

ESTRAZIONE DEL DNA/RNA

- Prelievo di tessuto o sangue
- Lisi delle cellule in una soluzione tampone contenente detergenti cationici (CTAB) o anionici (SDS) e agenti denaturanti quali urea e beta-mercaptoetanololo.
- Eliminazione delle proteine ed altri componenti lipofili con fenolo e/o fenolo cloroformio

ESTRAZIONE DNA/RNA

- Centrifugazione per formare doppia fase
- Prelievo fase acquosa
- precipitazione con alcoli (isopropanolo od etanolo)
- Centrifugazione e recupero del precipitato che viene solubilizzato in acqua ed analisi su gel

Metodi alternativi

- Lisi cellule in tampone di lisi
- Legame su colonnina a scambio ionico
- Lavaggi con soluzioni saline a diversa concentrazione (contenenti etanolo)
- Eluizione dalla colonna con acqua
- Analisi su gel

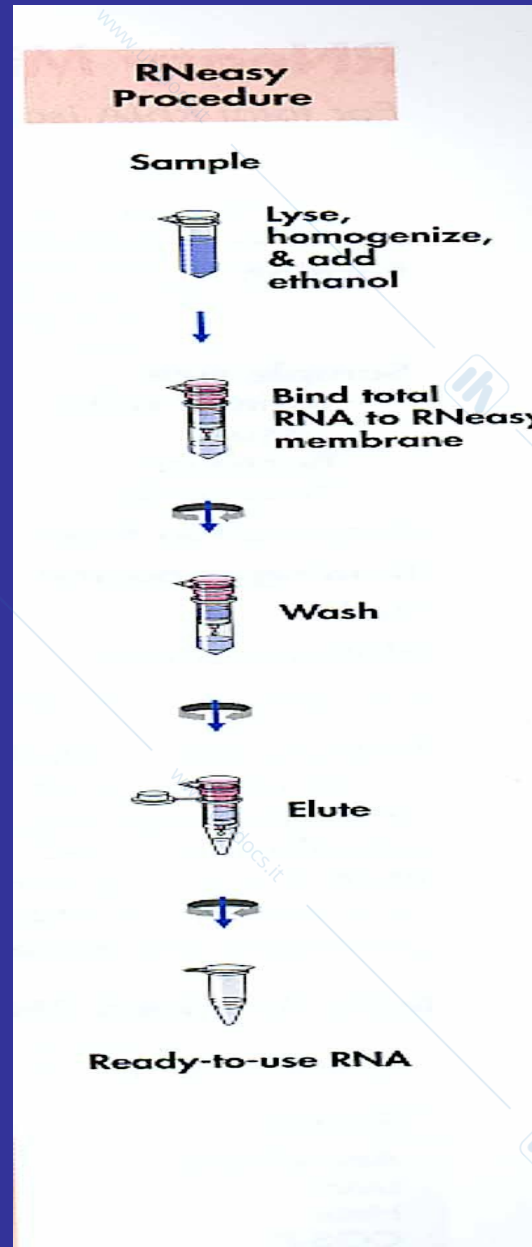
ANALISI DNA

- **Corsa elettroforetica**
- Digestione con enzimi di restrizione e successiva elettroforesi
- **Digestione DNA, elettroforesi, trasferimento su filtro ed ibridazione (SOUTHERN)**
- Polimerase Chain Reaction (PCR) e successiva analisi su gel di agarosio

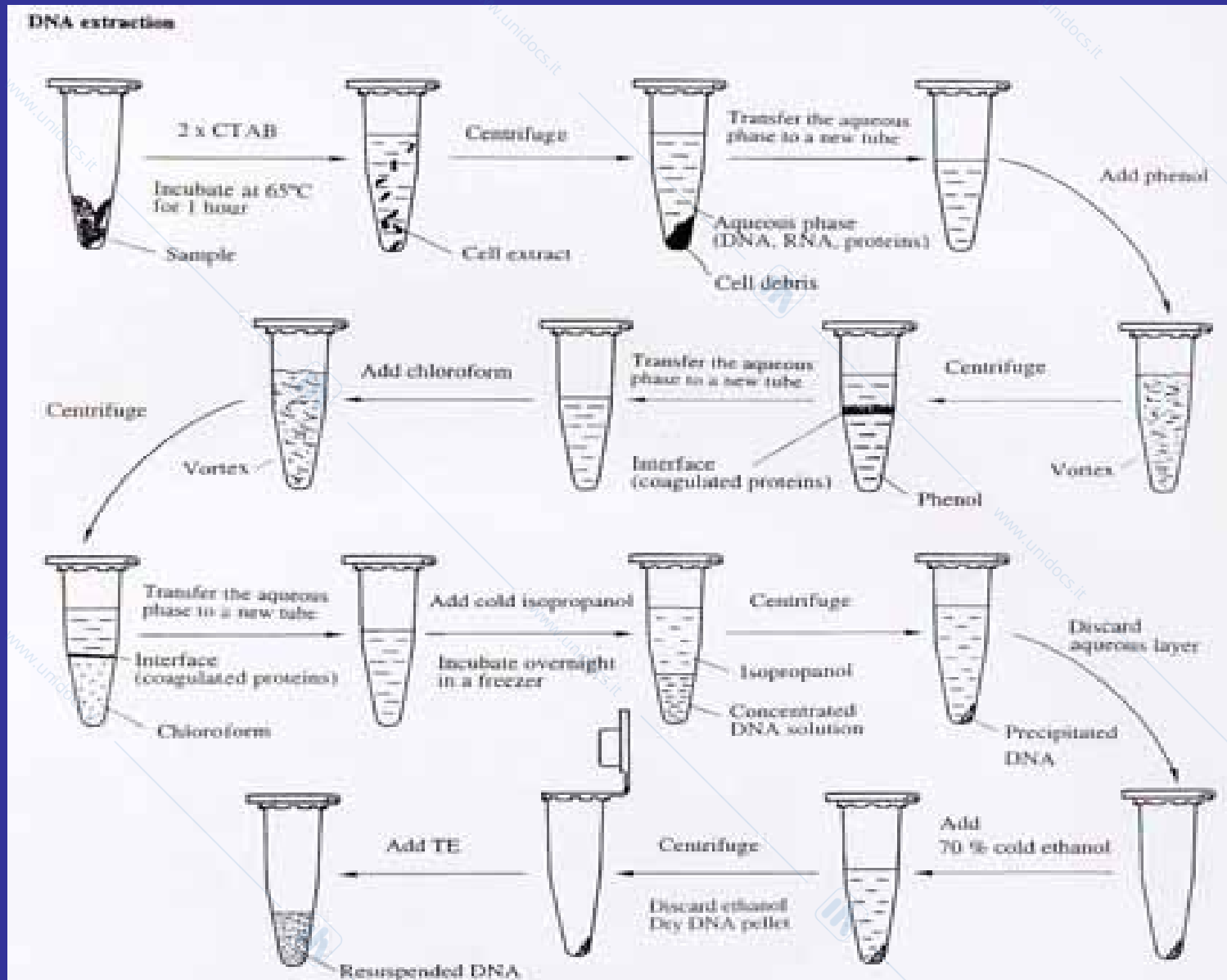
ANALISI RNA

- Corsa elettroforetica
- Elettroforesi, trasferimento su filtro ed ibridazione (NORTHERN)
- Trascrizione Inversa e Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) seguita da analisi su gel di agarosio

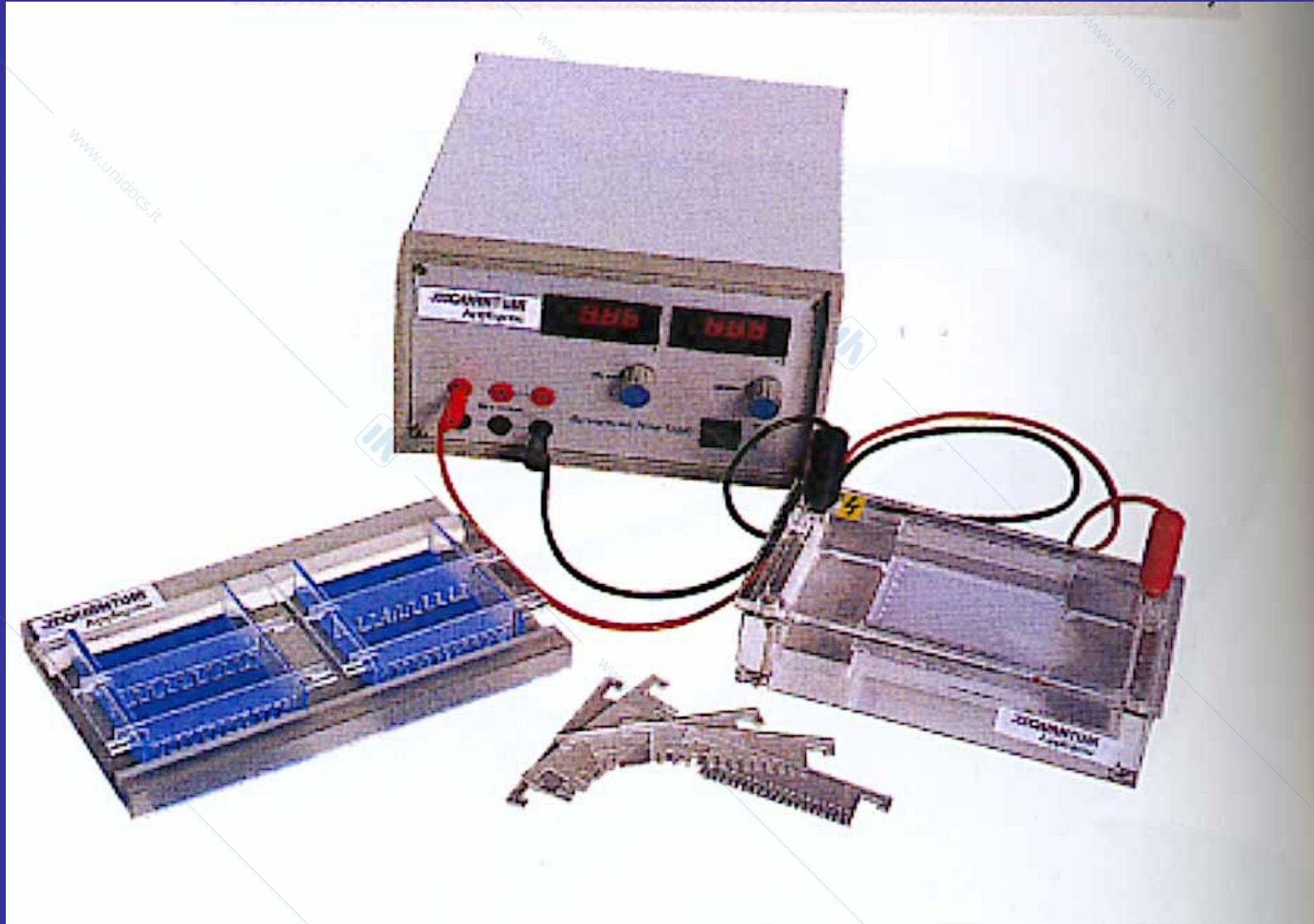
PROCEDURA DI ESTRAZIONE



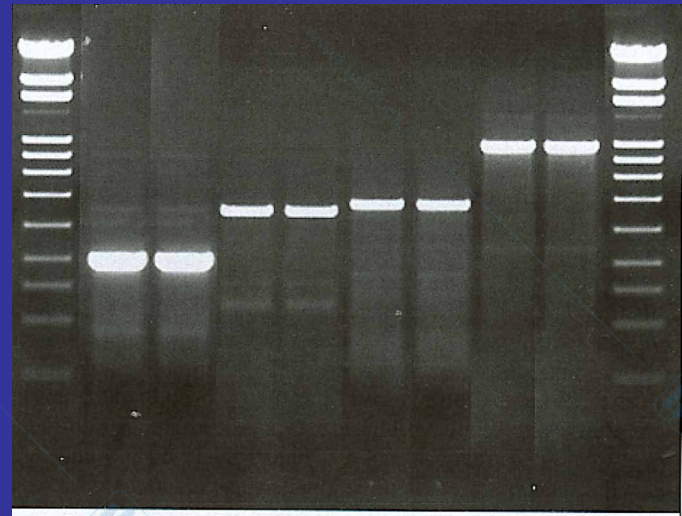
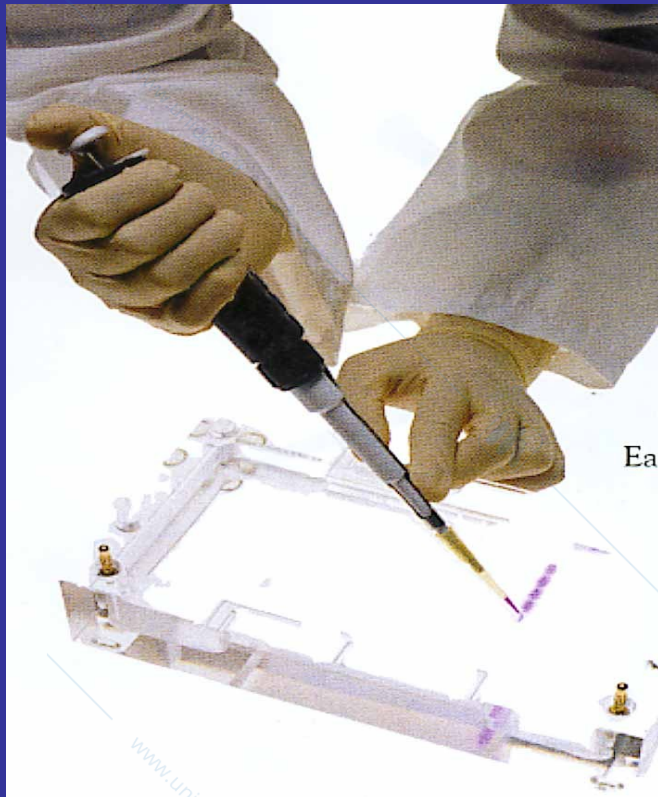
PROCEDURA DI ESTRAZIONE



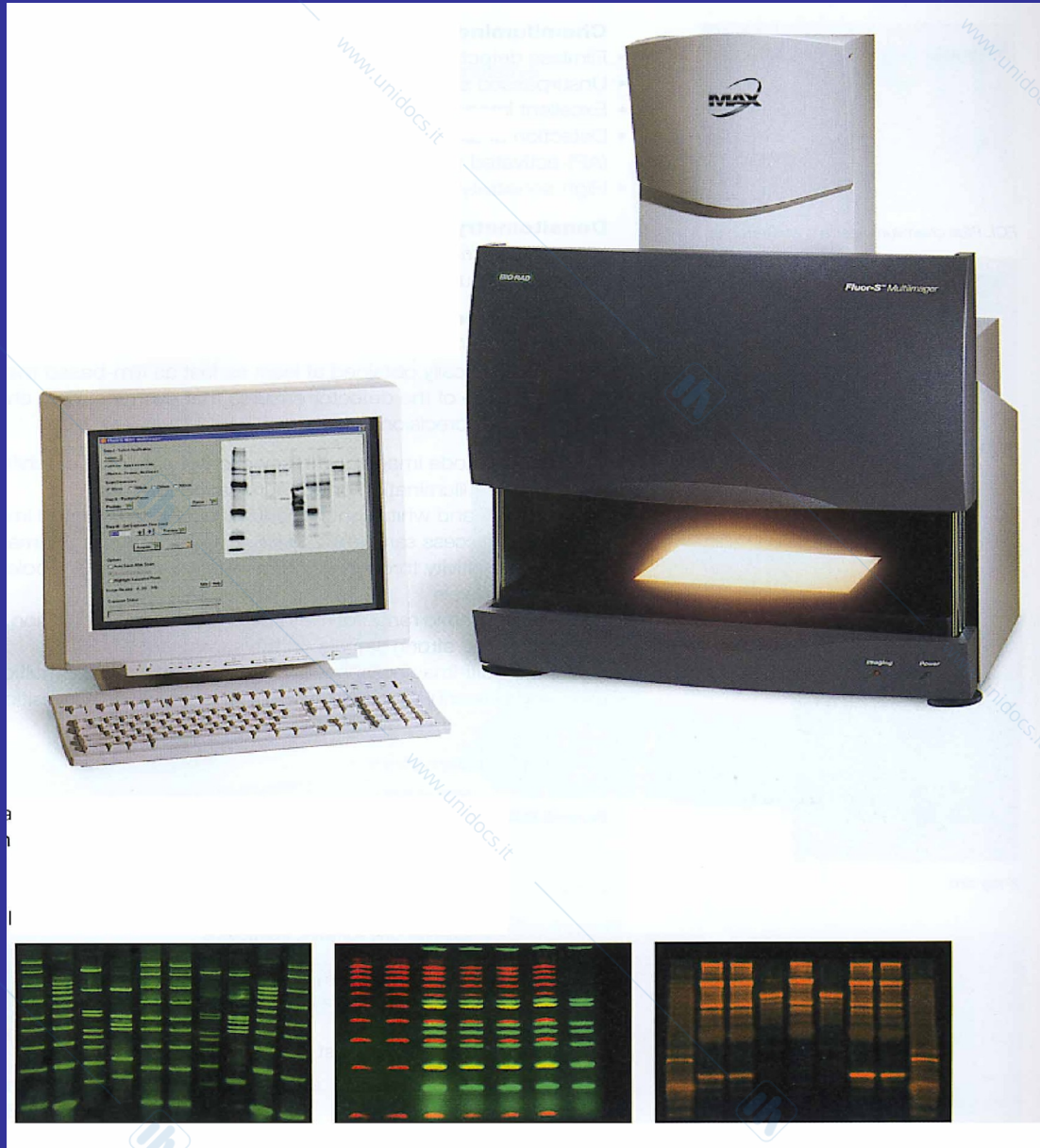
APPARATO PER ELETTROFORESI DI DNA/RNA



APPARATO PER ELETTROFORESI DI DNA/RNA



APPARATO PER ACQUISIZIONE CORSE ELETTROFORETICHE



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

ENZIMI DI RESTRIZIONE

10x
more

Mly I

#R0610S 1,000 units
#R0610L 5,000 units



Msc I

#R0534S 250 units
#R0534L 1,250 units
for high (5X) concentration, order #R0534M (1,250 units)



Mnl I

#R0163S 250 units
#R0163L 1,250 units



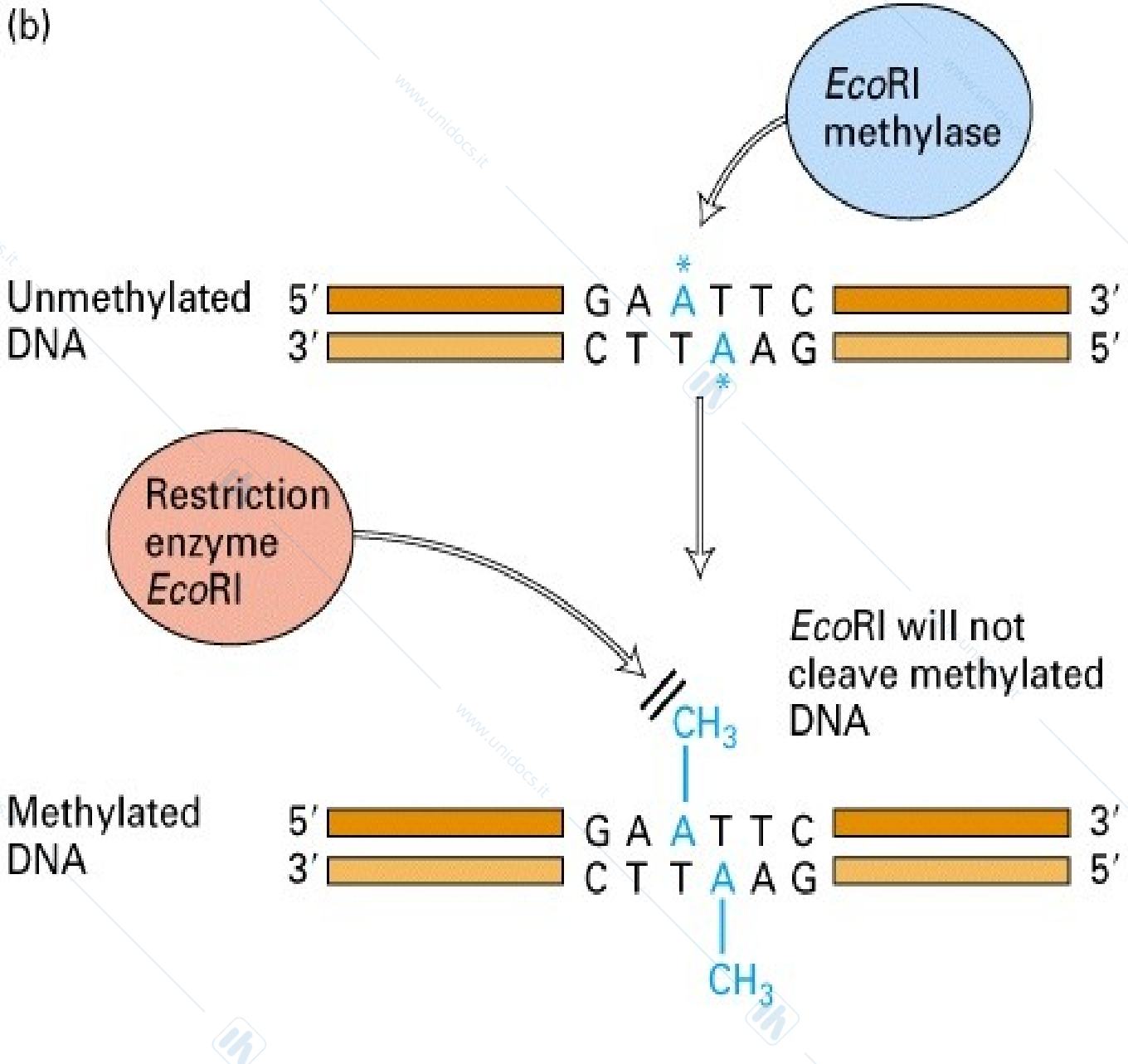
2.5x
more

Mse I

#R0525S 500 units
#R0525L 2,500 units
for high (5X) concentration, order #R0525M (2,500 units)



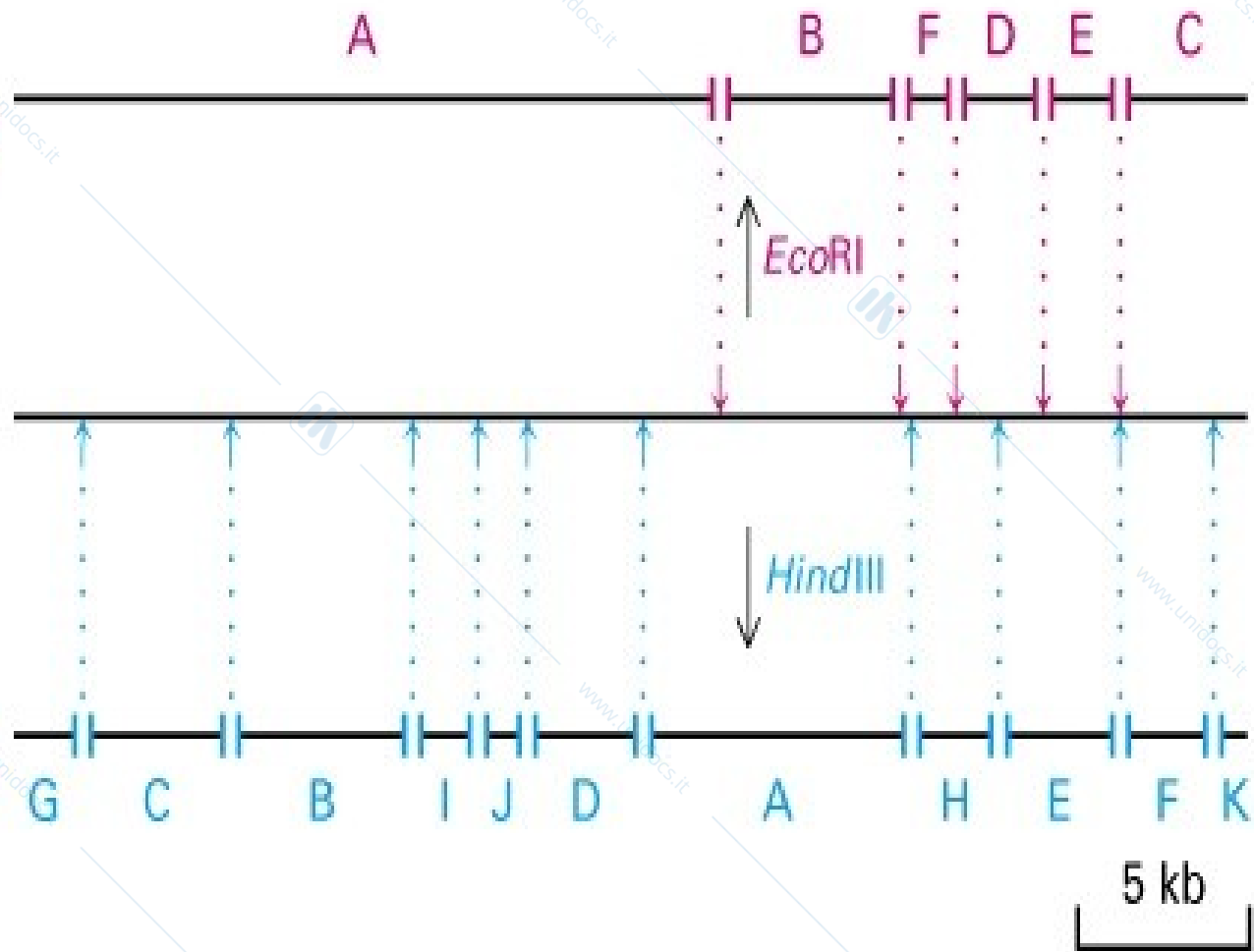
(b)



EcoRI fragments

Ad2 DNA

HindIII fragments

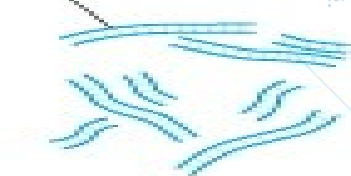


↓ = EcoRI site

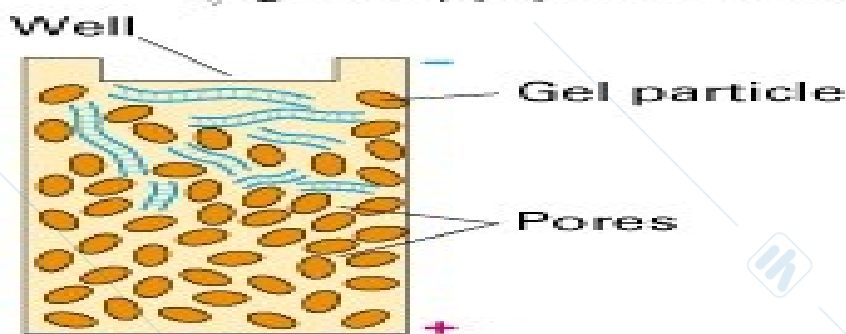
↑ = HindIII site

5 kb

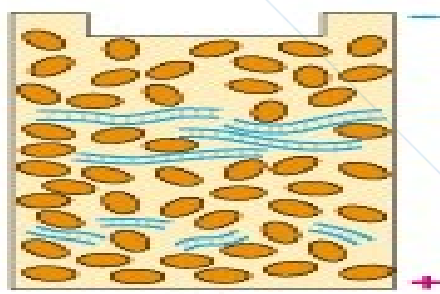
DNA restriction fragments



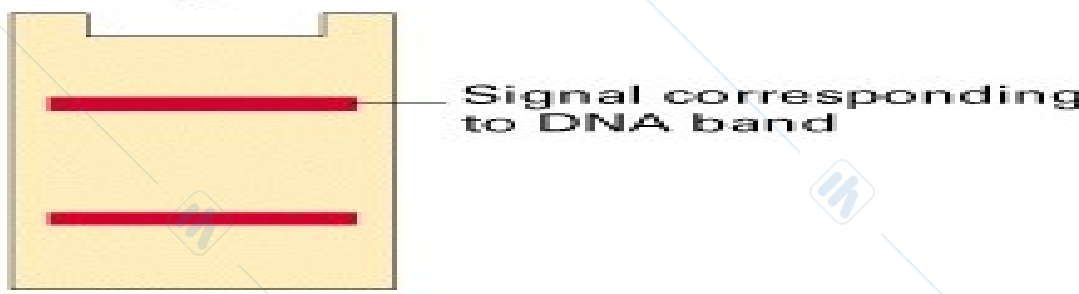
Place mixture in the well of an agarose or polyacrylamide gel. Apply electric field

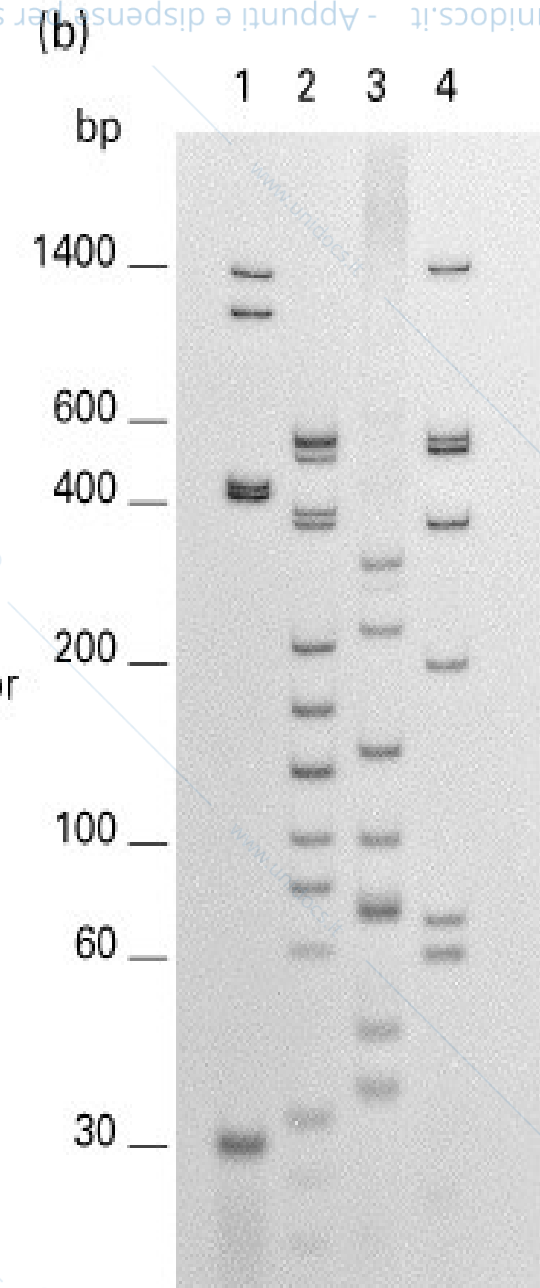
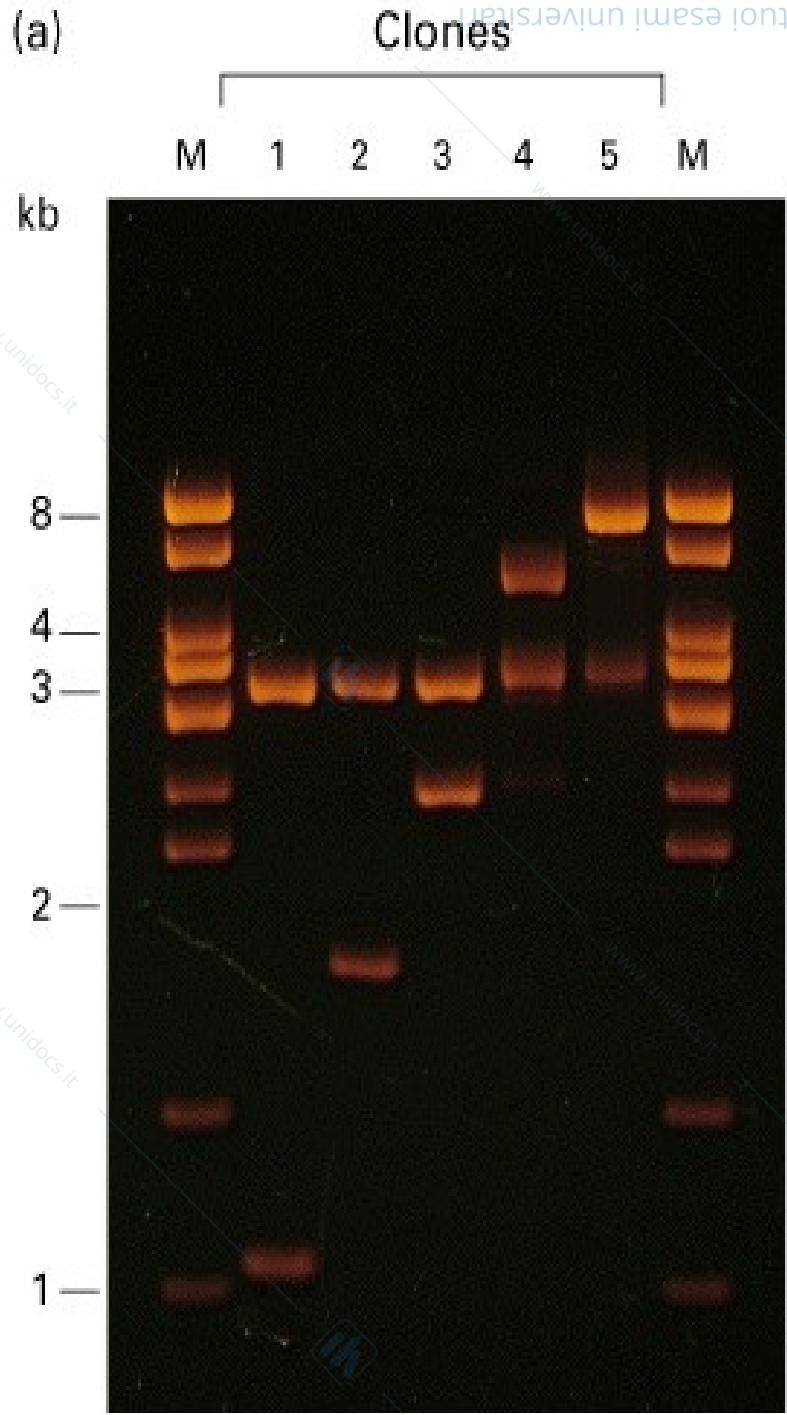


Molecules move through pores in gel at a rate inversely proportional to their chain length

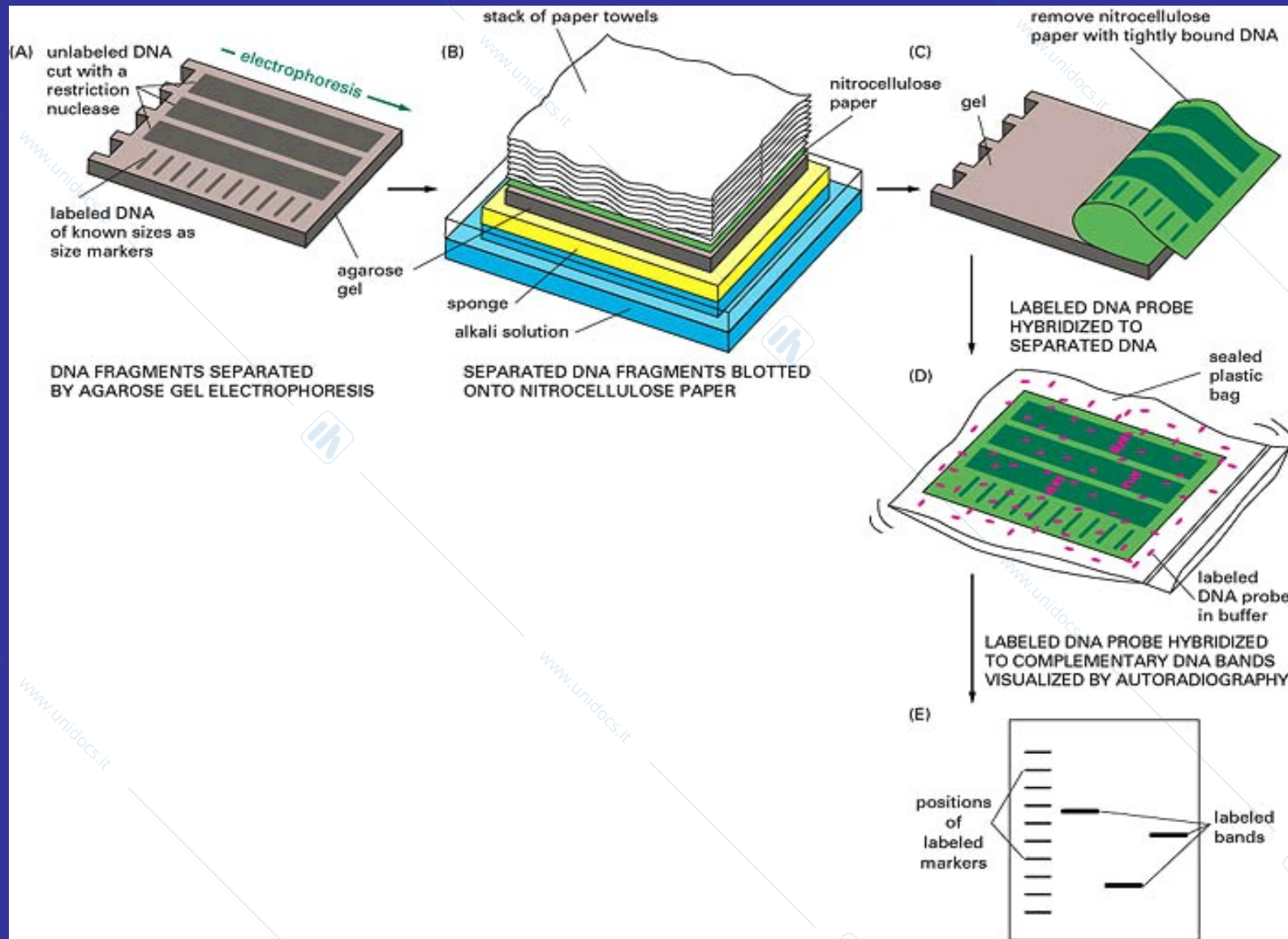


Subject to autoradiography or incubate with fluorescent dye





SOUTHERN/NORTHERN BLOT



SOUTHERN/NORTHERN BLOT

