

l'agarosio solidifica

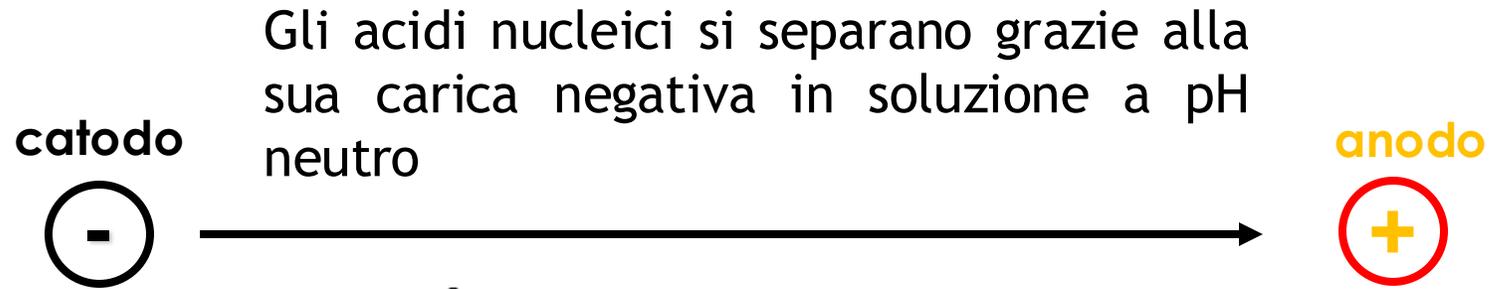


GEL di AGAROSIO

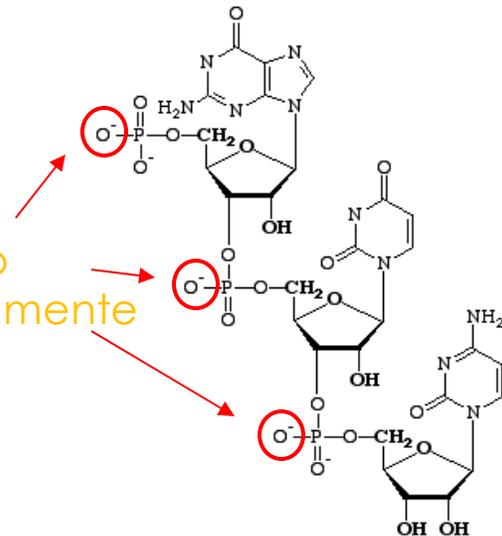
Effetto "setaccio" in un gel uniforme



SEPARAZIONE ACIDI NUCLEICI: elettroforesi in GEL di AGAROSIO



RNA e DNA sono
carichi negativamente



Dimensione DNA

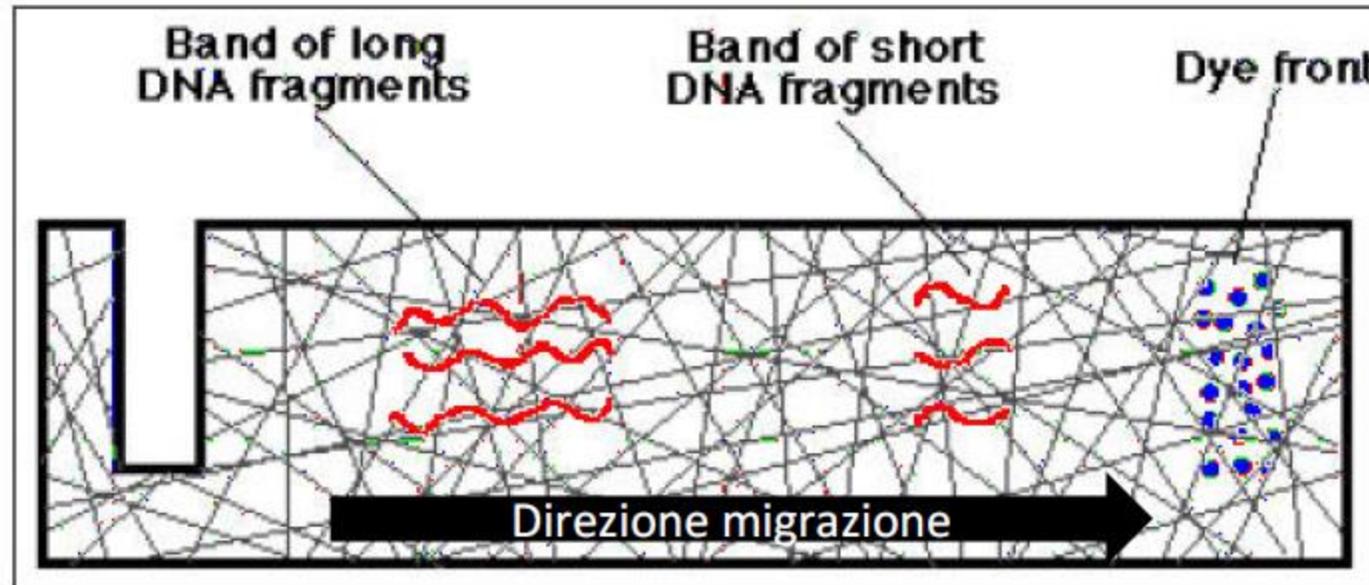
(pb: Paia di basi)

relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- molecole grandi migrano lentamente

- molecole piccole migrano velocemente

(pm: Peso molecolare)



Concentrazione agarosio

Consente la separazioni di molecole di grandi dimensioni: 0.1 - 20 kb

Normalmente si usano gel contenenti dal 0.5% al 2% agarosio in un buffer di corsa (TAE or TBE)

<u>Concentrazione agarosio</u>	<u>Risoluzione</u>
0.8% :	0.5 – 20 kb
2% :	0.1 – 3 kb

Se si usa meno agarosio, es. 0,5%, la migrazione dei frammenti <2.000 bp non sarà abbastanza “ostacolata” dalla matrice e, quindi, questi migreranno alla stessa velocità senza nessuna separazione.

Viceversa, se si usa più agarosio, es. 2%, si osserverà una migliore separazione dei piccoli frammenti, perché anche questi saranno rallentati dalla matrice più concentrata. Tuttavia, a questa concentrazione qualsiasi frammento >3-4.000 bp non si muoverà più in modo efficiente e non si avrà nessuna separazione.

Tamponi elettroforesi DNA

I tamponi di corsa del DNA hanno lo scopo di **determinare e mantenere stabili il pH e la concentrazione di ioni.**

I tamponi più comunemente usati per l'elettroforesi sono il **TAE** e **TBE**.

T: Tris, che consente il mantenimento di un valore costante di pH della soluzione;

E: sta per **EDTA**, che chela i cationi divalenti, come il magnesio. Questo è importante, perché la maggior parte delle nucleasi richiede cationi divalenti per funzionare.

A o **B** sta per **acido Borico** o **Acetico** che forniscono l'appropriata forza ionica al tampone.

	Conc. di lavoro		Stock	
TAE	1X	0,04 M Trisacetato 0,001 M EDTA	50X	242 g Trisbase 57,1ml acido acetico 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0
TBE	0,5X	0,045 M Trisborato 0,001 M EDTA	5X	54 g Trisbase 27,5 g acido borico 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

????

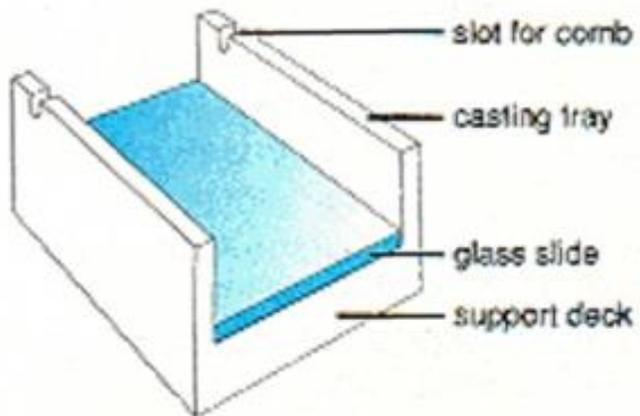
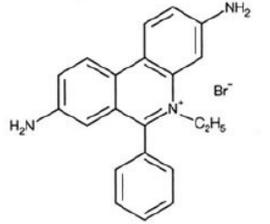
Preparazione gel agarosio

Si scioglie l'agarosio in polvere nel tampone di corsa a 100°C

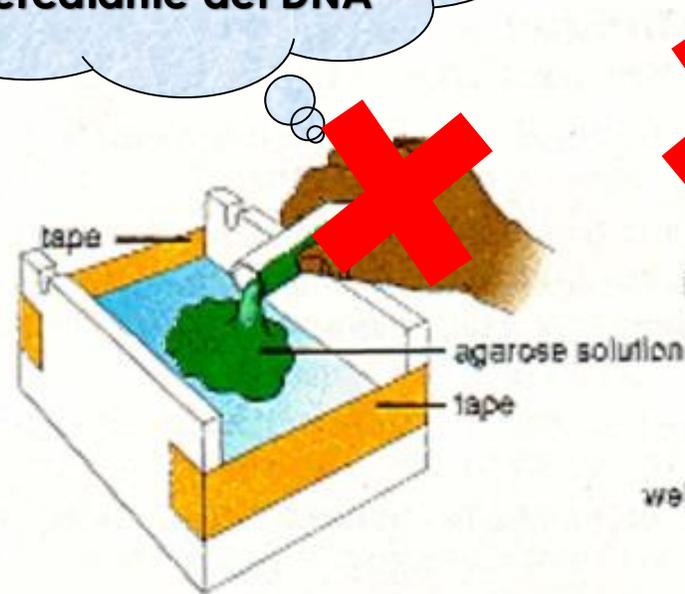
Alla soluzione d'agarosio si aggiunge un Intercalante del DNA

• Colorante fluorescente (intercalante) che consente di visualizzare il DNA

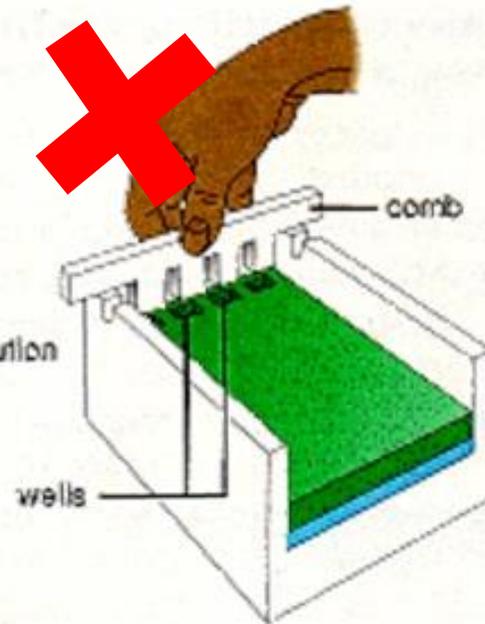
• Assorbimento a 254 nm (U.V.) ed emissione nel visibile (590 nm)



a. Casting tray for making gel slab



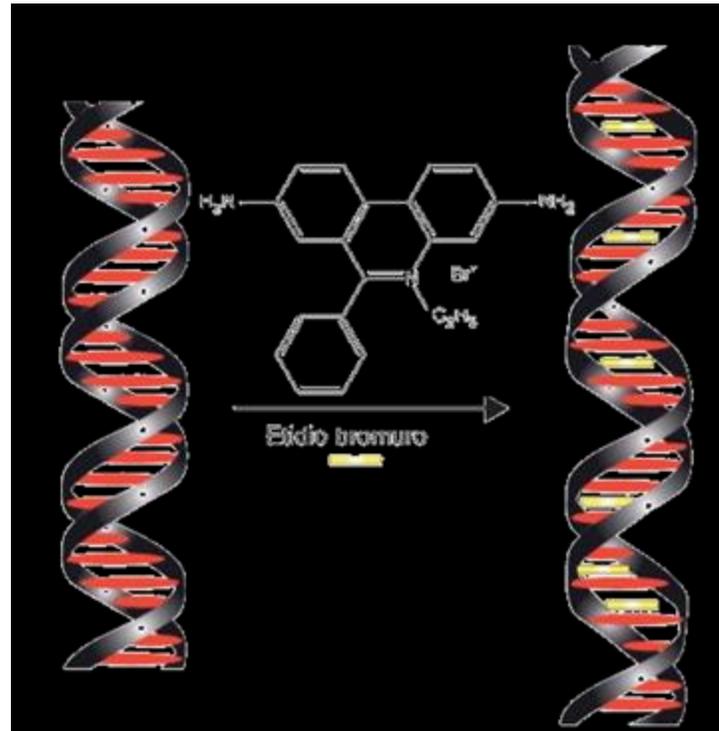
b. Agarose solution poured into casting tray



c. Comb that forms

Detezione DNA in gel: colorante fluorescente

- Etidio Bromuro



- ◉ SYBR® Safe DNA gel stain

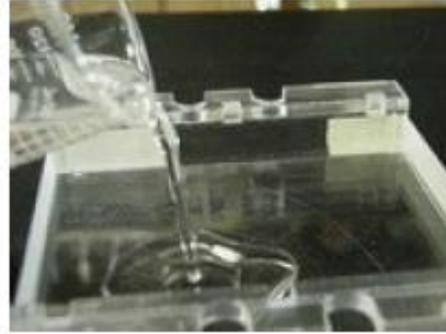
Possono essere aggiunti alla soluzione di agarosio prima di polimerizzare,
O dopo la corsa elettroforetica lasciando in incubazione il gel con il tampone
contenente le molecole intercalanti del DNA.

Preparazione del gel di agarosio

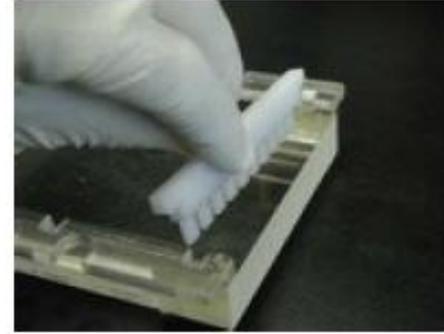
1



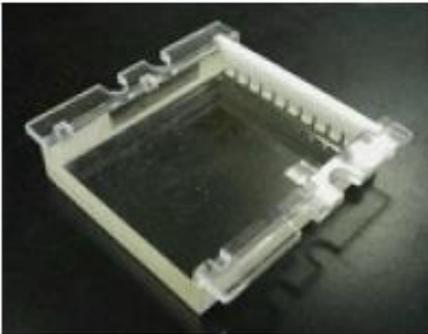
2



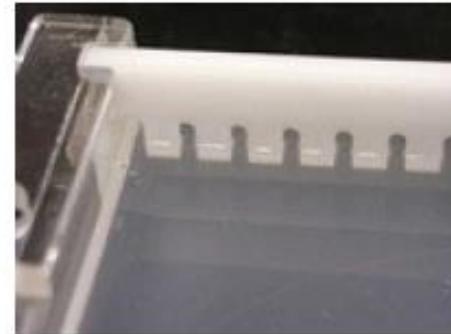
3



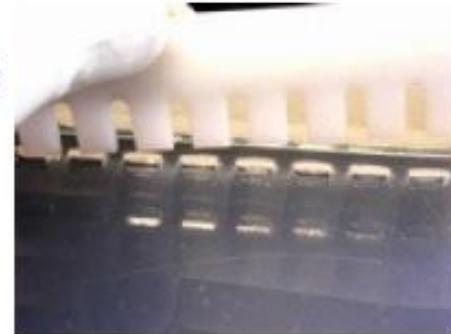
4



5



6



7



8



9

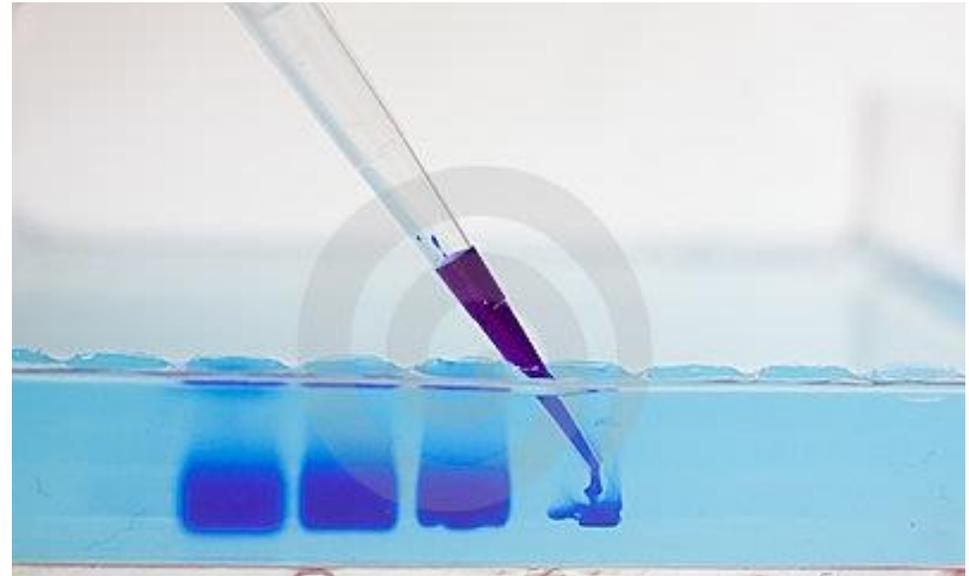


Sistema orizzontale

Preparazione dei campioni DNA per la corsa elettroforetica

Dopo la purificazione del DNA , il DNA sarà in soluzione acquosa

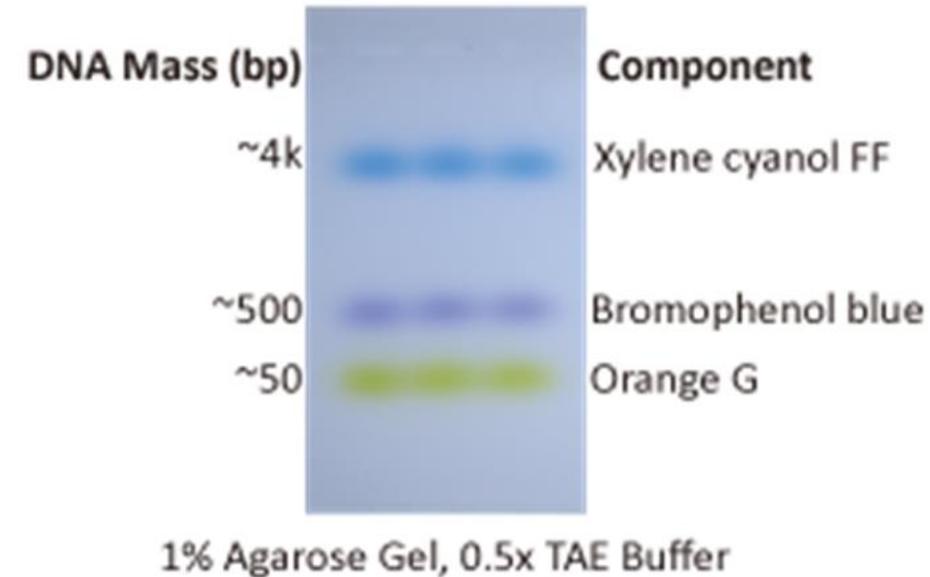
Questa, essendo di densità pari a quella del tampone, non riuscirebbe ad impedire che il campione “scappi” dal pozzetto durante il caricamento. Si aggiunge quindi per “appesantire” i campioni il tampone di caricamento (o loading buffer)



Composizione Tampone di caricamento:

Il tampone di caricamento contiene: coloranti + addensante (glicerolo, saccarosio, Ficoll).

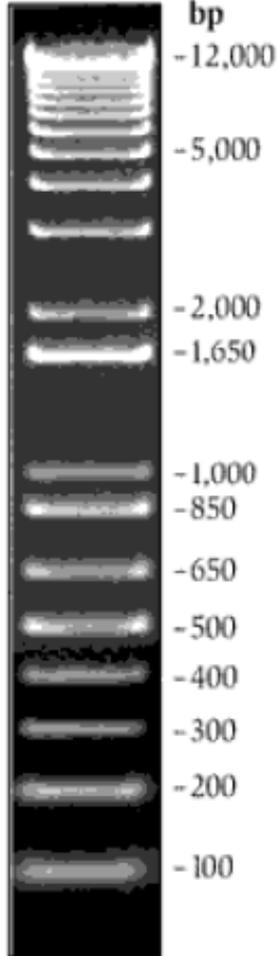
- ✓ L'addensante permette la loro permanenza nei pozzetti
- ✓ il colorante fornisce un marker visivo della progressione della corsa elettroforetica. Sono presenti delle molecole di differenti colori e dimensioni. Uno, il blu di bromofenolo, è più piccolo di quasi tutti i frammenti di DNA e, quindi, migrerà con i frammenti piccoli. L'altro, lo xilene cianolo, è una molecola grande, che migra insieme ai frammenti di più elevato peso molecolare. Si può perciò presumere che la maggior parte dei campioni migrerà nella zona interposta tra i due coloranti, cosicché quando il blu di bromofenolo sarà giunto in prossimità del fondo del gel, si potrà interrompere la corsa.



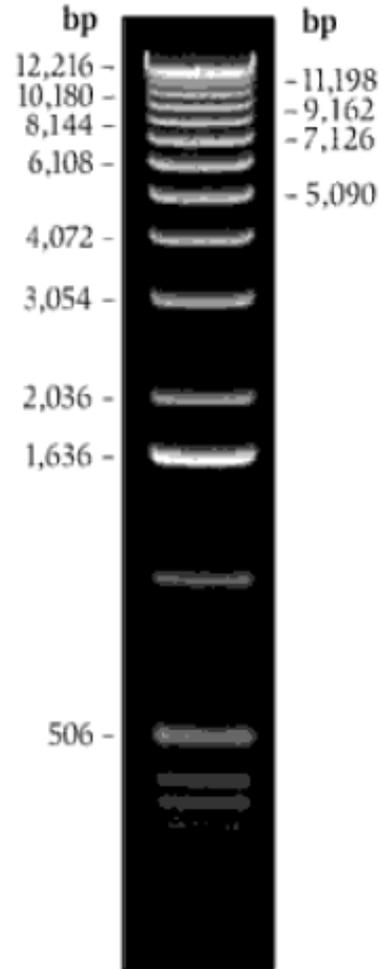
Concentrazione 6X?

Marcatori di dimensioni

1 Kb Plus DNA Ladder



1 Kb DNA Ladder

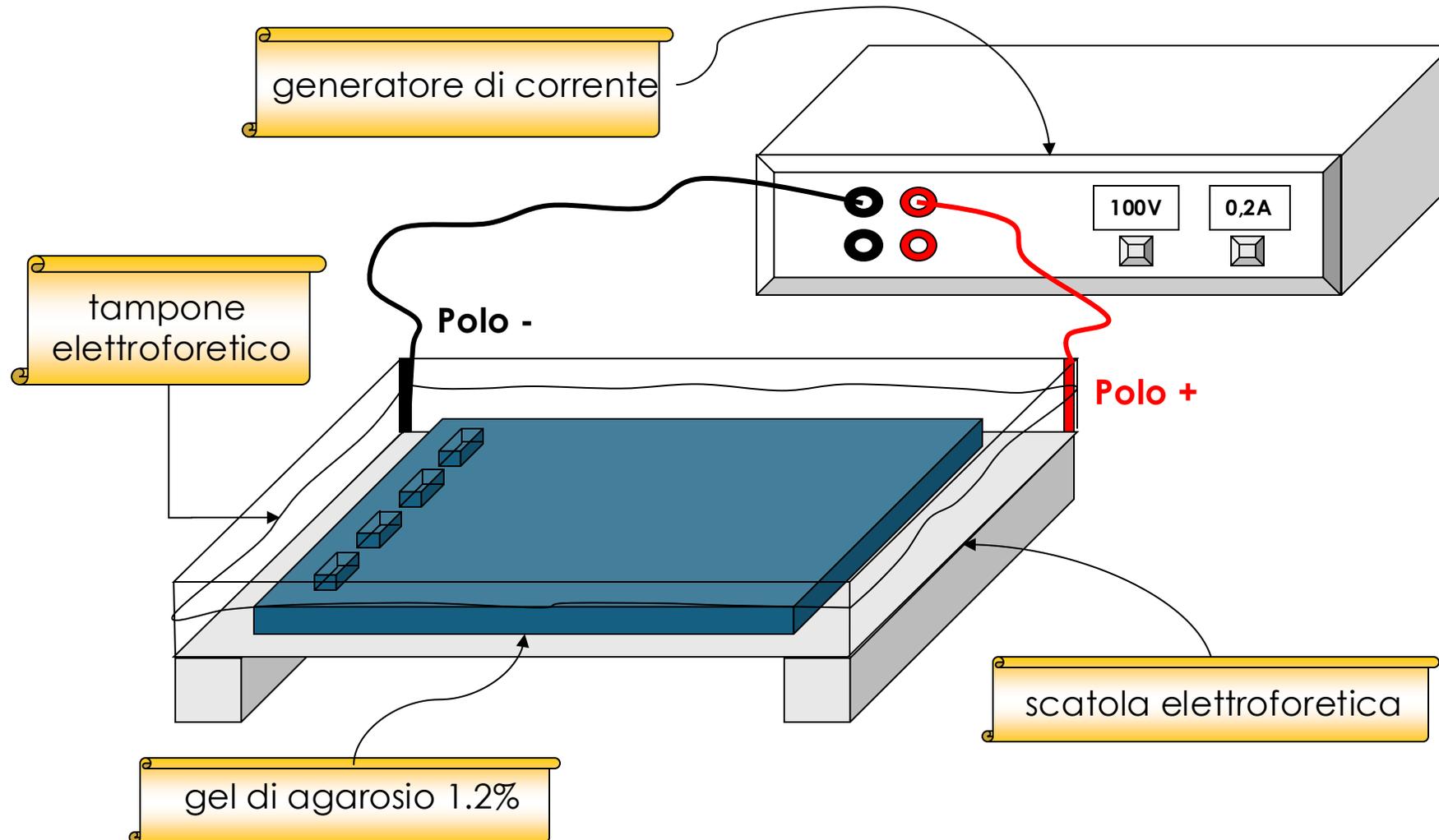


Marcatore di dimensioni:
È costituito da frammenti di DNA aventi dimensioni note e consente di determinare la dimensione del DNA campione

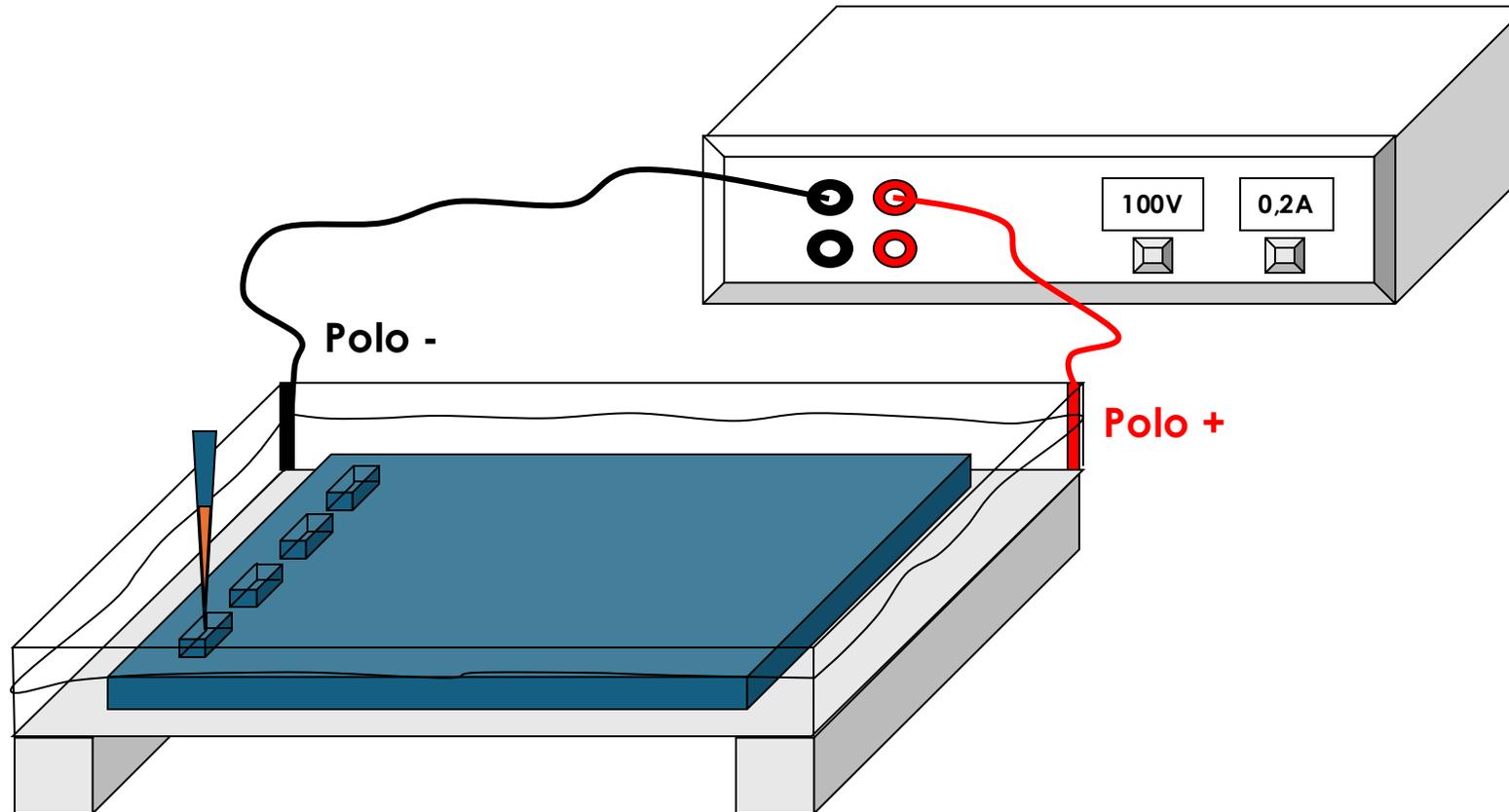


Viene fatto migrare insieme ai campioni di DNA come riferimento dimensionale

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

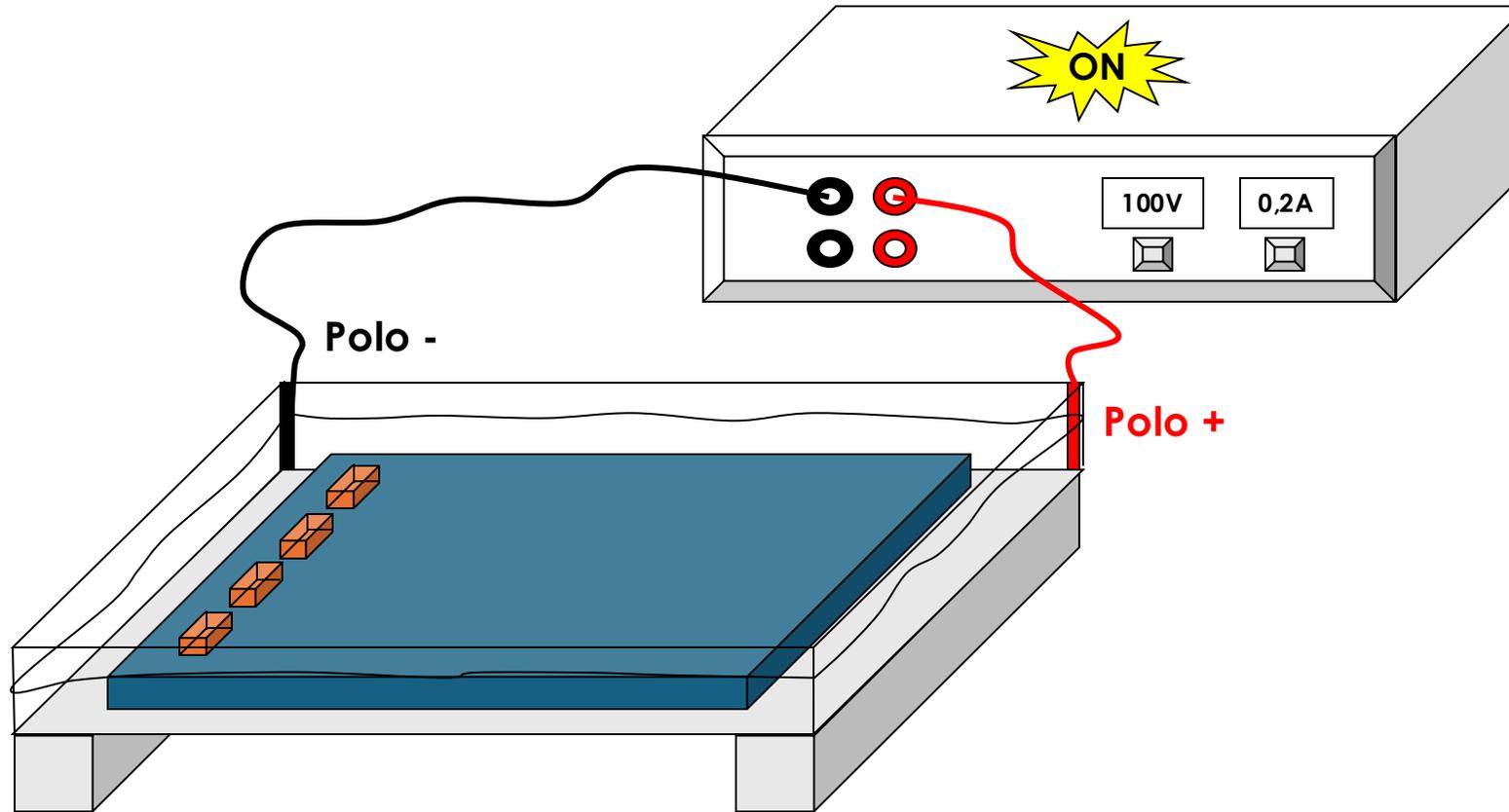


ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

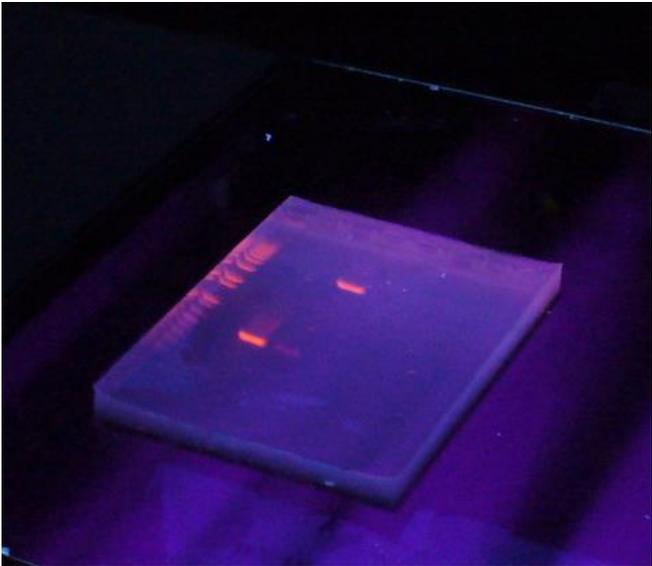
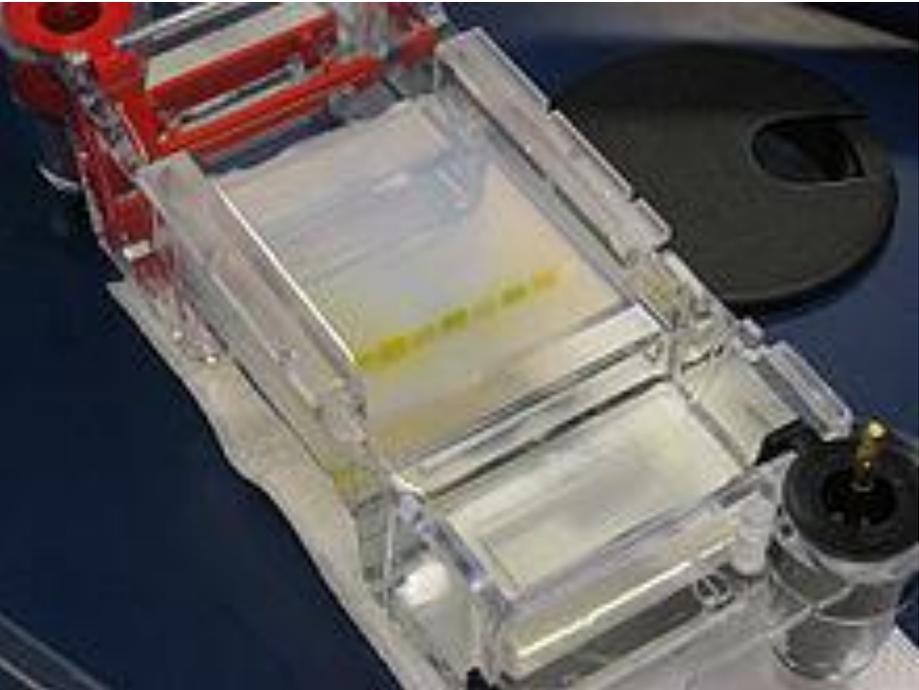


Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **xilene cianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

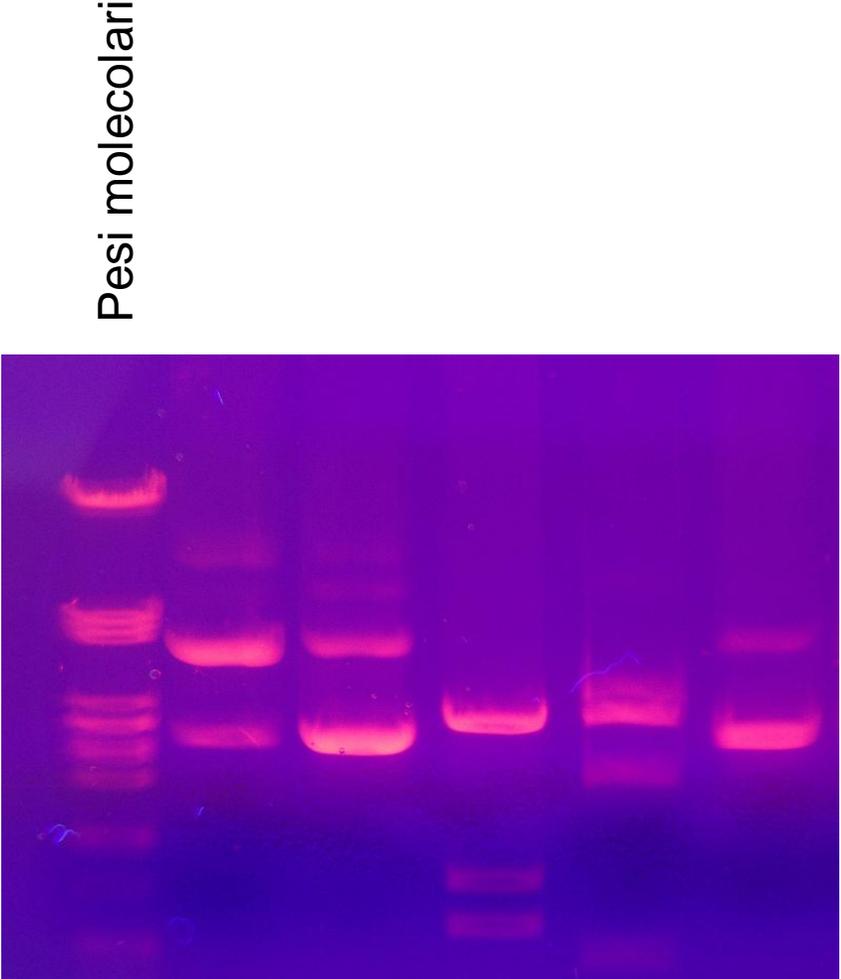
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



Visualizzazione DNA in gel di agarosio

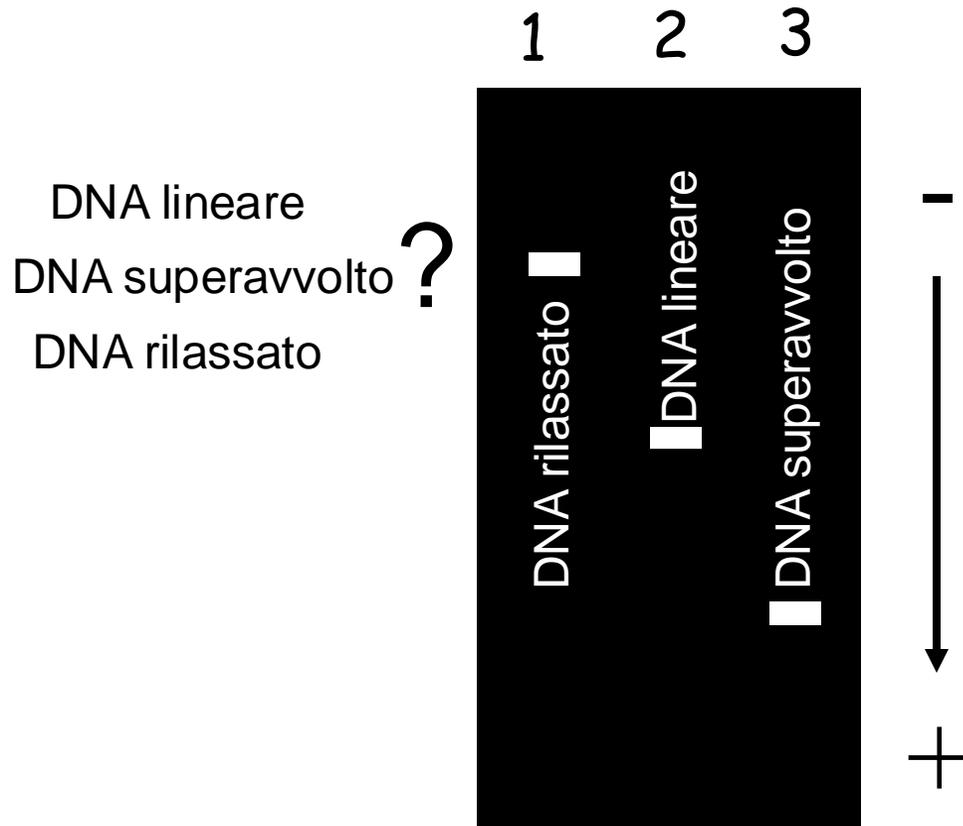


Transilluminatore luce UV



Pesi molecolari

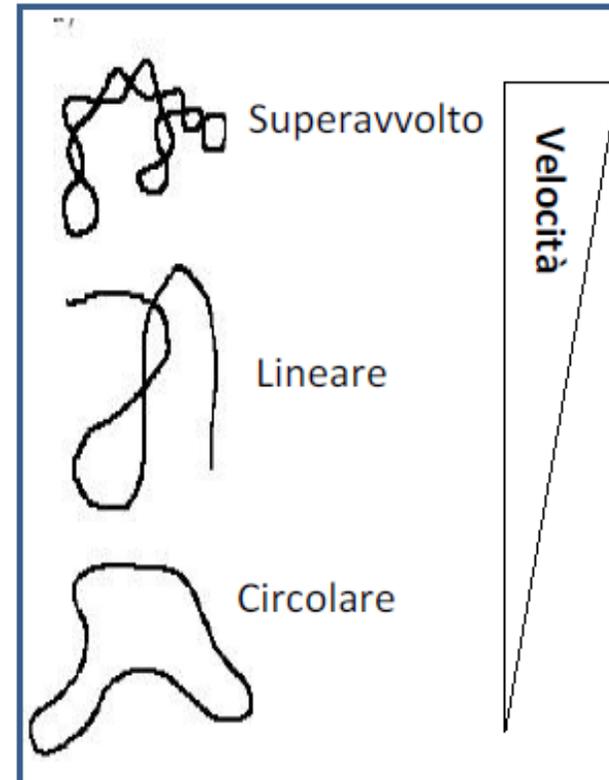
Come si separano fra di loro in gel di agarosio il DNA lineare, superavvolto e rilassato?

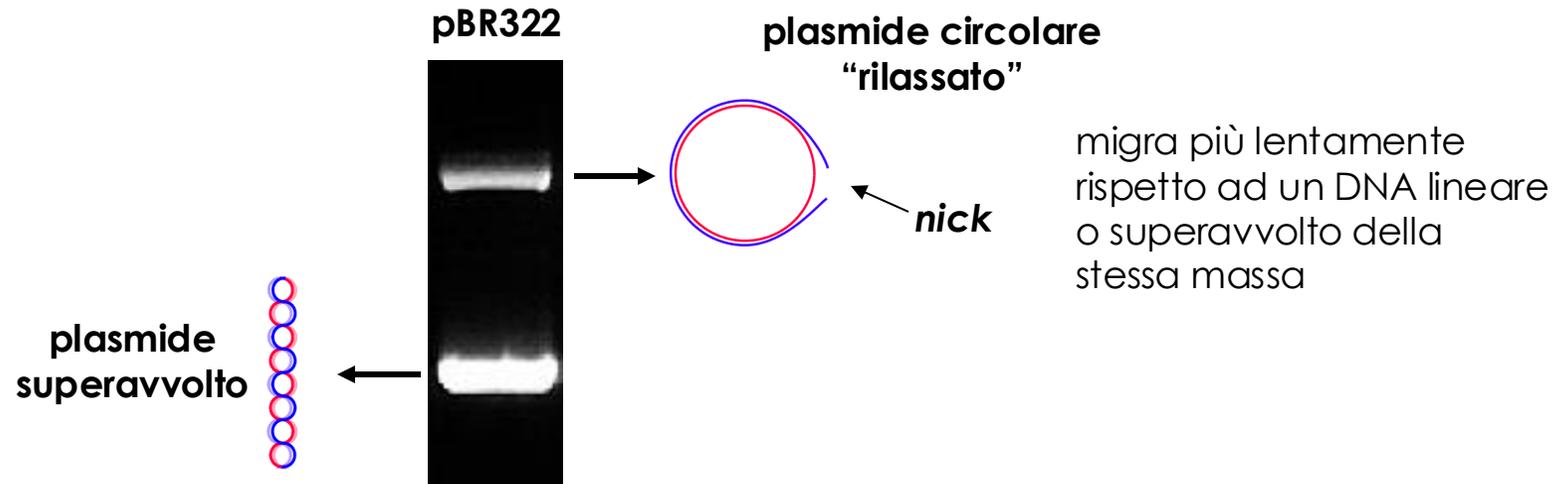


Conformazione del DNA

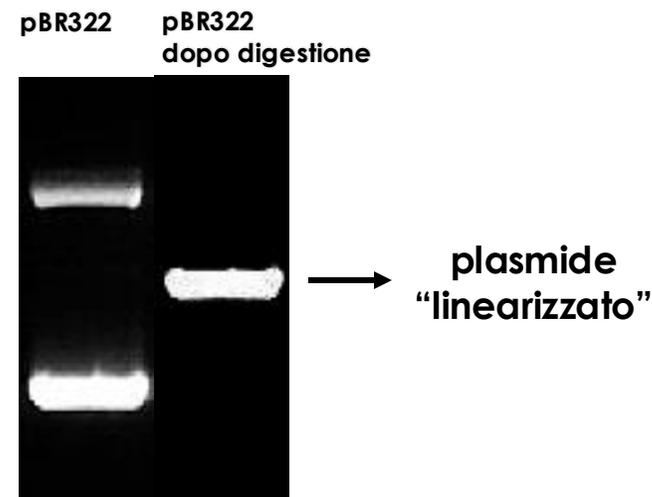
DNA superavvolto, lineare e circolare hanno velocità di migrazione diversa anche se di dimensione uguale:

- 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).



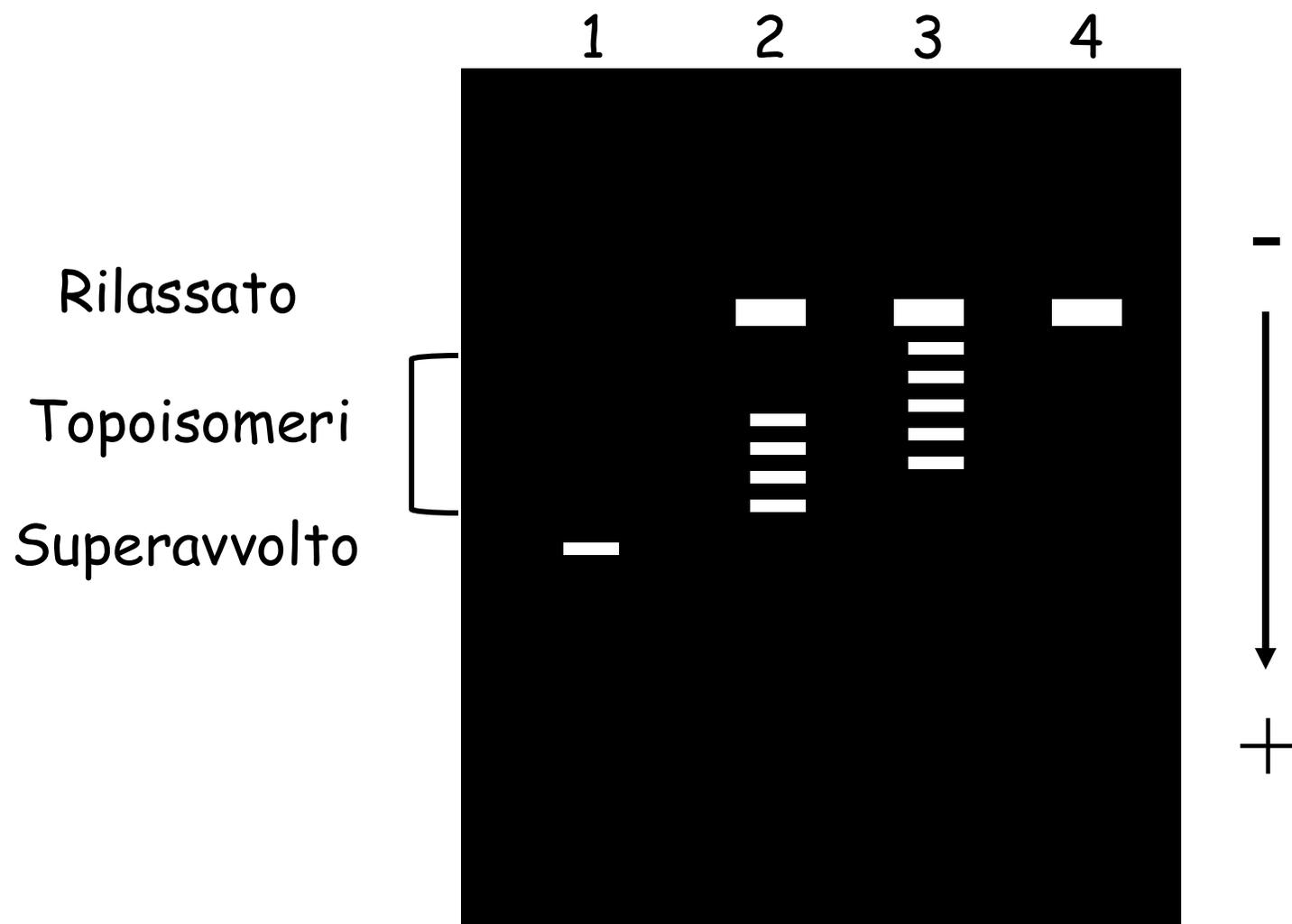


Sebbene le due forme abbiano le stesse dimensioni, esse migreranno in maniera differente

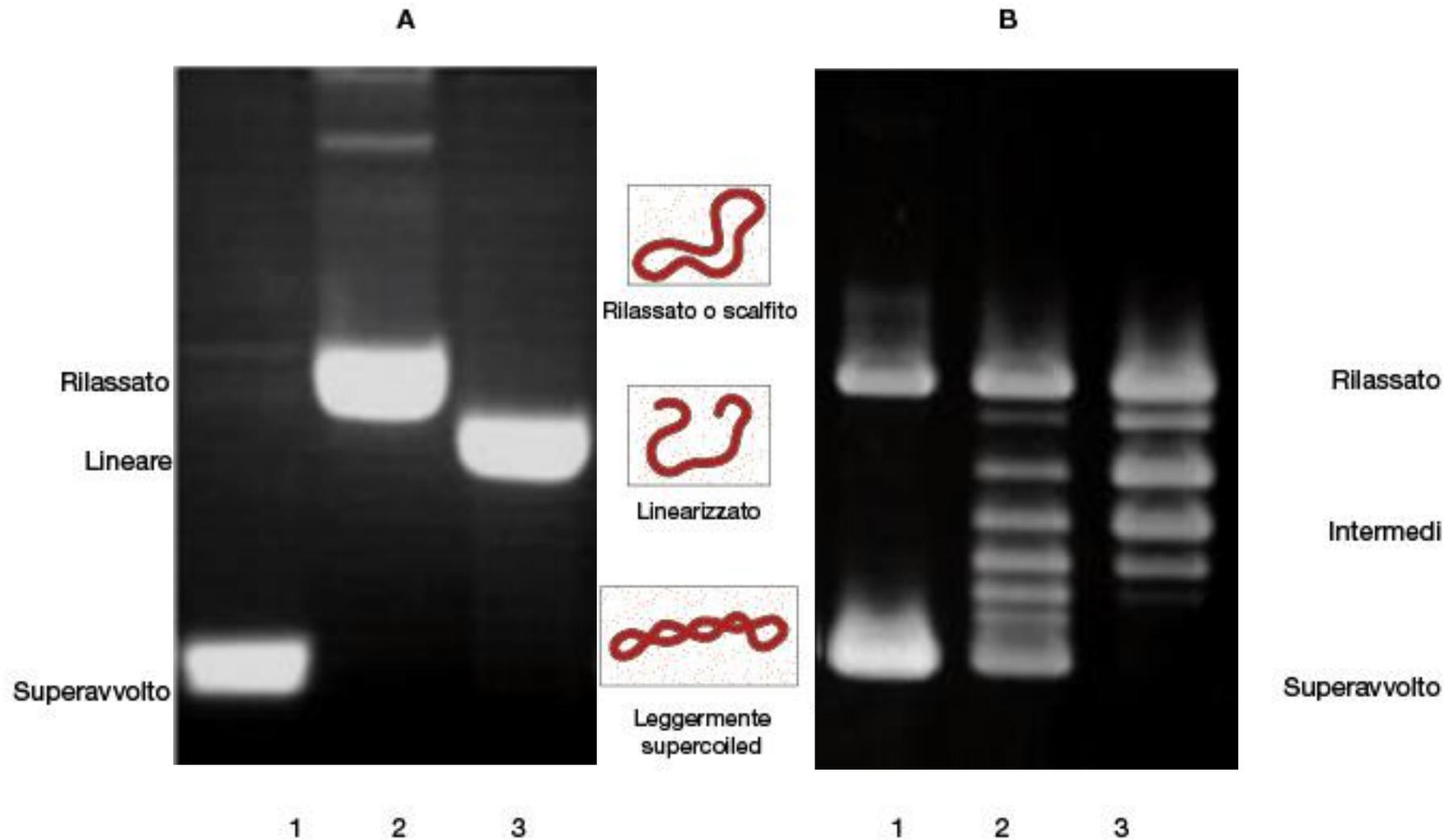


Come migrano I topoisomeri
all'interno del gel di agarosio?

Analisi dei topoisomeri su gel di agarosio



Analisi dei topoisomeri su gel di agarosio



DNA degradato in gel di agarosio

