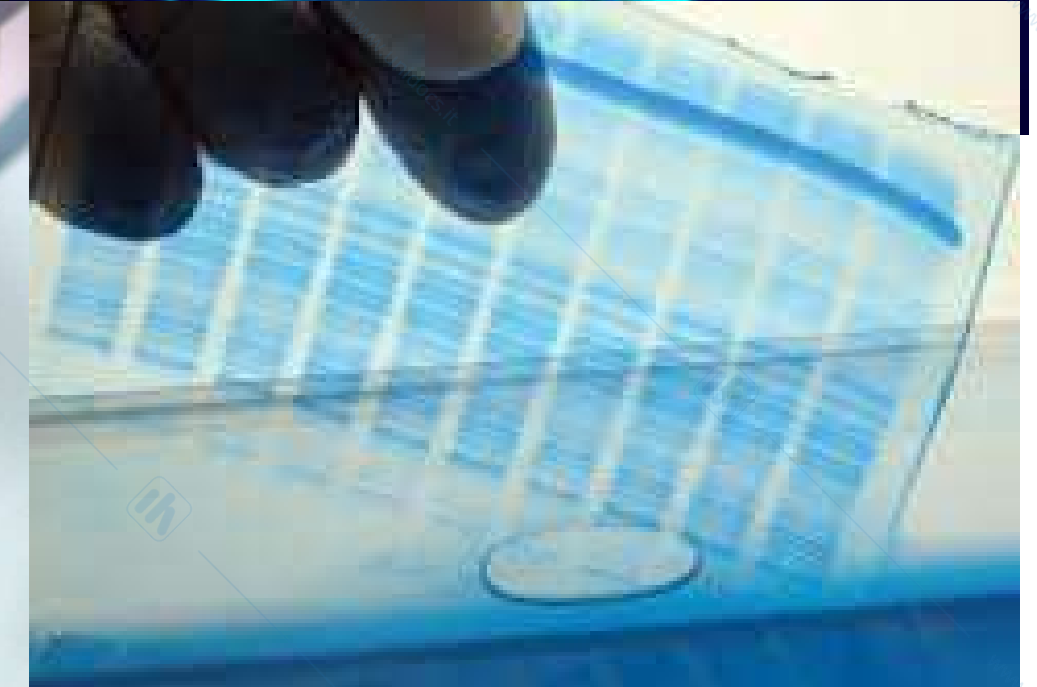
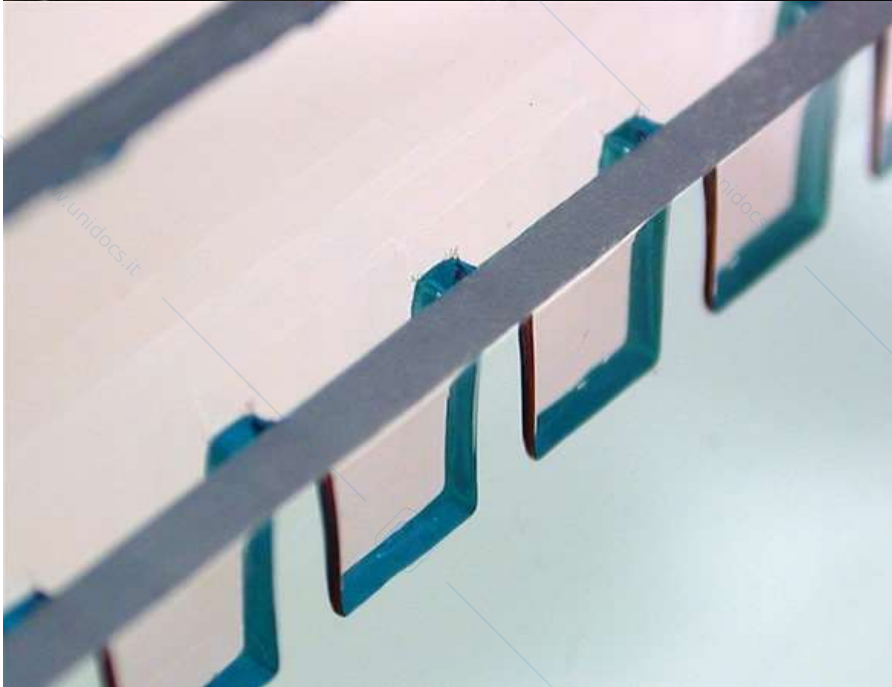
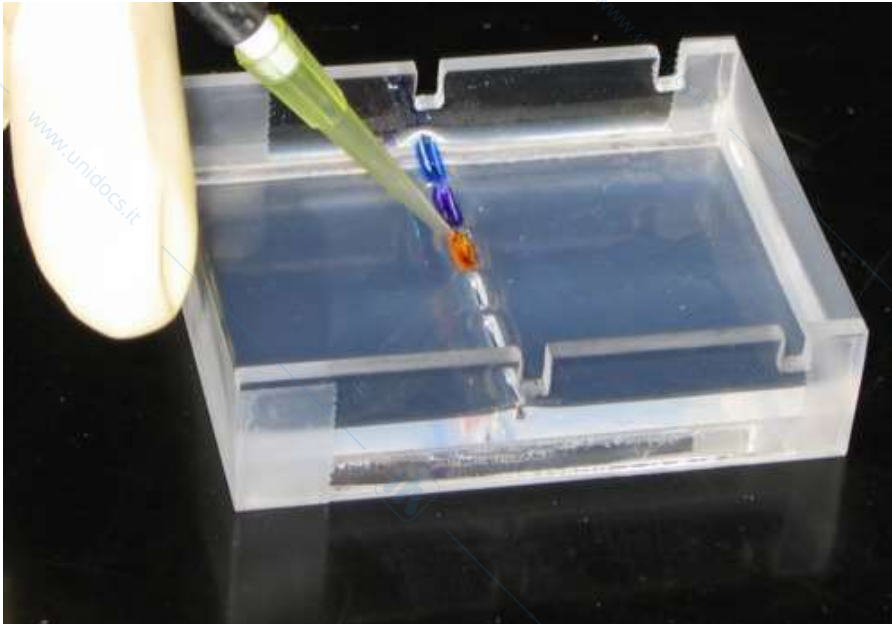


ELETTROFORESI



Stoppini – Biochimica applicata – Capitolo 9

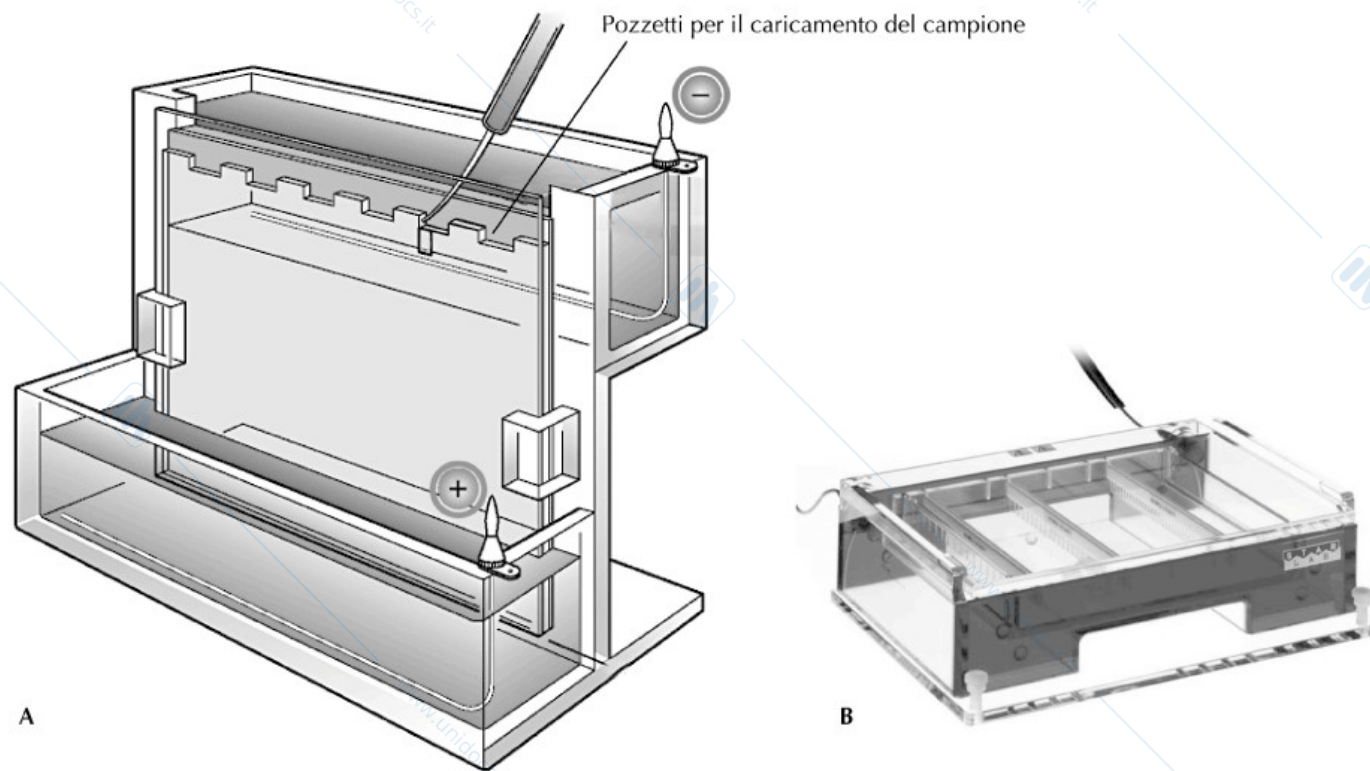


Figura 9.1 ▶ Celle elettroforetiche verticali (A) e orizzontali (B).

ELETTROFORESI

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

Anioni → **ANODO (+)**

Cationi → **CATODO (-)**



ELETTROFORESI

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

Anioni → **ANODO (+)**



Cationi → **CATODO (-)**

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

ELETTROFORESI

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

Anioni → **ANODO (+)**



Cationi → **CATODO (-)**

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Migrazione
inversamente
proporzionale
alla dimensione
delle particelle

v = velocità di migrazione

E = gradiente di voltaggio del campo elettrico

q = carica della particella

f = coefficiente frizionale del mezzo

viscosità

forma

dimensioni

pori

molecola

ELETTROFORESI

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



Anioni → **ANODO (+)**

Cationi → **CATODO (-)**

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Migrazione
inversamente
proporzionale
alla dimensione
delle particelle

$$\mu = \frac{v}{E}$$

Mobilità elettroforetica
Velocità di Migrazione
(cm/sec) per unità di
campo (Volt/cm)

v = velocità di migrazione

μ = mobilità elettroforetica

E = gradiente di voltaggio del campo elettrico

q = carica della particella

f = coefficiente frizionale del mezzo

viscosità

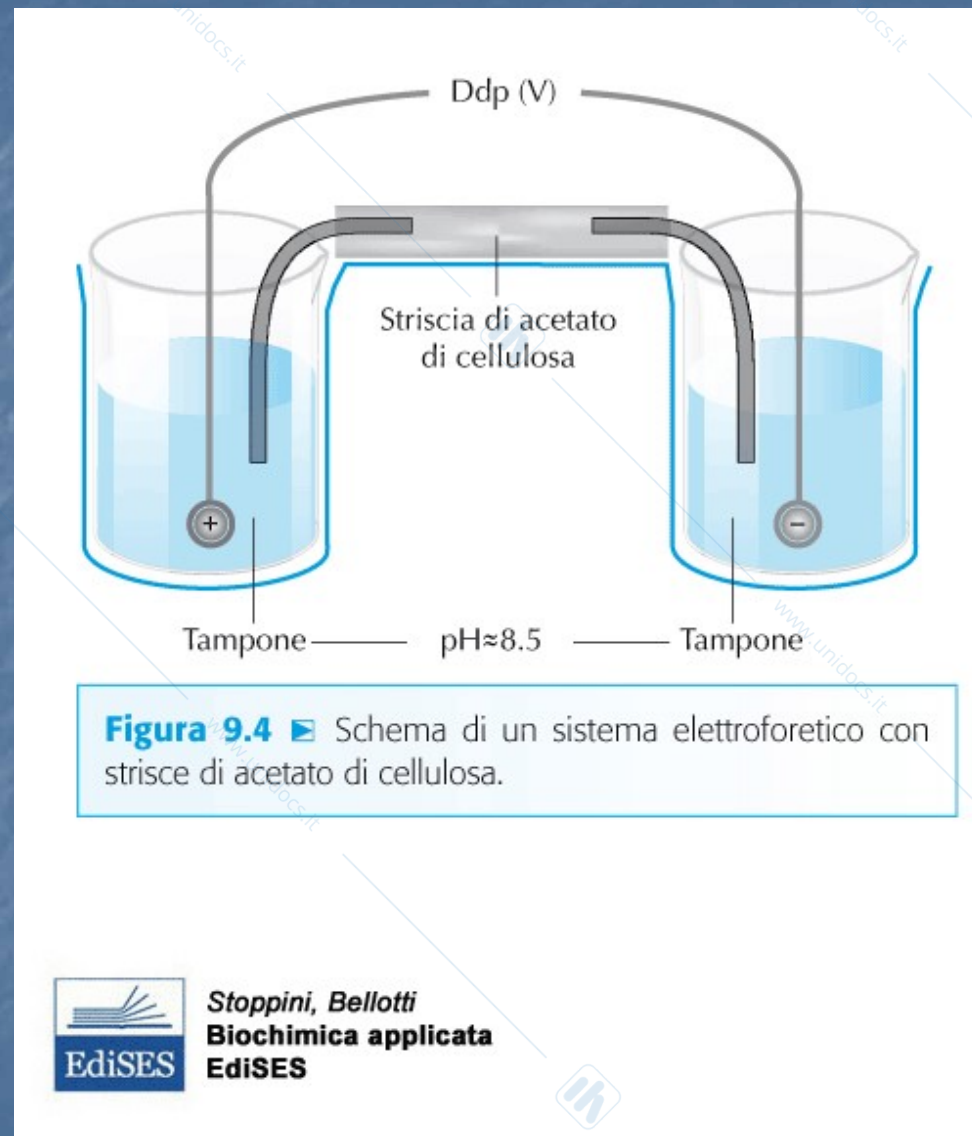
forma

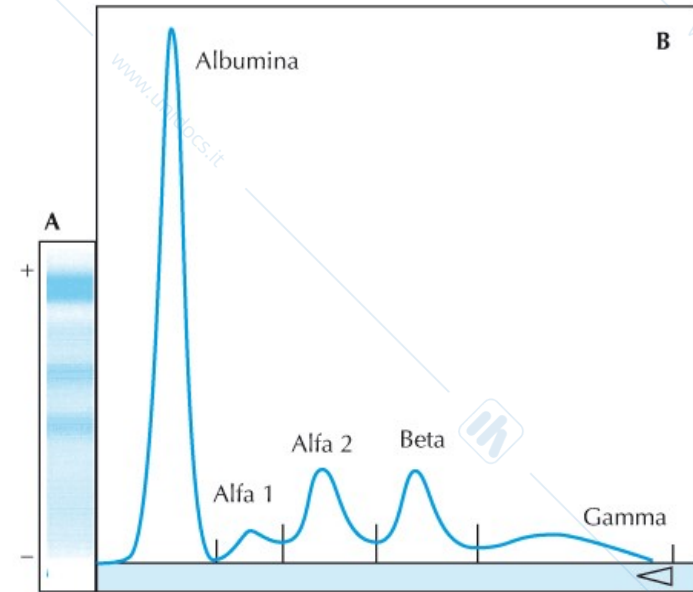
dimensioni

pori

molecola

Stoppini – Biochimica applicata – Capitolo 9





Frazione elettroforetica	Intervallo di riferimento
Albumina	52.0÷69.0%
Alfa-1-globuline	1.0÷6.0%
Alfa-2-globuline	4.5÷14.0%
Beta-globuline	7.0÷14.0%
Gamma-globuline	9.0÷20.0%
Rapporto albumina/globuline	1.22÷2.23

Figura 9.5 Separazione elettroforetica delle proteine del siero su acetato di cellulosa. (A) Striscia di acetato di cellulosa in cui le bande proteiche sono state evidenziate mediante colorazione con Rosso di Ponceau. (B) Grafico ottenuto dalla lettura delle bande elettroforetiche (protidogramma) eseguita mediante un densitometro.



TABELLA 9.1 ►►► CONTENUTO PROTEICO DELLE PRINCIPALI BANDE PROTEICHE DI UN PROTIDOGRAMMA

Frazione elettroforetica	Proteina/e prevalente/i
Albumina	Albumina
Alfa-1-globuline	Alfa-1-antitripsina
Alfa-2-globuline	Alfa-2-macroglobulina Aptoglobina
Beta-globuline	Transferrina Complemento (frazione C3)
Gamma-globuline	IgG IgA IgM



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
Edises

ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

Charge-to-mass ratio

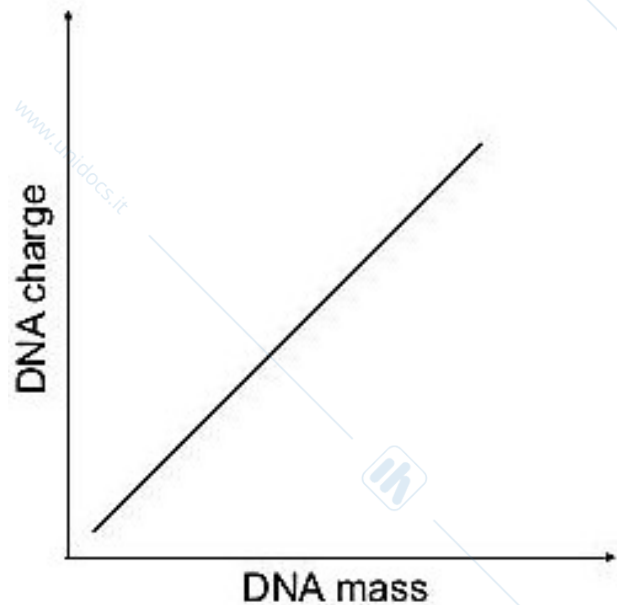
this ratio significantly affects the mobility of a macromolecule through a solution when driven by an electric field (two molecules of identical mass but different charge will move at different rates in an electric field).

ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

Charge-to-mass ratio

affects the mobility of a macromolecule

(two molecules of identical mass but different charge will move at different rates)

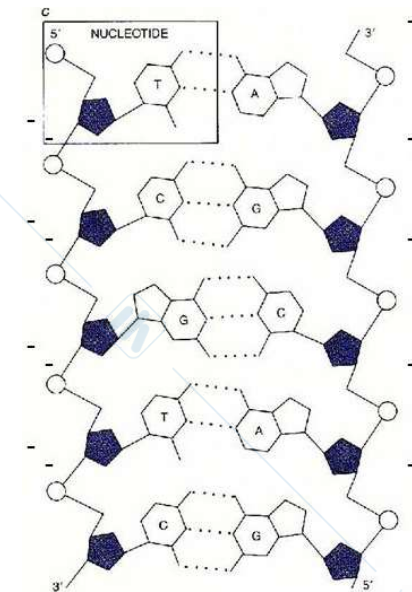
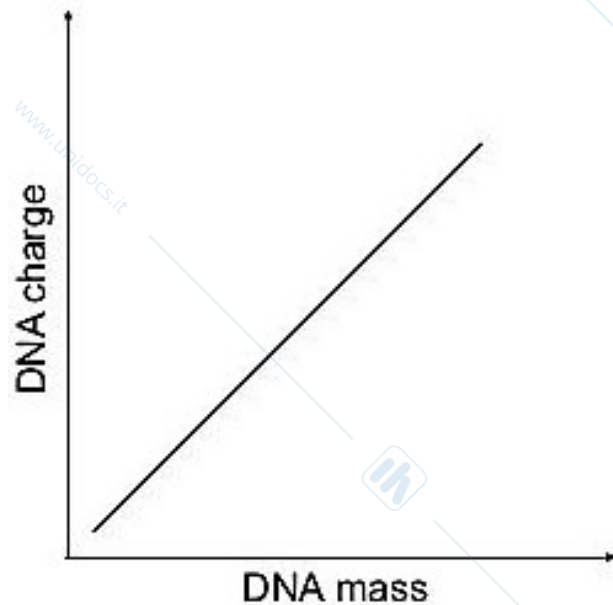


ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

Charge-to-mass ratio

this ratio significantly affects the mobility of a macromolecule through a solution when driven by an electric field (two molecules of identical mass but different charge will move at different rates in an electric field).

At neutral pH, the majority of the **net charge on DNA** is derived from the **negatively charged phosphate groups** in the DNA backbone. As DNA increases in size, the total charge increases at the same rate. The resulting **charge-to-mass ratio** therefore remains **constant**. DNA fragments of **different sizes all move at about the same rate in an electric field**.



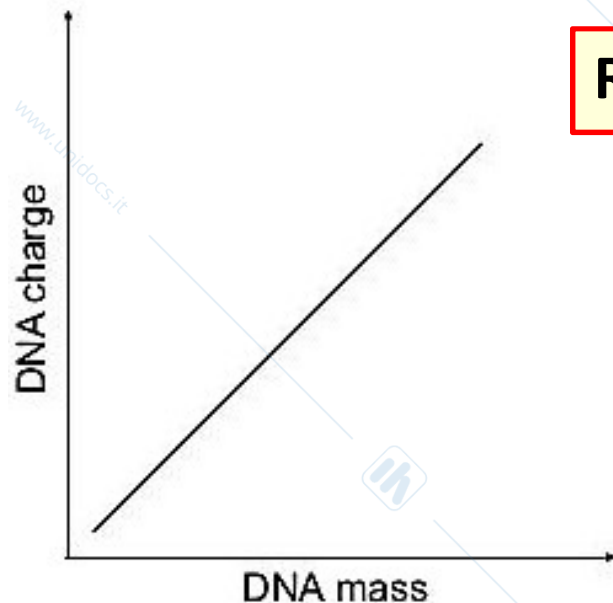
ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

Charge-to-mass ratio

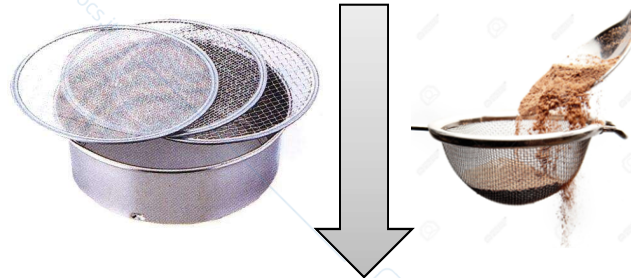
affects the mobility of a macromolecule through a solution when driven by an electric field (two molecules of identical mass but different charge will move at different rates)

At neutral pH, the majority of the **net charge on DNA** is derived from the **negatively charged phosphate groups** in the DNA backbone: As DNA increases in size, the total charge increases at the same rate. The resulting **charge-to-mass ratio** remains **constant**, and DNA fragments of **different sizes all move at about the same rate in an electric field**.

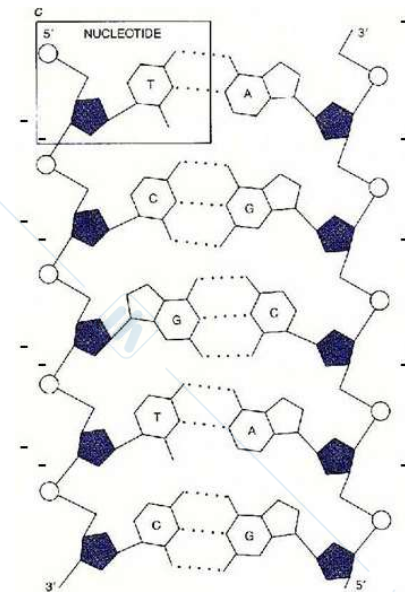
For **separation** of the fragments **according to size**, it is necessary to force the fragments to **migrate through a molecular sieve or matrix** of many small pores that allows the **smaller fragments** to **move faster than the larger fragments**.



Rapporto carica massa costante



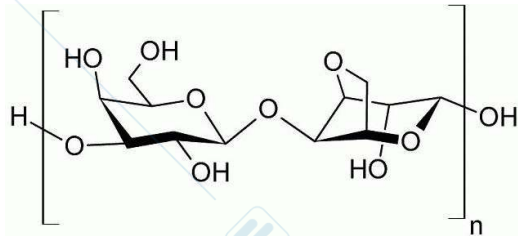
Necessario un "setaccio" per separare per dimensioni



GEL DI AGAROSO

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

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



Legame O-glicosidico

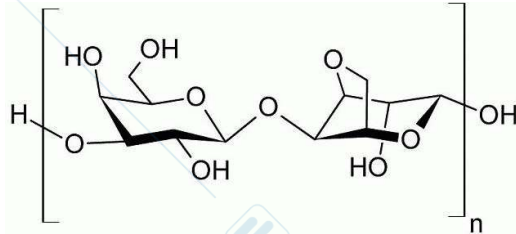


- Forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- Maggiore è la **[agarosio]**, più piccoli sono i pori nel gel.

GEL DI AGAROSO

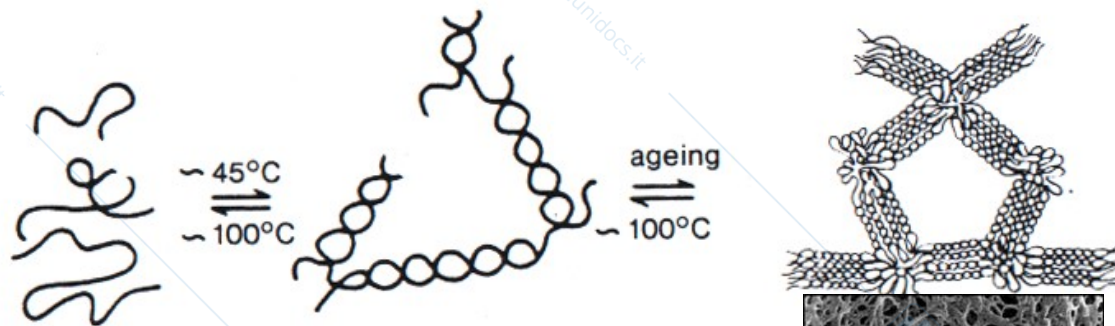
Agarosio: **polimero lineare** estratto da un'alga marina, la cui struttura di base è:

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

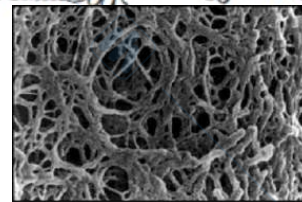


Legame O-glicosidico

- Forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- Maggiore è la **[agarosio]**, più piccoli sono i pori nel gel.



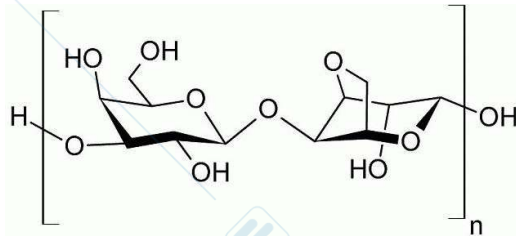
Si forma un **reticolo tridimensionale**



GEL DI AGAROSO

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

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



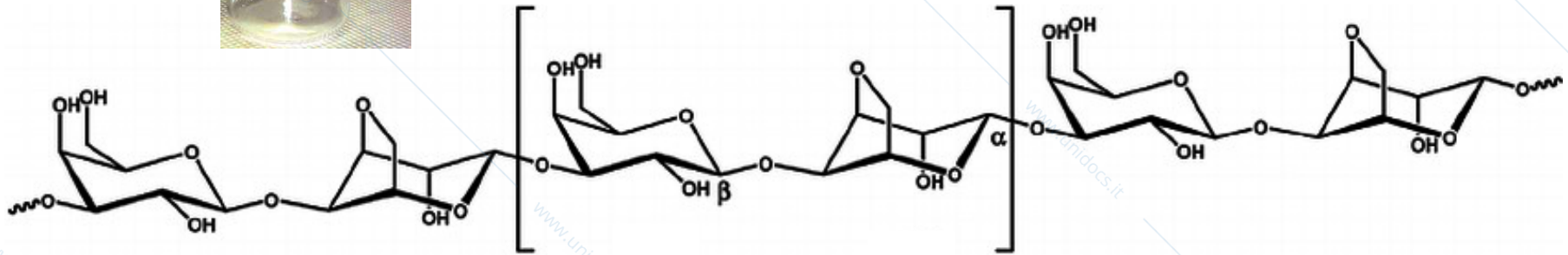
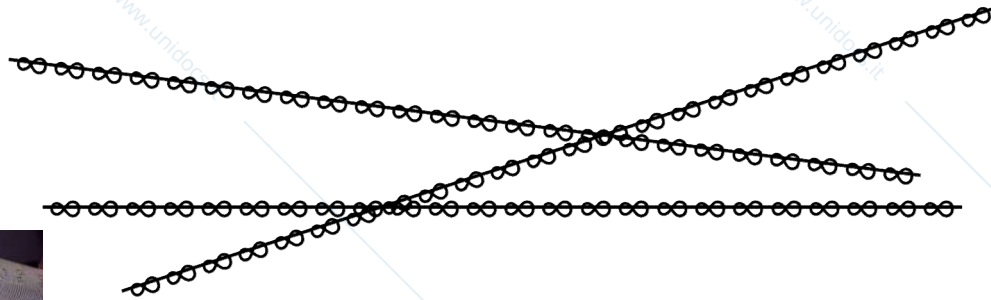
Legame O-glicosidico

- Forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- Maggiore è la **[agarosio]**, più piccoli sono i pori nel gel.

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



NATURA CHIMICA DEL GEL DI AGAROSO



Stoppini – Biochimica applicata – Capitolo 9

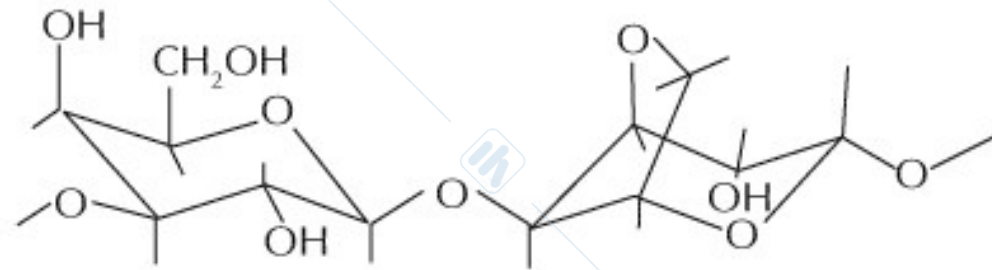
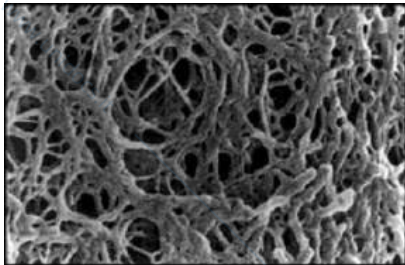
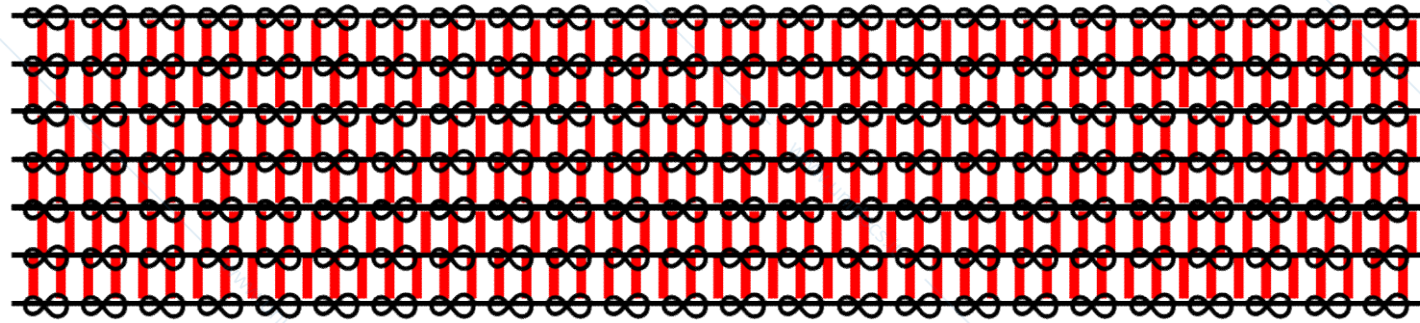
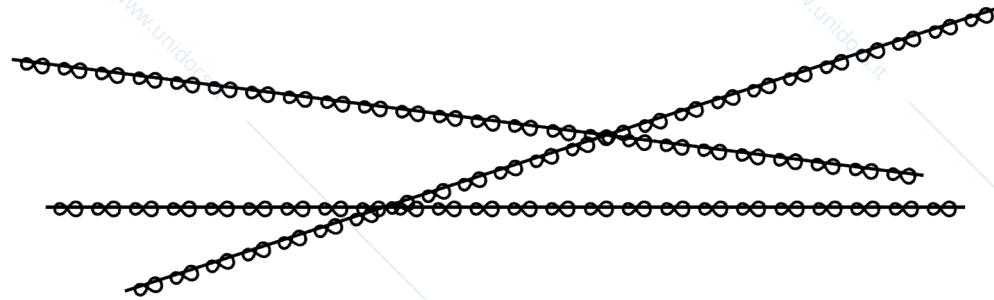
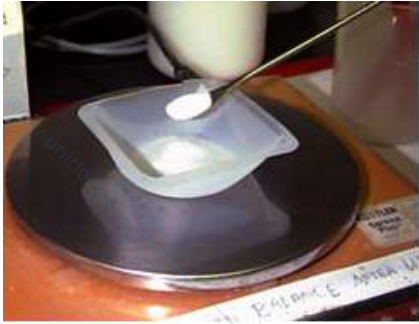


Figura 9.6 ► Formula di struttura dell'agarobiosio, l'unità ripetitiva presente nell'agarosio.



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
Edises

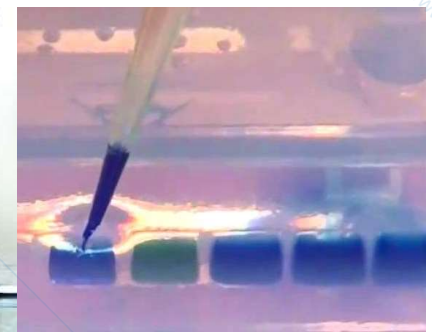
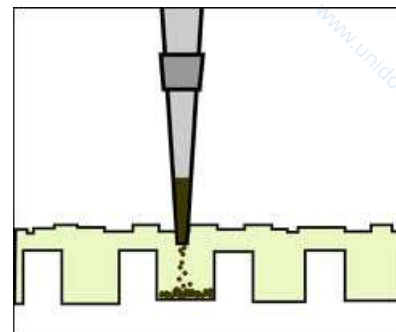
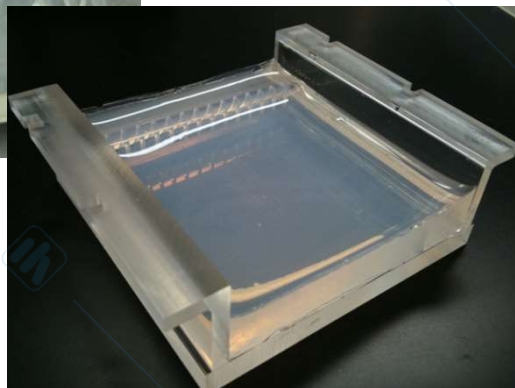
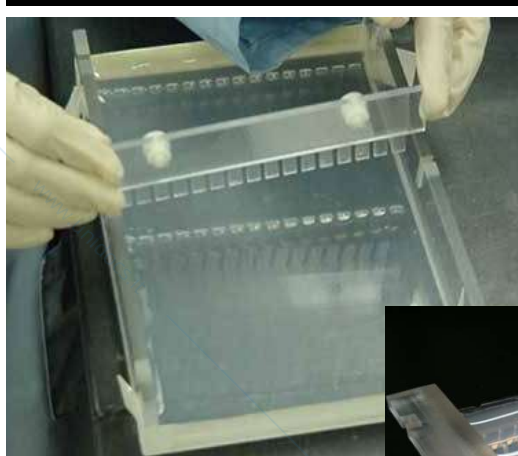
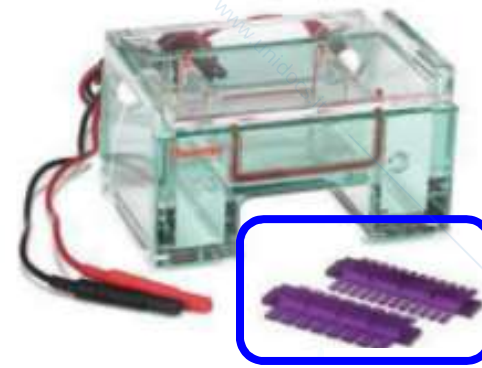
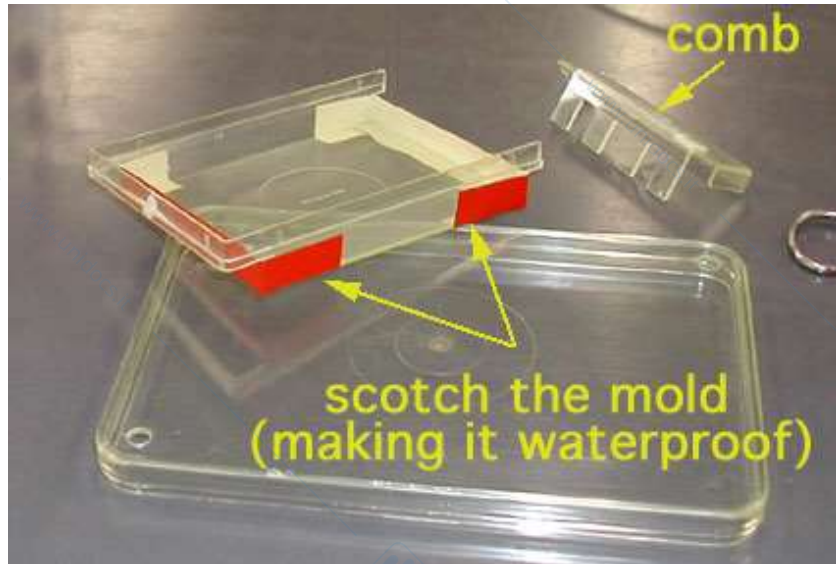
NATURA CHIMICA DEL GEL DI AGAROSO



Diametro pori:
Da 50 a >200 nm



Fra i **polimeri** di agaroso si formano **ponti H**



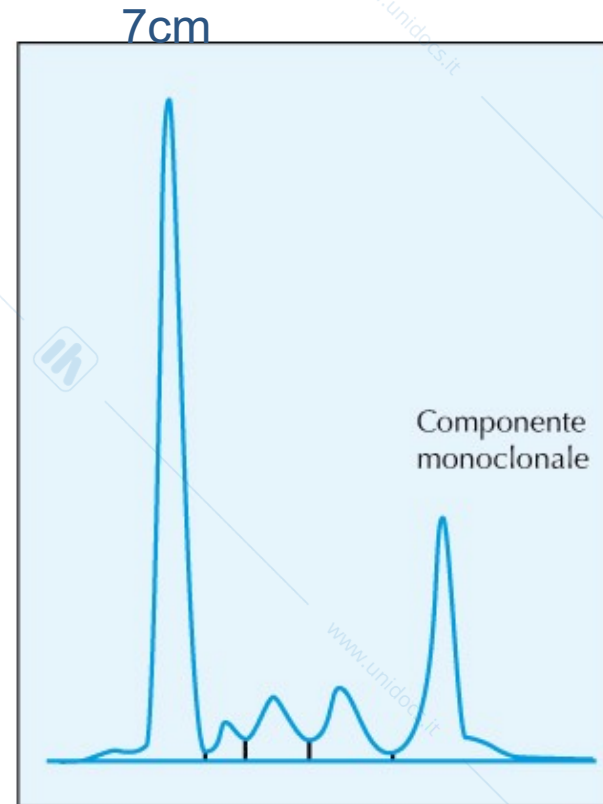


Figura 9.7 ■ Tracciato elettroforetico in cui viene evidenziato un picco monoclonale.

0.8% Agaroso -barbital

1mm -20V/cm



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
EdiSES

TABELLA 9.1 ►►► CONTENUTO PROTEICO DELLE PRINCIPALI BANDE PROTEICHE DI UN PROTIDOGRAMMA

Frazione elettroforetica	Proteina/e prevalente/i
Albumina	Albumina
Alfa-1-globuline	Alfa-1-antitripsina
Alfa-2-globuline	Alfa-2-macroglobulina Aptoglobina
Beta-globuline	Transferrina Complemento (frazione C3)
Gamma-globuline	IgG IgA IgM



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
EdiSES

Da cosa dipende la VELOCITÀ DI MIGRAZIONE

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

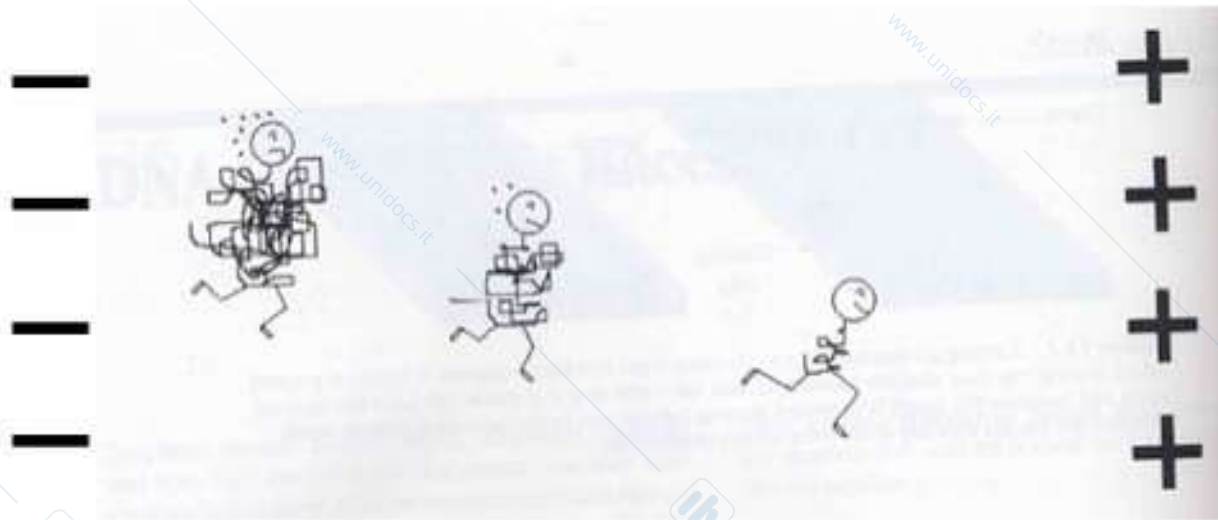
- DIMENSIONE DEL DNA
- CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL
- CONFORMAZIONE DEL DNA
- VOLTAGGIO APPLICATO → circa 5 Volt/cm (distanza anodo-catodo)
- PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO
- COMPOSIZIONE E FORZA IONICA DEL TAMPONE

□ DIMENSIONE DEL DNA

$$V = \frac{K}{\log_{10} \text{bp}}$$

Relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- molecole grandi migrano lentamente
 - molecole piccole migrano velocemente
- (il parametro K varia al variare della concentrazione di agarosio nel gel)



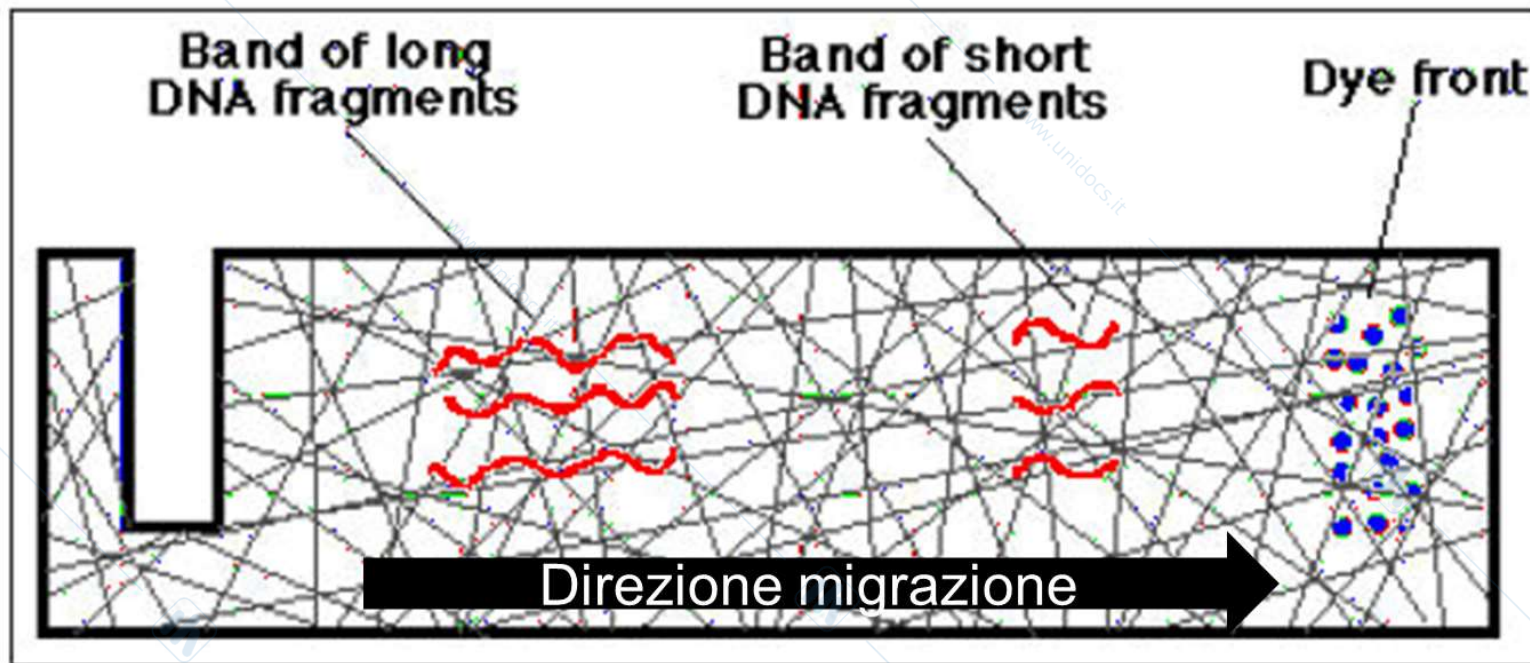
□ DIMENSIONE DEL DNA

$$V = \frac{K}{\log_{10} \text{bp}}$$

Relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- molecole grandi migrano lentamente
- molecole piccole migrano velocemente

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



Trascinamento di molecole prive di carica

Flusso di acqua

Cationi tampone

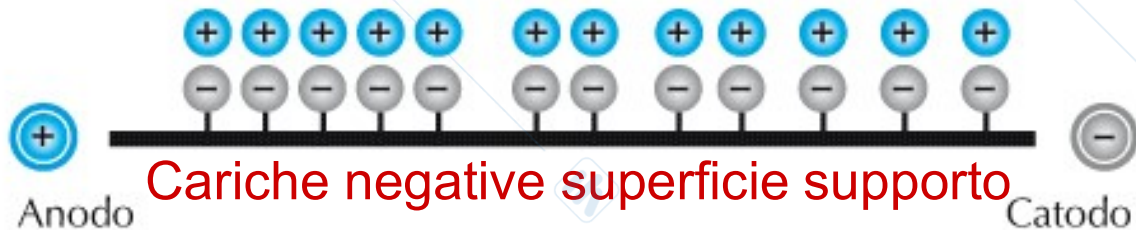


Figura 9.3 Rappresentazione schematica del fenomeno di elettroendosmosi.



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
EdiSES

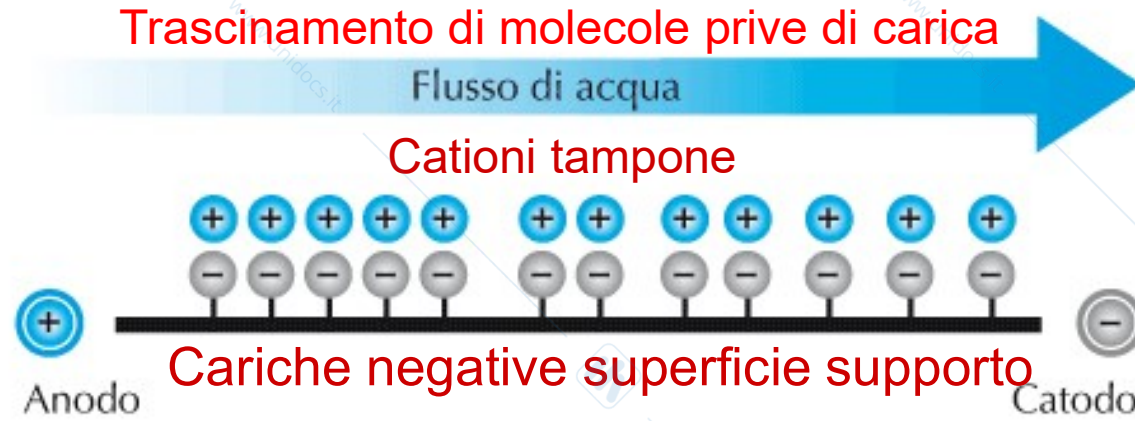


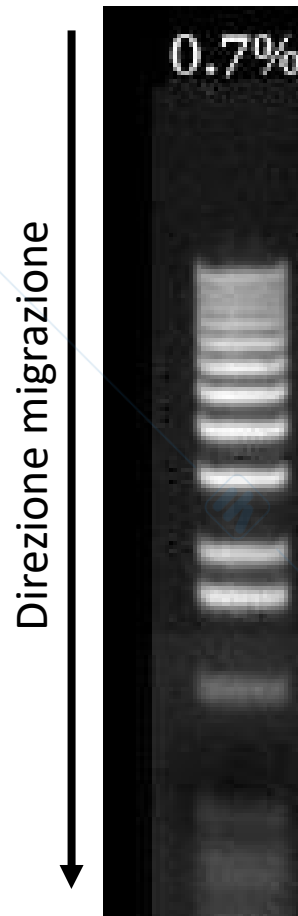
Figura 9.3 Rappresentazione schematica del fenomeno di elettroendosmosi.



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
EdiSES

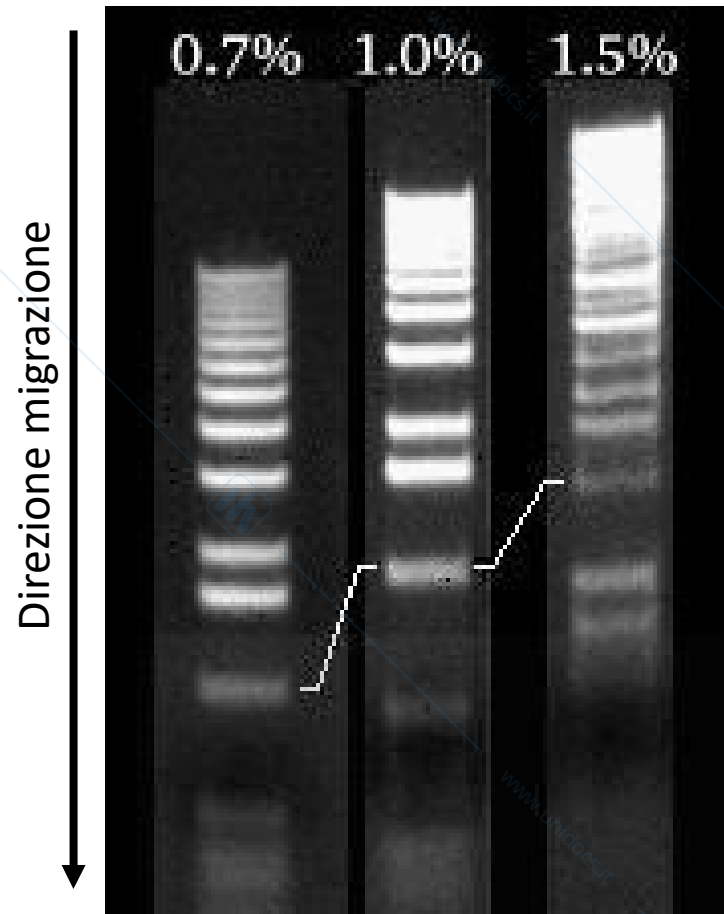
Agaroso alta endosmosi se impuro - Solfati

CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL



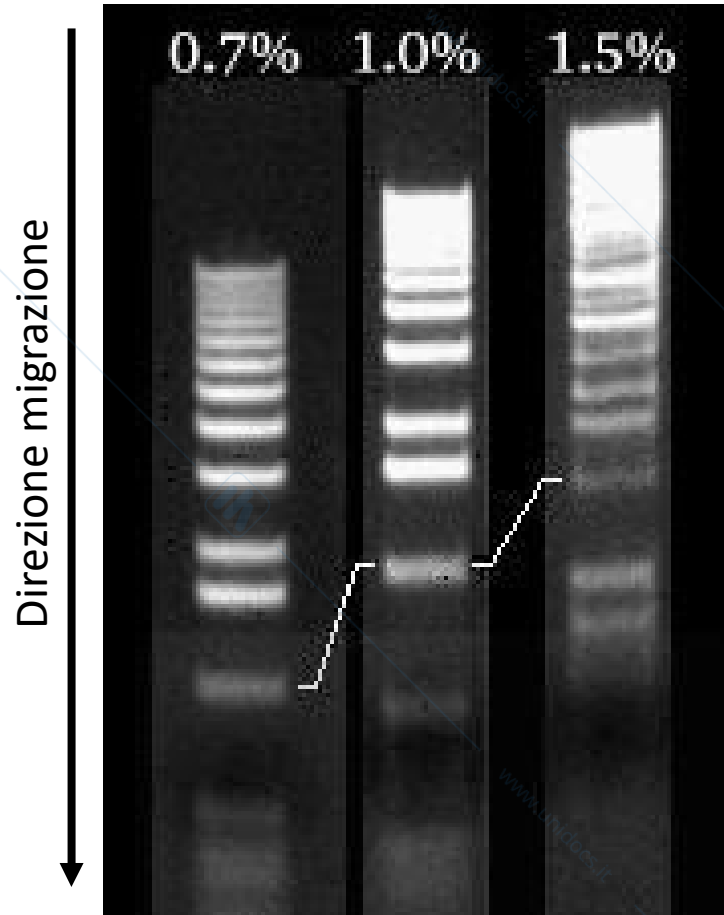
[agarosio] %p/v	Range di separazione (bp)
0.3	5.000 – 60.000
0.6	1.000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000

CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL

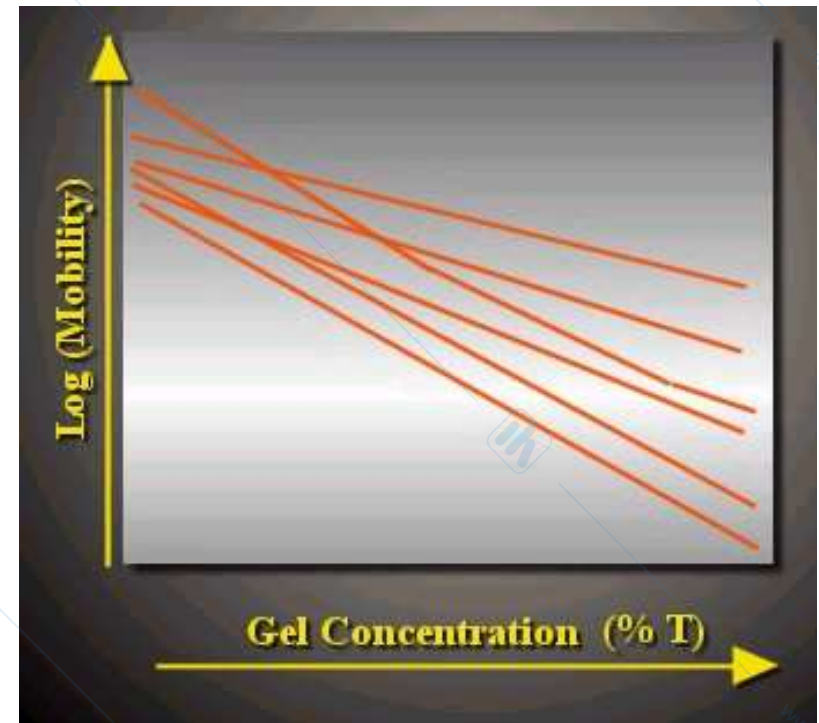


[agarosio] %p/v	Range di separazione (bp)
0.3	5.000 – 60.000
0.6	1.000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000

CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL



[agarosio] %p/v	Range di separazione (bp)
0.3	5.000 – 60.000
0.6	1.000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000



□ CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL

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

μ_0 = mobilità libera del DNA

K_R è il coefficiente di ritardo

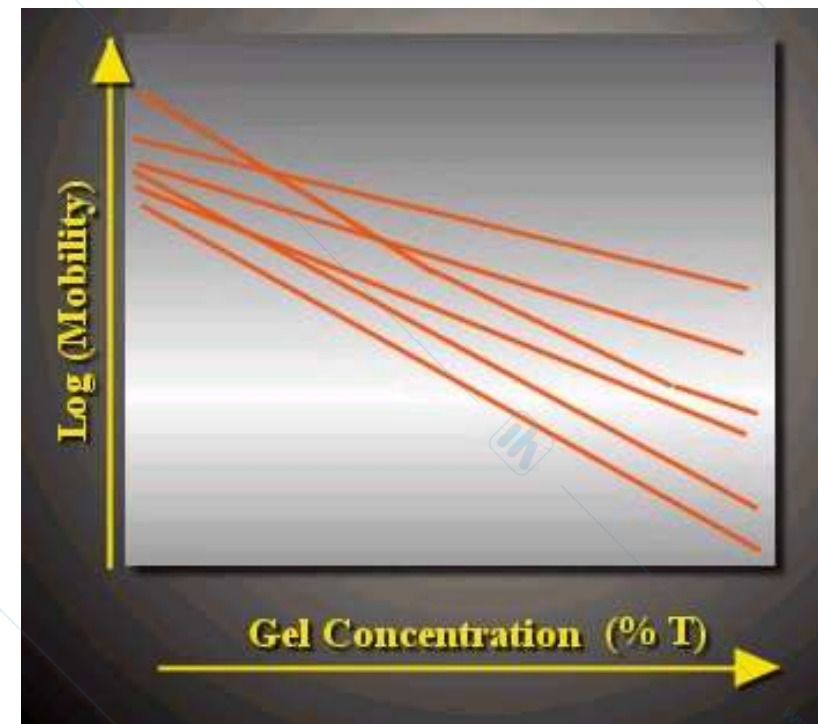
(costante legata alle proprietà del gel e a dimensione/forma delle molecole sottoposte a migrazione)

Relazione lineare tra il logaritmo della **mobilità** elettroforetica (μ) e la **concentrazione** del gel (T).

$$\mu = \frac{v}{E}$$

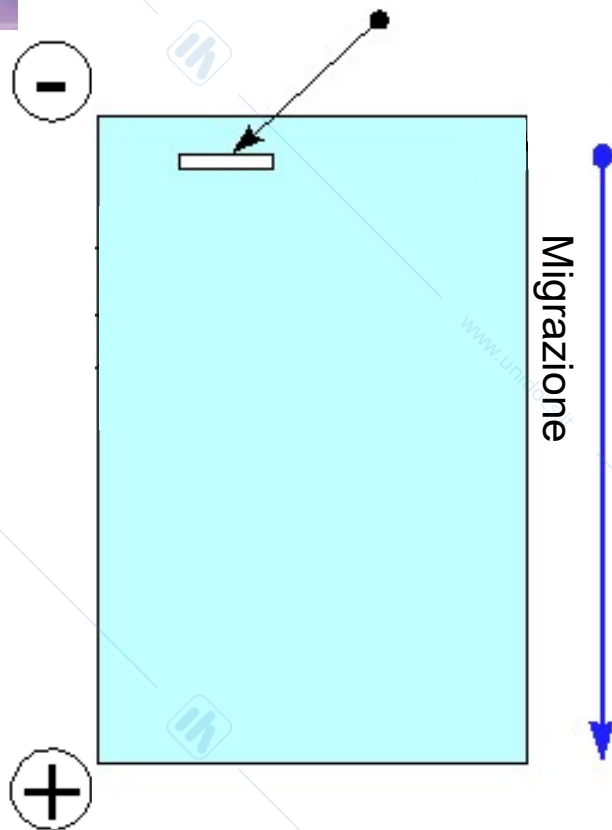
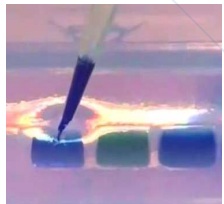
Mobilità elettroforetica
Velocità di Migrazione
(cm/sec) per unità di
campo (Volt/cm)

[agarosio] %p/v	Range di separazione (bp)
0.3	5.000 – 60.000
0.6	1.000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000



□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello stesso peso molecolare hanno  velocità di migrazione



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

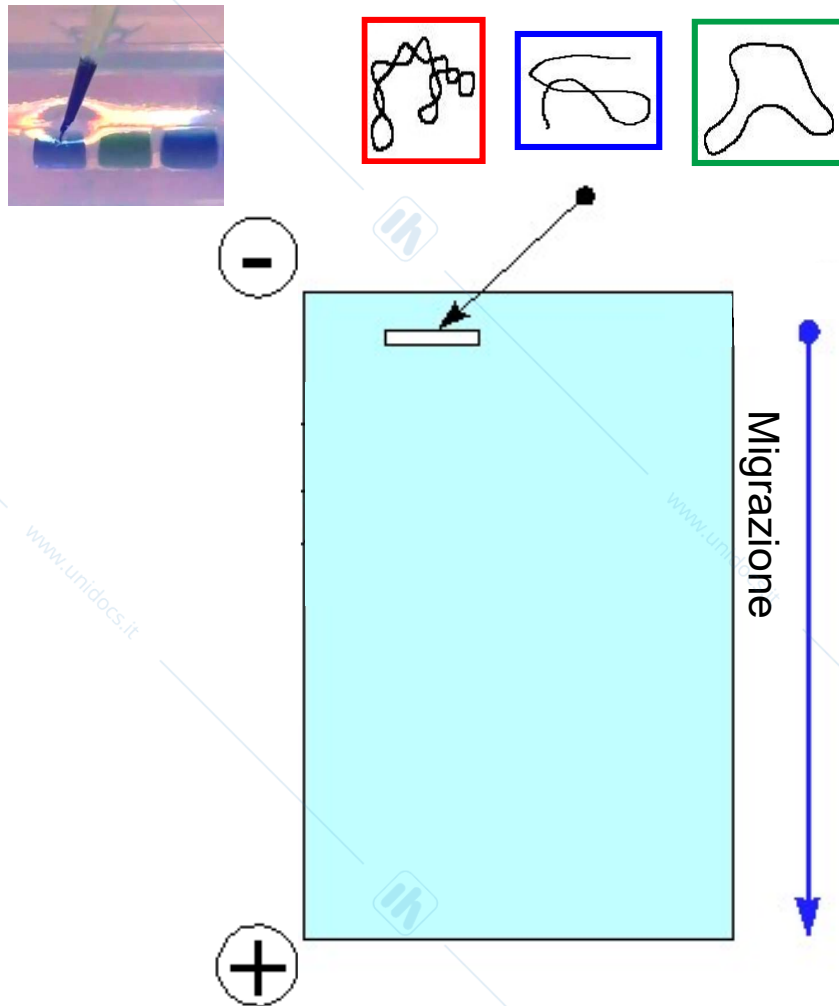
μ_0 = mobilità libera del DNA

K_R è il coefficiente di ritardo
(costante legata alle proprietà del gel

e a dimensione/ **forma** delle molecole)

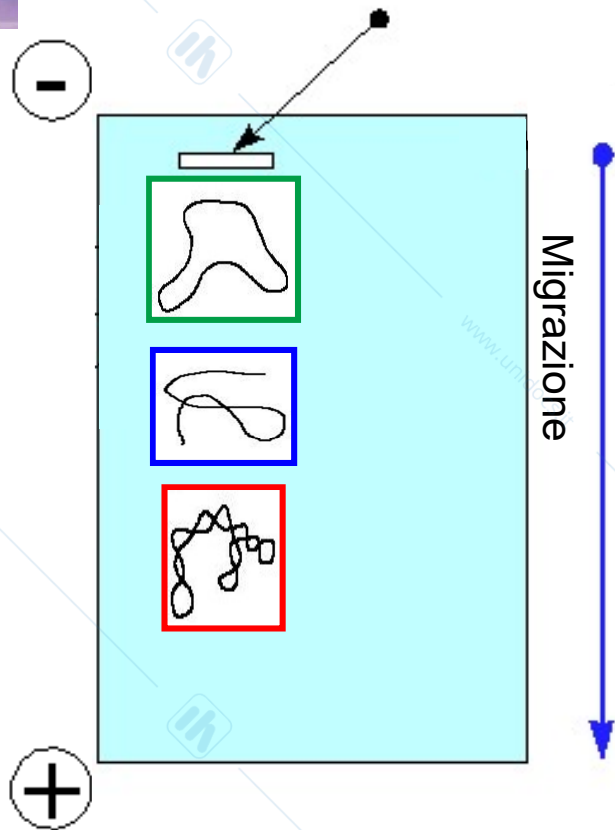
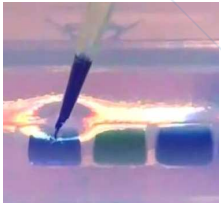
□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello **stesso peso molecolare** hanno **diversa velocità** di migrazione



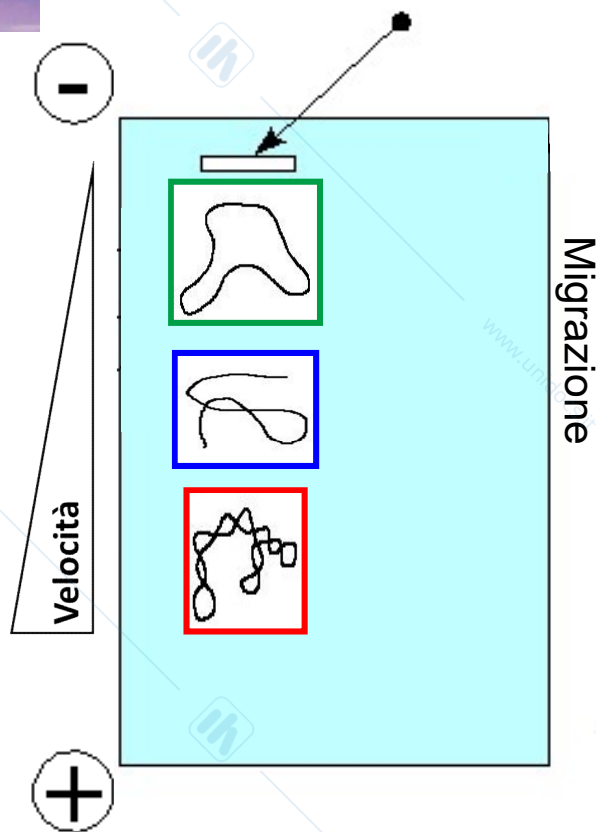
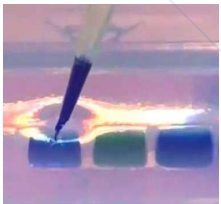
□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello **stesso peso molecolare** hanno **diversa velocità** di migrazione



□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello stesso peso molecolare hanno **diversa velocità** di migrazione



- La forma **CIRCOLARE** migra più lenta perché è la più "ingombrante" e "fatica" di più 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 di digestione di un plasmide o nella PCR).
- La forma **SUPERAVVOLTA** migra più veloce perché è più compatta.

COMPOSIZIONE IN BASI
NON influenza la migrazione

VOLTAGGIO APPLICATO

Proporzionalità diretta a bassi voltaggi (5 V/cm)

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Tuttavia...

la potenza generata viene dissipata sotto forma di **calore**

COMPOSIZIONE IN BASI
NON influenza la migrazione

VOLTAGGIO APPLICATO

Proporzionalità diretta a bassi voltaggi (5 V/cm)

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Tuttavia...

la potenza generata viene dissipata sotto forma di **calore**

**EFFETTO
JOULE**

$$C = i^2 R t$$

C = calore dissipato

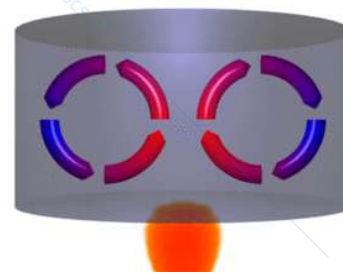
i = intensità di corrente

R = resistenza elettrica

t = tempo



EFFETTO JOULE ED ELETTROFORESI



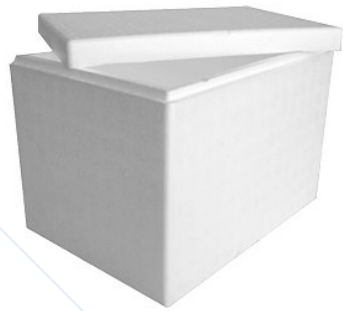
$$C = i^2 R t$$

$$I = \frac{V}{R}$$



RISVOLTI PRATICI DELL'EFFETTO JOULE

1)

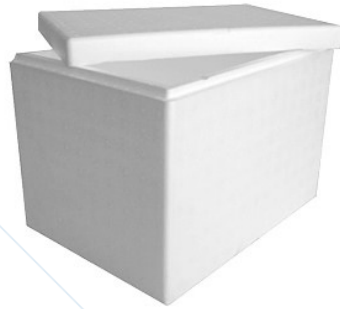


+ ghiaccio

2) DDP \leq di 5 Volt/cm

RISVOLTI PRATICI DELL'EFFETTO JOULE

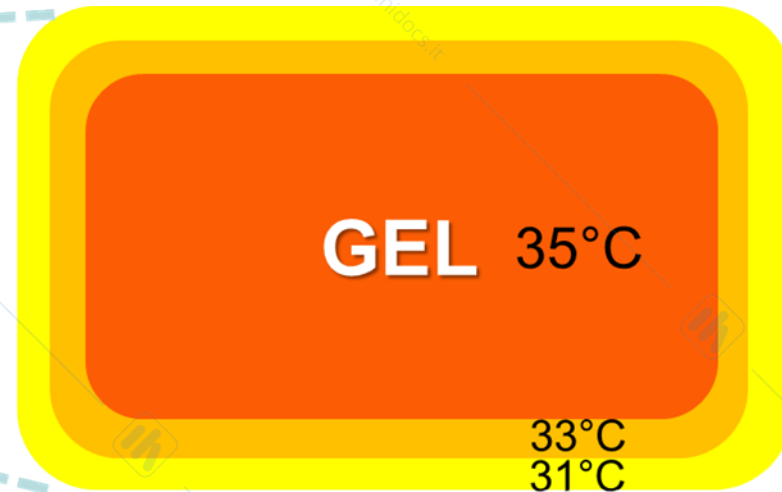
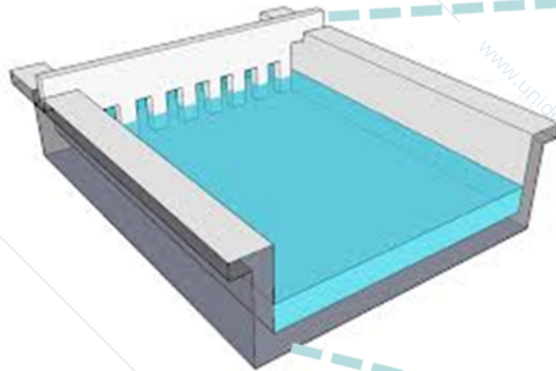
1)



+ ghiaccio

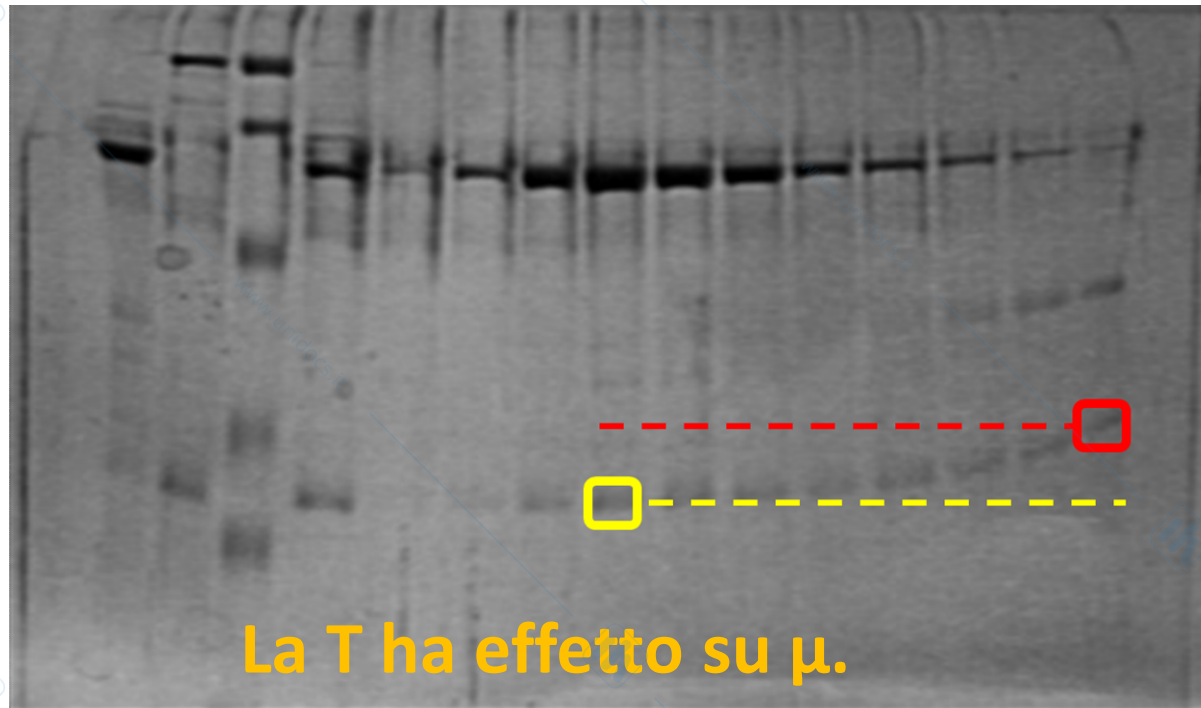
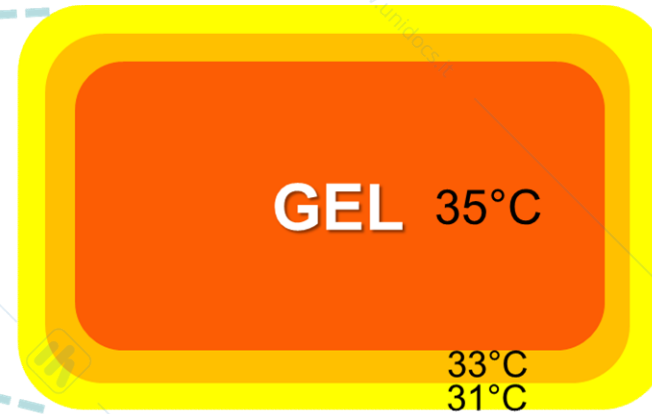
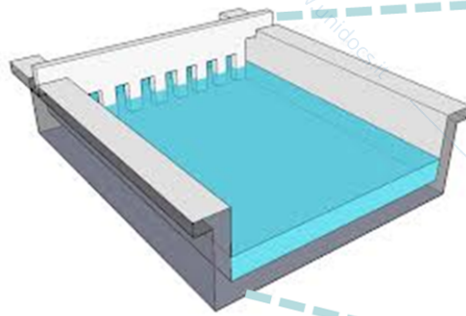
2) $DDP \leq$ di 5 Volt/cm

3) Dispersione NON omogenea del calore



TEMPERATURA NON OMOGENEA NEL GEL

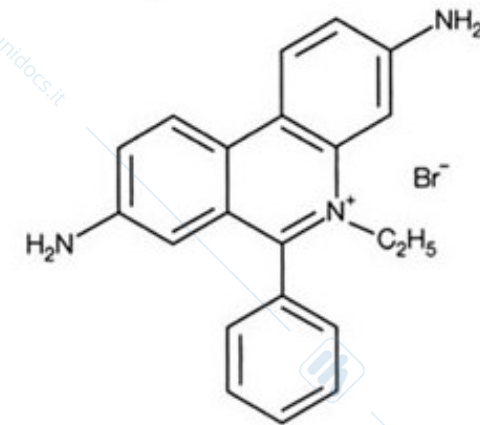
3)



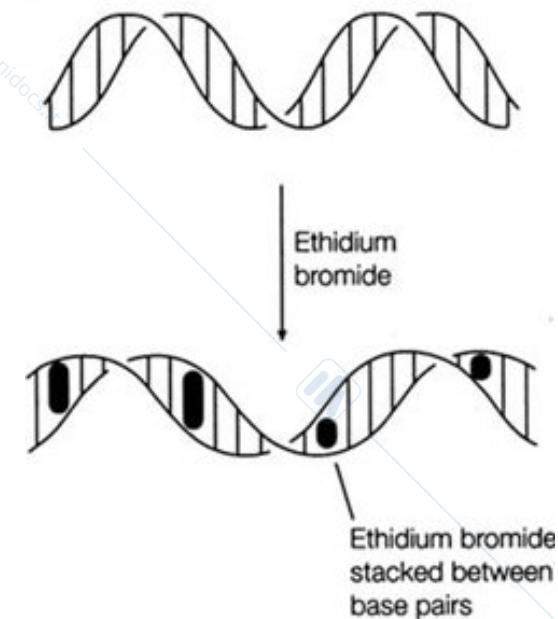
Lo stesso campione migra diversamente per effetto Joule

PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO

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

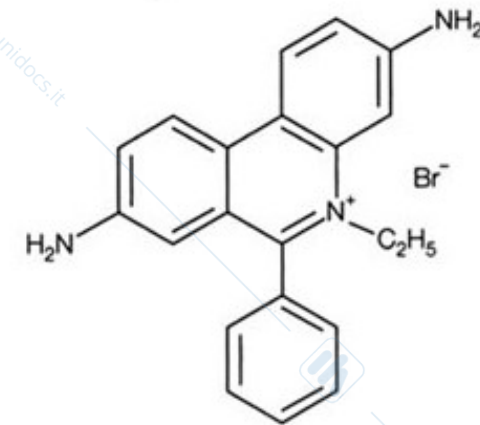


Bromuro di etidio



PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO

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



Bromuro di etidio



Ethidium bromide



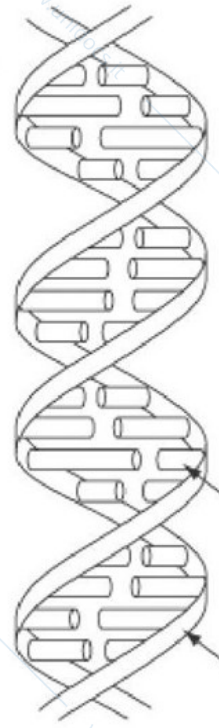
Ethidium bromide stacked between base pairs



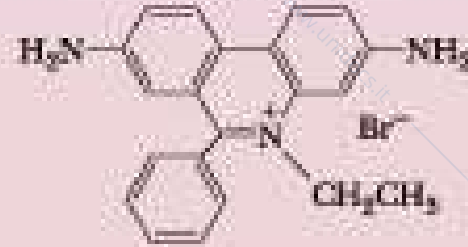
U.V.



B-DNA before intercalation



Intercalating agents



Ethidium bromide or

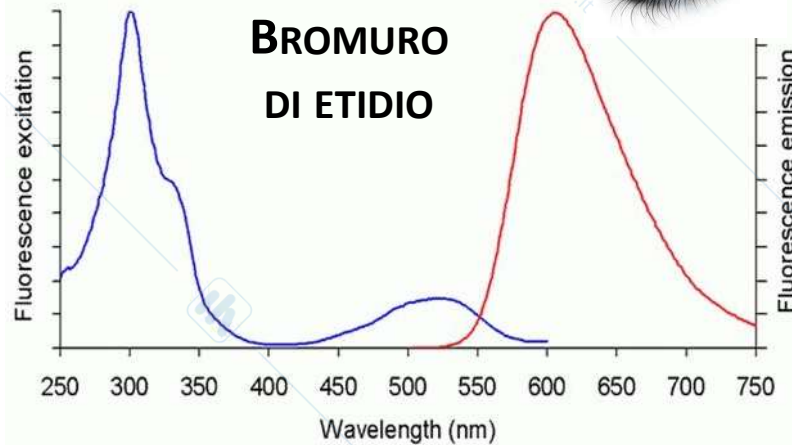


Acridine orange

B-DNA after intercalation



Sensibilità
5 ng DNA



Senza intercalante il **DNA**
NON è visibile a occhio nudo

❑ COMPOSIZIONE E FORZA IONICA DEL TAMPONE

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**.

Buffer TAE

TRIS + **A**cido acetico glaciale + **E**DTA

1X Buffer Composition

40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA.

- Conduzione elettrica
- Uniformità forza ionica e pH, **uguale per gel e corsa.**

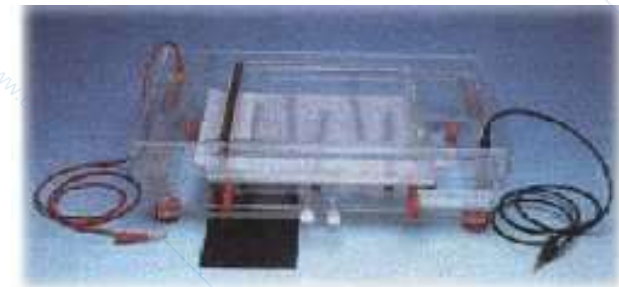
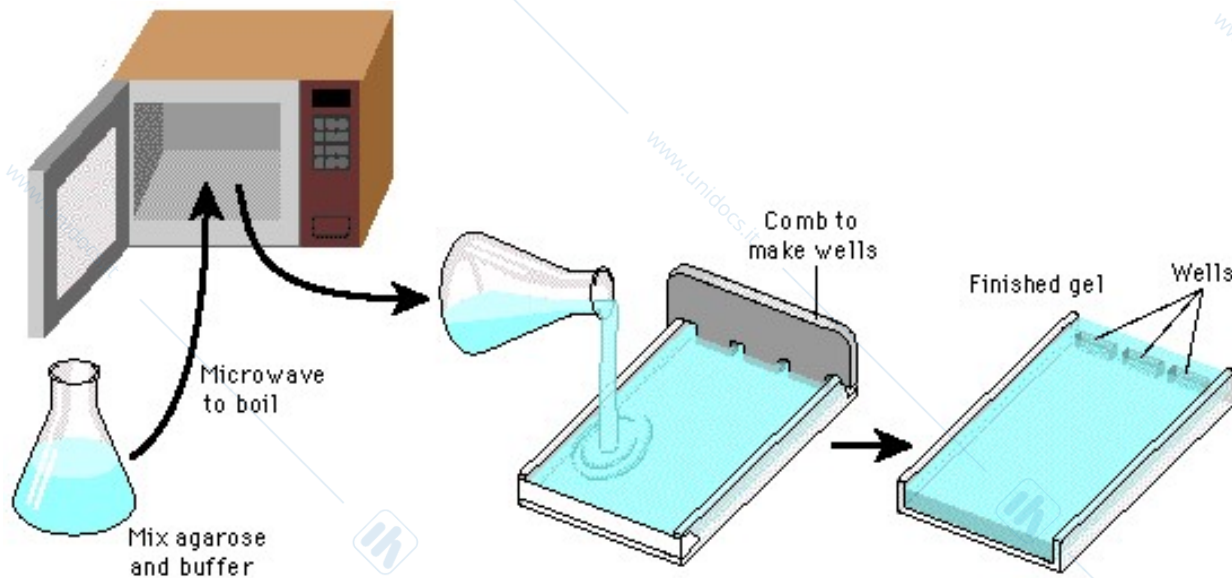
$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Perché è importante la costanza del pH?



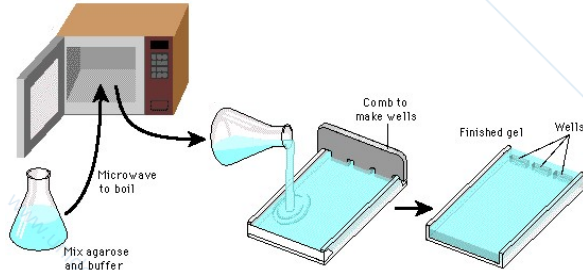
Preparazione di un gel di agarosio

- 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 tracciante, che serve come indicatore di corsa (es: orange), ed addensante (es. glicerolo), che consentire al campione di depositarsi nel pozzetto di caricamento
- 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

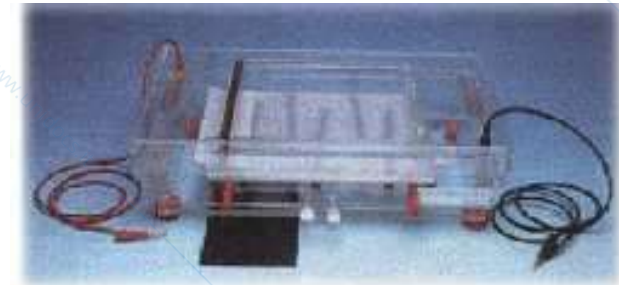


Preparazione di un gel di agarosio

- 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 tracciante, che serve come indicatore di corsa (es: orange), ed addensante (es. glicerolo), che consentire al campione di depositarsi nel pozzetto di caricamento
- 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:

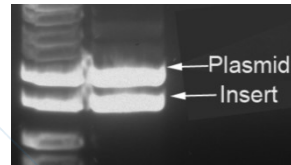
Minigel: si tratta di piccoli gel poco concentrati utilizzati per analizzare in tempi brevi piccole quantità di DNA.

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

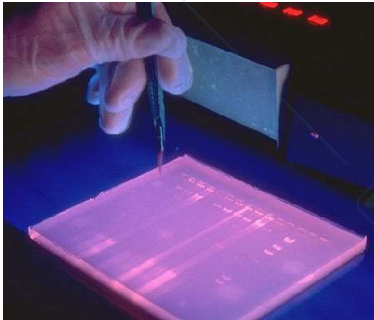
Low-melting-temperature gel: si tratta di gel costituiti da agarosio modificato chimicamente per sciogliersi e gelificare a basse temperature. Tale proprietà è utile per poter meglio recuperare il DNA ed utilizzarlo per altre analisi quali digestioni enzimatiche. In questo caso si può excidere la banda 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.

EXCISIONE DEI CAMPIONI DA GEL DI AGAROSO

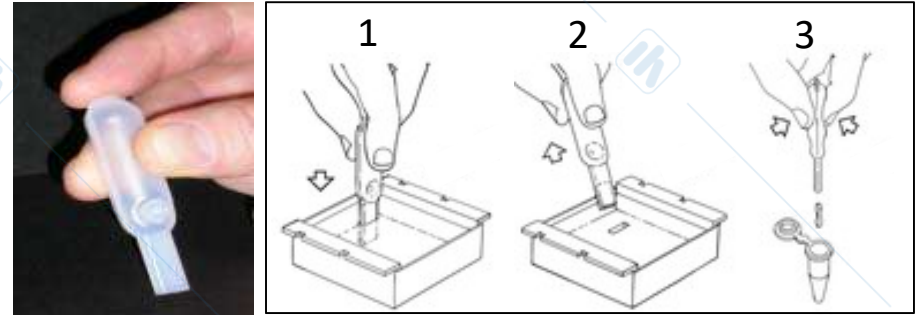
Dopo separazione per elettroforesi, è possibile **estrarre i frammenti di DNA** per successivi utilizzi (es. clonaggio)



Bisturi



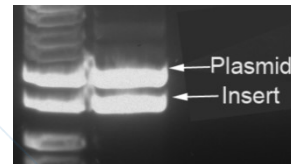
«Gel extraction tool»



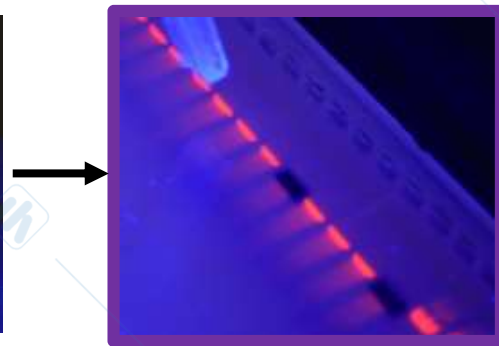
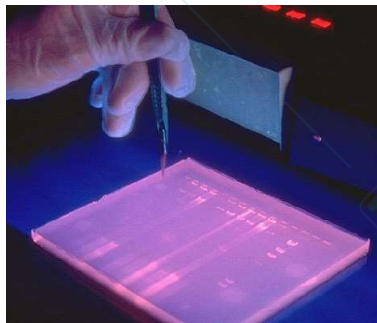
Basso tempo di esposizione agli UV per non danneggiare il DNA!!

EXCISIONE DEI CAMPIONI DA GEL DI AGAROSO

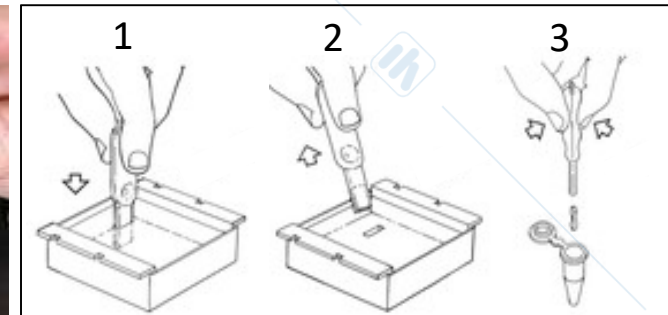
Dopo separazione per elettroforesi, è possibile **estrarre i frammenti di DNA** per successivi utilizzi (es. clonaggio)



Bisturi



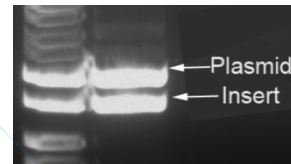
«Gel extraction tool»



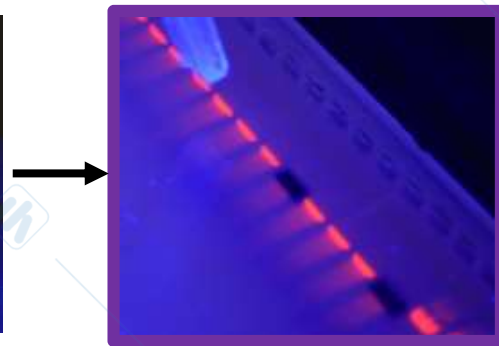
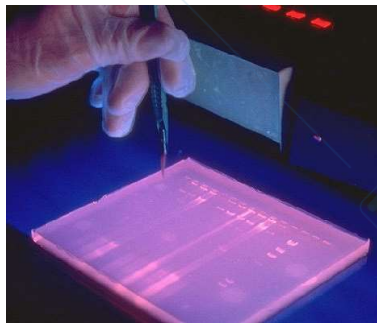
Basso tempo di esposizione agli UV per non danneggiare il DNA!!

EXCISIONE DEI CAMPIONI DA GEL DI AGAROSO

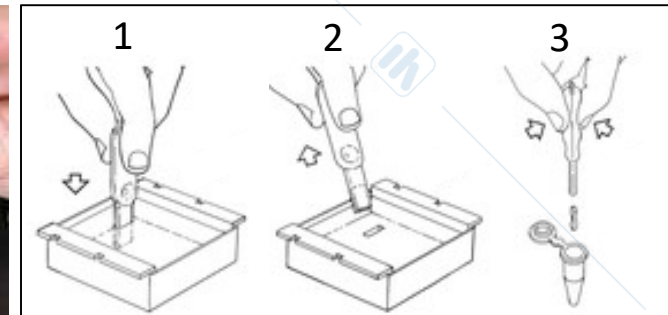
Dopo separazione per elettroforesi, è possibile **estrarre i frammenti di DNA** per successivi utilizzi (es. clonaggio)



Bisturi

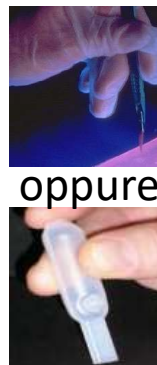
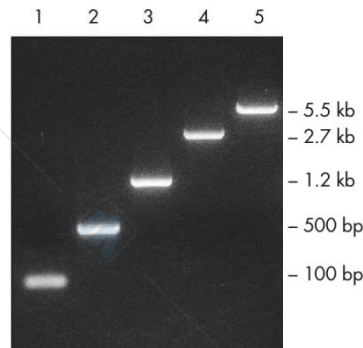


«Gel extraction tool»



Basso tempo di esposizione agli UV per non danneggiare il DNA!!

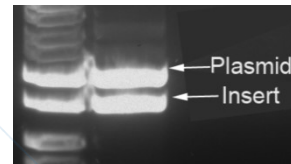
In commercio diversi kit per estrazione e purificazione (es. da enzimi, sali, agaroso, bromuro di etidio, ecc.) di frammenti di DNA (anche fino a 10 kb) da digestioni enzimatiche o PCR, con recupero del campione di DNA fino all'80%



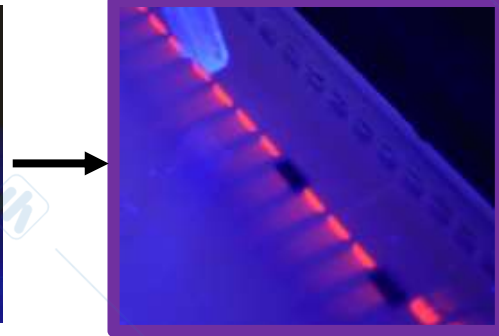
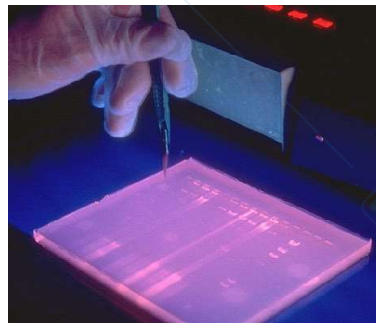
oppure

EXCISIONE DEI CAMPIONI DA GEL DI AGAROSO

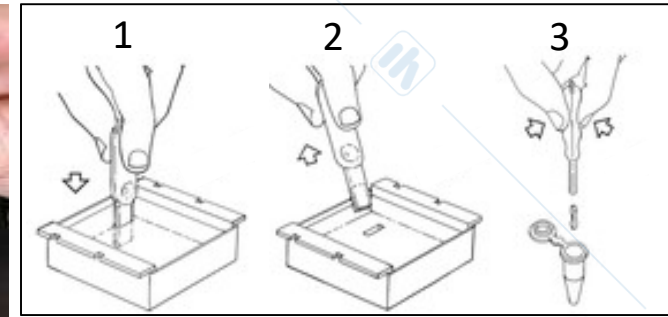
Dopo separazione per elettroforesi, è possibile **estrarre i frammenti di DNA** per successivi utilizzi (es. clonaggio)



Bisturi

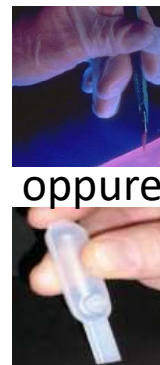
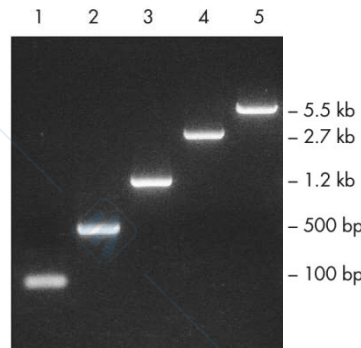


«Gel extraction tool»

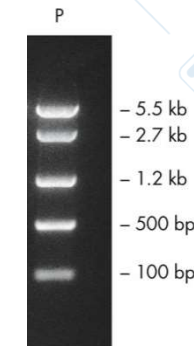


Basso tempo di esposizione agli UV per non danneggiare il DNA!!

In commercio diversi kit per estrazione e purificazione (es. da enzimi, sali, agaroso, bromuro di etidio, ecc.) di frammenti di DNA (anche fino a 10 kb) da digestioni enzimatiche o PCR, con recupero del campione di DNA fino all'80%



Estrazione, purificazione e controllo qualità della bande



ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

- **Gel:** La > parte dei campioni di DNA comunemente analizzata per elettroforesi è più grande di una proteina, perciò l'**agarosio** 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

ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

- **Gel:** La > parte dei campioni di DNA comunemente analizzata per elettroforesi è più grande di una proteina, perciò l'**agarosio** 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

- **Campione:** il DNA come prodotto di PCR, in forma di vettore, come campione digerito (es. vettore + inserto), ecc.

ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

- **Gel**: La > parte dei campioni di DNA comunemente analizzata per elettroforesi è più grande di una proteina, perciò l'**agarosio** risulta il sistema di elezione.

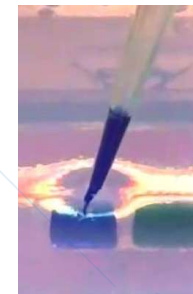
Agaroso 0.3%: doppie eliche da 5.000 a 60.000 bp

Agaroso 2%: doppie eliche da 100 a 3.000 bp

- **Campione**: il DNA come prodotto di PCR, in forma di vettore, come campione digerito (es. vettore + inserto), ecc.

- **Tracciante**: **orange**, **blu di bromofenolo**, **xilen-cianolo**.

Aggiunto al campione come indicatore del fronte elettroforetico, assieme ad un addensante.



ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

- **Gel**: La > parte dei campioni di DNA comunemente analizzata per elettroforesi è più grande di una proteina, perciò l'**agarosio** risulta il sistema di elezione.

Agaroso 0.3%: doppie eliche da 5.000 a 60.000 bp

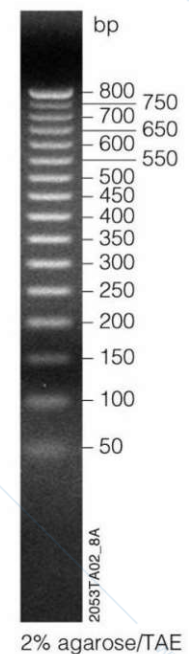
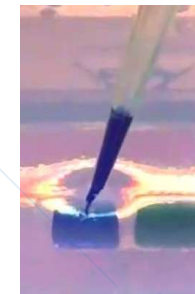
Agaroso 2%: doppie eliche da 100 a 3.000 bp

- **Campione**: il DNA come prodotto di PCR, in forma di vettore, come campione digerito (es. vettore + inserto), ecc.

- **Tracciante**: **orange**, **blu di bromofenolo**, **xilen-cianolo**.

Aggiunto al campione come indicatore del fronte elettroforetico, assieme ad un addensante.

- **Marcatore di dimensioni**: DNA fagici o plasmidi frammentati per restrizione enzimatica. Per confrontare migrazione/dimensione dei campioni



Restrizione enzimatica

Può servire per determinare la **presenza di una mutazione** all'interno di una regione di DNA amplificata per PCR.

La mutazione può **inserire** o **sopprimere** un **sito di restrizione**, evento sfruttato per **discriminare** tra DNA normale e DNA mutato.

Unità enzimatica per un enzima di restrizione

La quantità di enzima richiesto per digerire 1 μg di DNA di fago λ in 1 ora a **XX**°C in un volume di reazione di 50 μL .

Restrizione enzimatica

Può servire per determinare la **presenza di una mutazione** all'interno di una regione di DNA amplificata per PCR.

La mutazione può **inserire** o **sopprimere** un **sito di restrizione**, evento sfruttato per **discriminare** tra DNA normale e DNA mutato.

Dettaglio sperimentale:

Attenzione alla star activity!!

(L'enzima taglia il DNA a livello di siti simili, ma non identici, a quelli riconosciuti)

Conditions that Contribute to Star Activity
High glycerol concentration (> 5% v/v)
High concentration of enzyme/ μg of DNA ratio (varies with each enzyme, usually 100 units/ μg)
Non-optimal buffer
Prolonged reaction time
Presence of organic solvents [DMSO, ethanol (4), ethylene glycol, dimethylacetamide, dimethylformamide, sulphalane (5)]
Substitution of Mg^{2+} with other divalent cations (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+})

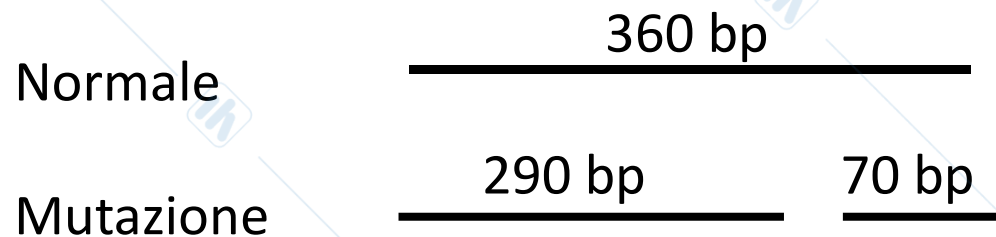
Unità enzimatica per un enzima di restrizione

La quantità di enzima richiesto per digerire 1 μg di DNA di fago λ in 1 ora a **XX**°C in un volume di reazione di 50 μL .

Restrizione enzimatica

Può servire per determinare la **presenza di una mutazione** all'interno di una regione di DNA amplificata per PCR.

La mutazione può **inserire** o **sopprimere** un **sito di restrizione**, evento sfruttato per **discriminare** tra DNA normale e DNA mutato.



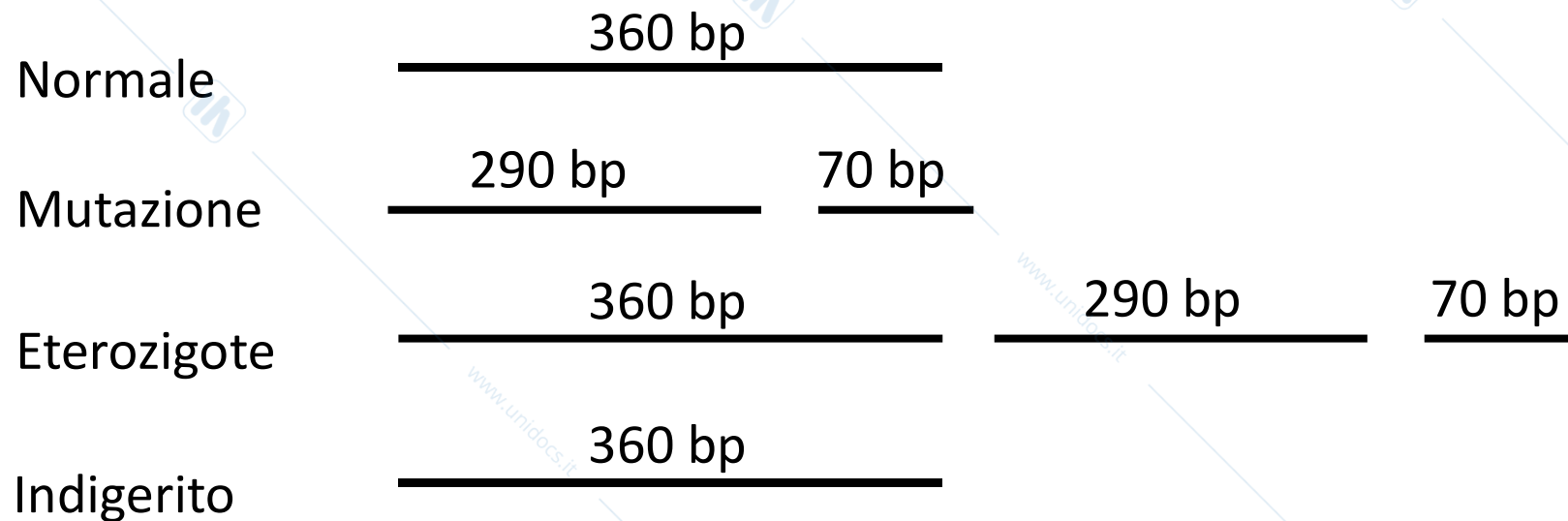
Unità enzimatica per un enzima di restrizione

La quantità di enzima richiesto per digerire 1 μg di DNA di fago λ in 1 ora a **XX** $^{\circ}\text{C}$ in un volume di reazione di 50 μL .

Restrizione enzimatica

Può servire per determinare la **presenza di una mutazione** all'interno di una regione di DNA amplificata per PCR.

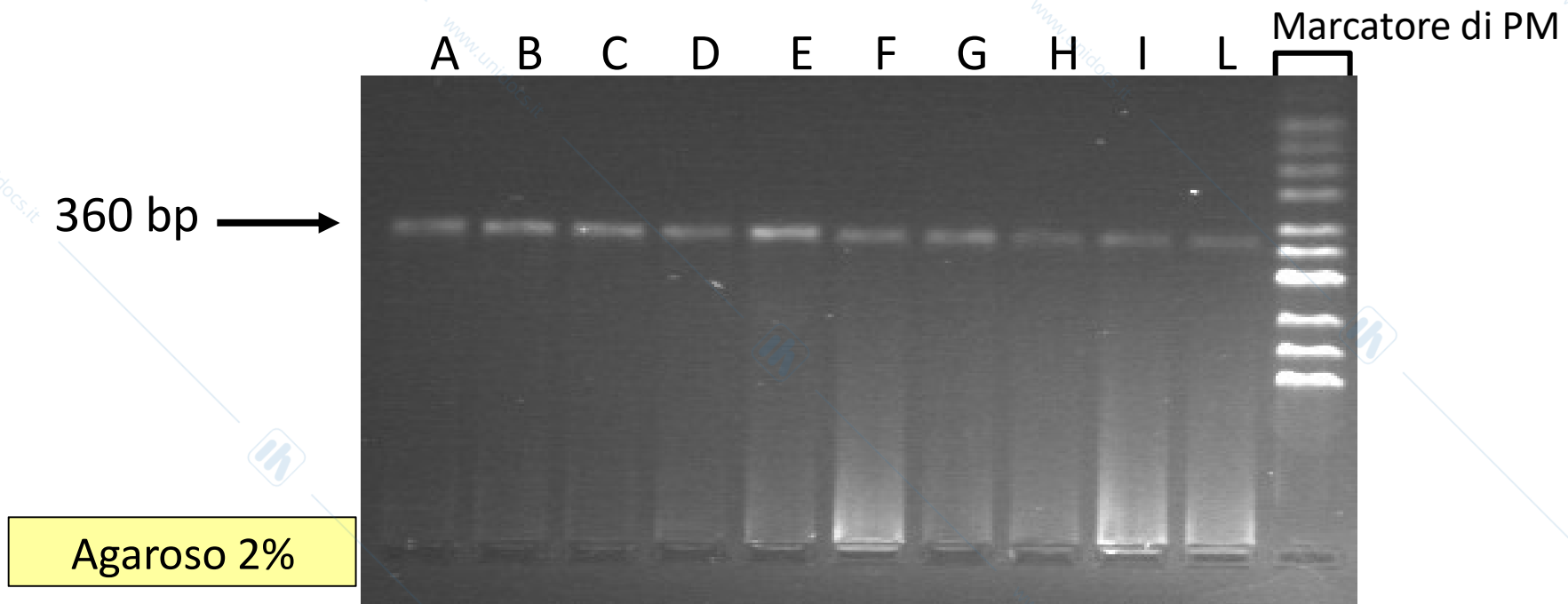
La mutazione può **inserire** o **sopprimere** un **sito di restrizione**, evento sfruttato per **discriminare** tra DNA normale e DNA mutato.



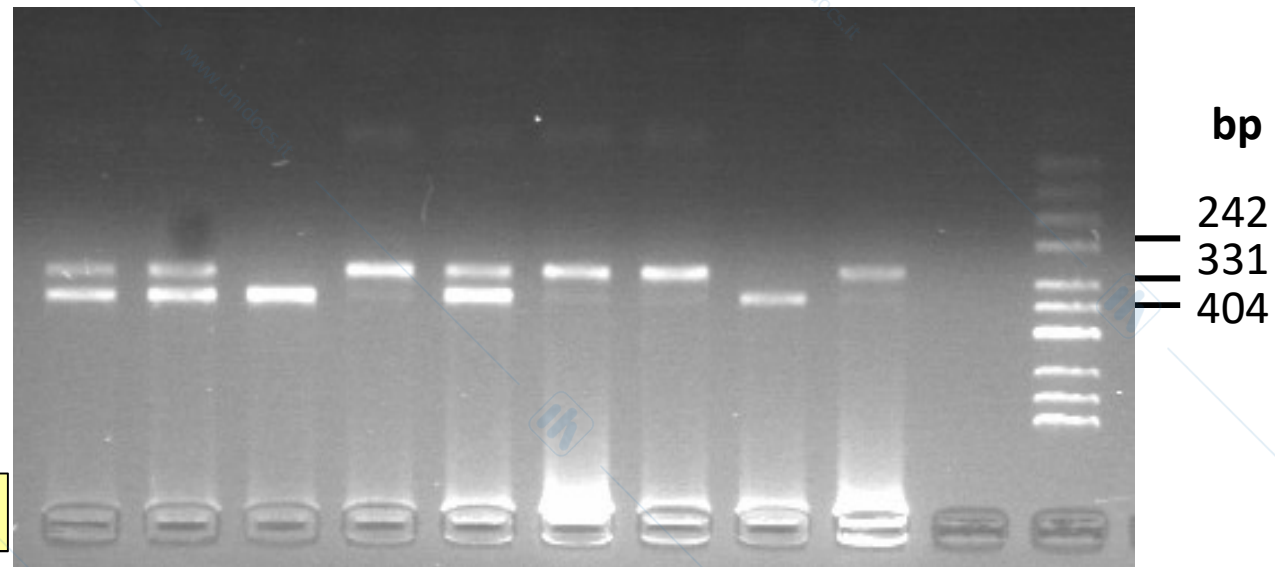
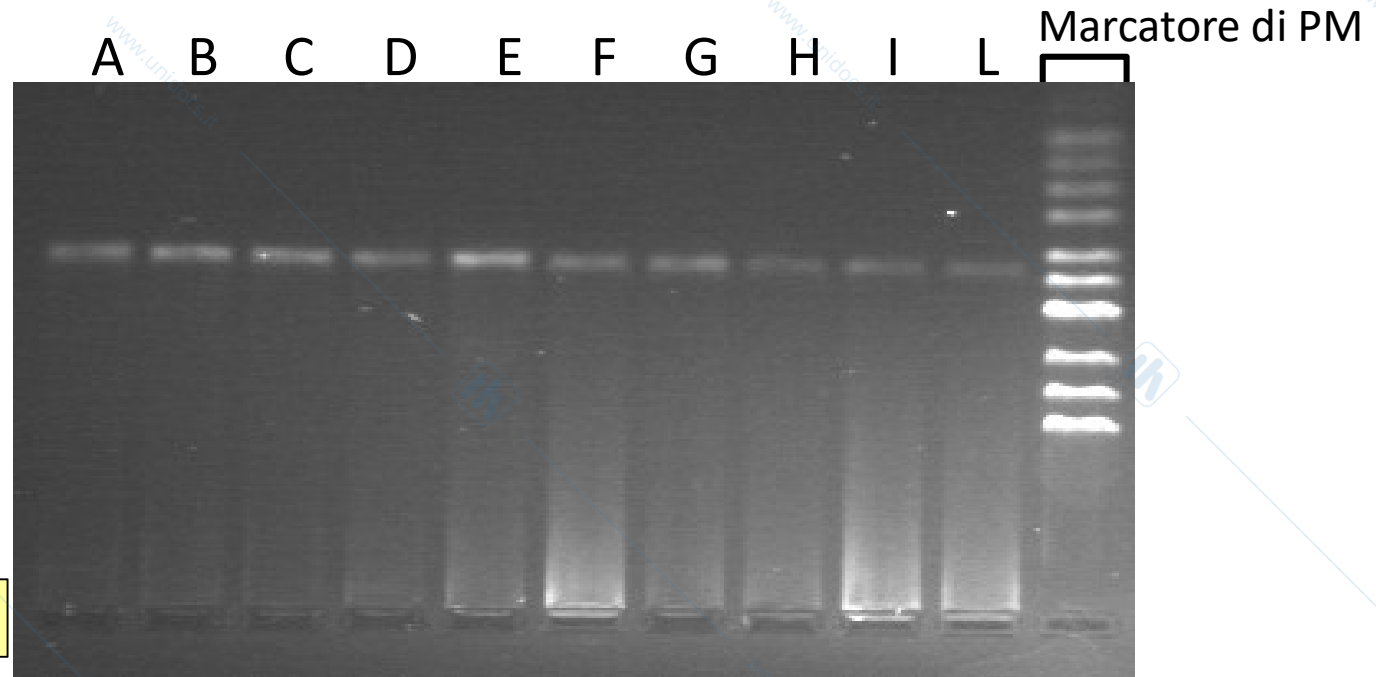
Unità enzimatica per un enzima di restrizione

La quantità di enzima richiesto per digerire 1 μg di DNA di fago λ in 1 ora a **XX** $^{\circ}\text{C}$ in un volume di reazione di 50 μL .

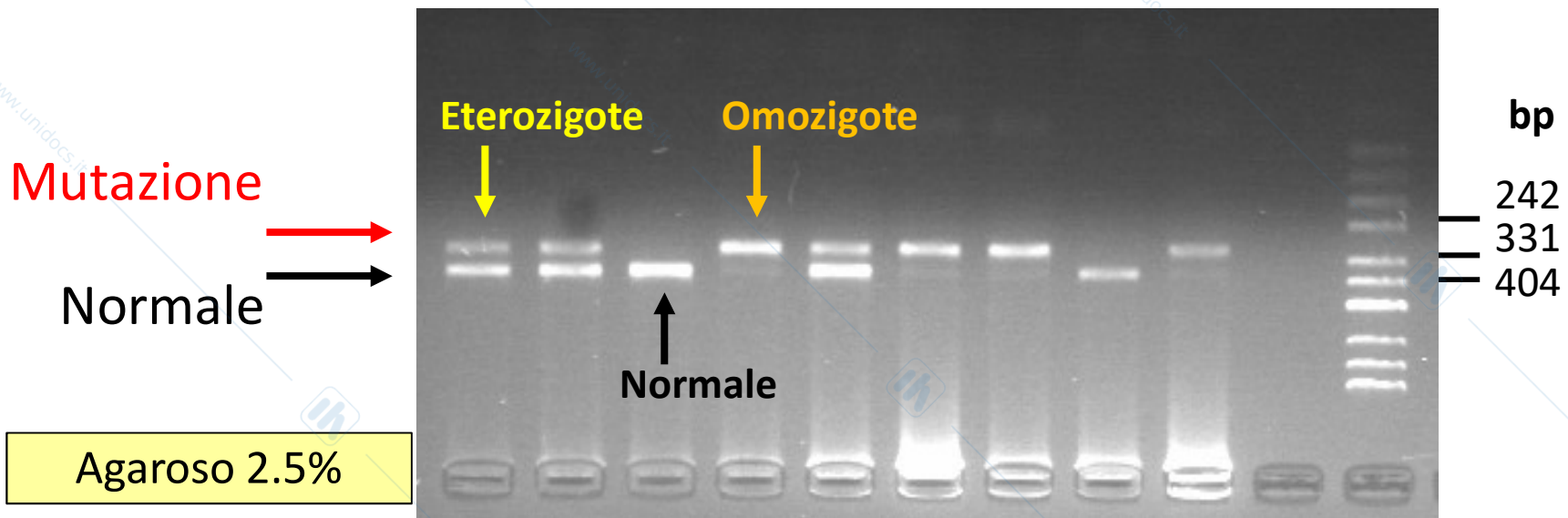
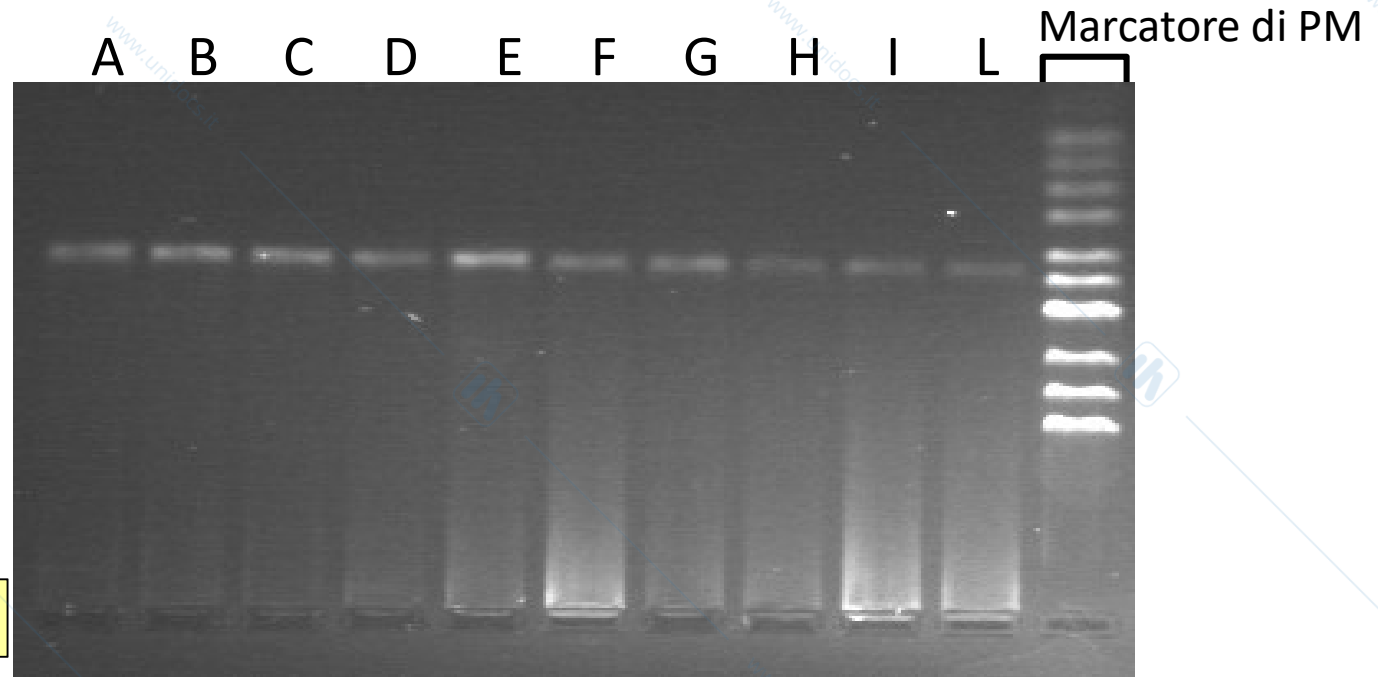
Restrizione enzimatica



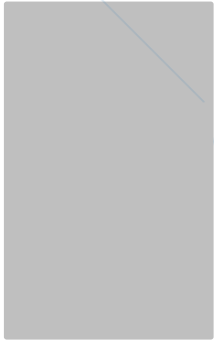
Restrizione enzimatica



Restrizione enzimatica



Protocollo di digestione con enzimi di restrizione

Reagenti	Concentrazioni iniziali	Concentrazioni finali	Volumi (μl)
DNA	500 ng/ μL	100 ng/ μL	 25 μl
Buffer	10X	1X	
BSA	100%	1%	
Enzima	20 U/ μL	5 U/camp.	
H ₂ O			

Tempo di digestione: X ore

Temperatura: X °C

Per i calcoli:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Oppure:

si ragiona sui rapporti di concentrazione dei reagenti tenendo in considerazione il volume finale

Protocollo di digestione con enzimi di restrizione

Reagenti	Concentrazioni iniziali	Concentrazioni finali	Volumi (μl)
DNA	500 ng/ μL	100 ng/ μL	5
Buffer	10X	1X	2.5
BSA	100%	1%	0.25
Enzima	20 U/ μL	5 U/camp.	0.25
H ₂ O			17
			<hr/> 25 μl

Tempo di digestione: X ore

Temperatura: X °C

Per i calcoli:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Oppure:

si ragiona sui rapporti di concentrazione dei reagenti tenendo in considerazione il volume finale