



## Laboratorio Itinerante BIOLOGIA

### **Rendiamo visibile il DNA**

Elettroforesi del DNA su gel di agarosio



## GUIDA PER L'INSEGNANTE

### ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

La corsa elettroforetica è un metodo di separazione di campioni basato sulla diversa velocità di migrazione di particelle, elettricamente cariche, attraverso una soluzione tampone.

Tramite l'elettroforesi si possono separare le molecole di DNA (i frammenti di restrizione del Kit 3 e i prodotti di PCR del Kit2) in funzione del loro peso molecolare. I frammenti di DNA hanno carica negativa dovuta ai residui di fosfato e pertanto, se sottoposti ad un campo elettrico, migrano attraverso le molecole del gel di agarosio, verso il polo positivo, separandosi per dimensione. I frammenti più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli grandi che hanno un maggiore peso molecolare. Il DNA è visibile alla fine della corsa elettroforetica dopo colorazione con un agente intercalante, come il bromuro di etidio, che si posiziona tra le basi azotate ed emette fluorescenza se colpito da una luce con una determinata lunghezza d'onda (i diversi frammenti di DNA si evidenziano sotto forma di bande distinte). Gli agenti intercalanti sono agenti mutageni ed il bromuro di etidio è stato sostituito nei laboratori di ricerca con sostanze meno tossiche che tuttavia vanno utilizzate con la dovuta cautela. In questo laboratorio si utilizza una colorazione alternativa (meno efficiente) ma più sicura per un laboratorio didattico.

Materiali e reagenti:

- agarosio per DNA elettroforesi
- tampone TAE (concentrato 50x)
- pipetta automatica 2-20 microlitri
- puntali 2 -20 microlitri
- blu di bromofenolo loading dye
- campioni da analizzare preparati dagli studenti: prodotto di amplificazione e di digestione con enzimi di restrizione conservati a -20°C
- marcatore peso molecolare DNA ladder 1Kb
- AzureA (concentrato 2x)

Avrete anche bisogno di un alimentatore e di una camera da elettroforesi. Se non sono disponibili nella scuola con il supporto del docente di Fisica si può costruire

**-UN TRASFORMATORE 36-45 V DI ALIMENTAZIONE** :fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica e pertanto i

cationi (ioni con carica +) migrano verso il catodo (polo -) e gli anioni (ioni con carica -) verso l'anodo (polo +).

-UNA CAMERA PER ELETTROFORESI

-UN PETTINE per la creazione di pozzetti. I pettini devono essere di dimensioni tali da ottenere pozzetti (buchi) in cui inserire i campioni di un volume di almeno 12 microlitri)

### Preparazione del gel di agarosio 0.8% (w/v)

-Preparare 500 ml di tampone TAE 1X ( 10ml di TAE 50x + 490 acqua distillata)

-Pesare 0,8gr di agarosio in polvere (forniti nel kit), metterlo in una beuta e aggiungere a 100 ml di tampone TAE.

*NB Nel kit sono presenti due microprovetta eppendorf da 1.5ml contenenti 0.8 gr di agarosio da utilizzare direttamente nel caso non si abbia una bilancia di precisione. Conservare la microprovetta utilizzata come riferimento di 0.8gr per successivi preparazioni di gel di agarosio*

-Bollire la soluzione finchè la polvere si scioglie completamente e non siano visibili grumi. Il modo migliore per preparare il gel è quello di utilizzare un forno a microonde in alternativa si può usare una piastra scaldante

*IMPORTANTE: Non riscaldare contenitori sigillati potrebbero esplodere!*

*Allentare sempre i tappi delle bottiglie, o riscaldare la soluzione di agarosio in contenitori (beute o becker) sigillati con una pellicola di plastica forato diverse volte per lasciare fuga di vapore.*

*Si noti inoltre che, l' agarosio caldo fuso può scottare, e pertanto deve essere maneggiato con cura, dovrebbero essere indossati guanti termici*

*Una volta bollita, la soluzione di agarosio può essere mantenuta fusa in un bagnomaria a 55-60 ° C fino a quando si è pronti a versarlo nella camera per elettroforesi. In alternativa, il gel può essere versato in un contenitore, come una bottiglia con tappo a vite, sigillato e mantenuto fino all'utilizzo. L'ideale è una bottiglia di vetro a bocca larga con tappo di plastica ad esempio le bottiglie in stile Duran®.*

*A differenza dell' agar nutriente il gel non consente la crescita di microrganismi, quindi può essere conservato a temperatura ambiente in contenitori sigillati per molti mesi. Per ri-sciogliere il gel, utilizzare un bagno a 60 ° o un forno a microonde. Anche se per il gel occorrono 30-40 ml è consigliabile sciogliere tutto l'agarosio (0,8gr) fornito con il KIT in una volta, piuttosto che cercare di preparare piccoli volumi con il rischio di preparare un gel a concentrazione sbagliata, che può influenzare in modo significativo il tempo necessario per eseguire il gel e la qualità dei risultati ottenuti. L'*

*agarosio è costoso: nel caso di allestimento di un gel non idoneo all'uso (un cattivo posizionamento del pettine o altro) l'agarosio può essere fuso nuovamente e riutilizzato. Si deve prestare attenzione a non permettere un'eccessiva evaporazione dal gel quanto è ri-riscaldato, per non alterare la concentrazione di agarosio, che rallenterà il movimento dei frammenti di DNA. Non tentare di riutilizzare agarosio che è già stato utilizzato per gel elettroforesi*

### **Colorante Azur A**

La soluzione concentrata (2X) di colorante per il DNA è AzurA 0,08% disciolto in 40% di alcool denaturato. Tale soluzione non deve essere usata vicino alla fiamma e deve essere conservata in recipienti chiusi per evitare l'evaporazione del solvente.

La soluzione di colorante concentrata e quella diluita vanno conservate a temperatura ambiente. Evitare l'esposizione alla luce solare.

L'AzurA e altri coloranti simili (AzurB e Bleu di metilene) si legano in maniera reversibile alla parte esterna dell'elica del DNA e di conseguenza non sono mutageni. Prima dell'uso la soluzione concentrata deve essere diluita in un uguale volume di acqua distillata. Anche se a tale concentrazione la sostanza non presenta rischio è opportuno proteggere la pelle e gli occhi (guanti e occhiali). La soluzione diluita utilizzata può essere recuperata e riutilizzata più volte aumentando i tempi di esposizione (> 4 minuti)

## Guida per lo Studente

Tramite l'elettroforesi si possono separare le molecole di DNA (i frammenti di restrizione e i prodotti di PCR dei precedenti laboratori) in funzione del loro peso molecolare

### -Materiali e reagenti

- Agarosio
- Tampone per elettroforesi TAE buffer 50X
- pipetta automatica 2-20 microlitri
- puntali per pipetta automatica 2-20 $\mu$ l
- Loading dye 6X
- Soluzione per la colorazione del il DNA (Azur A 2X disciolto in 20% di etanolo).
- marcatore di peso molecolare (DNA ladder 1Kb)
- Un pennarello indelebile punta fine

Avrete anche bisogno di

-Acqua distillata non necessariamente sterile per diluire il TAE 50X

-Cilindro plastica o vetro da 1 litro

-Cilindro plastica o vetro da 100ml

-Piastra scaldante possibilmente con agitazione oppure forno a microonde per sciogliere la soluzione di agarosio

-Magnetino per piastra

-Guanto da cucina per materiale bollente scaldante con agitazione

-Alimentatore\*)

-Camera per elettroforesi e relativo pettine\*

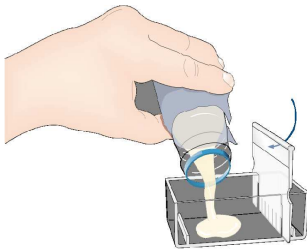
\* si possono costruire: quelli in commercio sono costosi perché sono ad alto voltaggio e rispondono a norme di sicurezza. Per i laboratori scolastici si può usare un voltaggio basso (45V)

-una vaschetta di dimensioni maggiori del gel per effettuare la colorazione dei frammenti di DNA con l' AzurA

Sarebbe auspicabile la presenza di una lampada UV in modo effettuare una colorazione del DNA più efficiente. La colorazione con l' AzurA consente di visualizzare DNA presenti in elevata quantità (es prodotti di PCR ) ma non è altrettanto valida per basse quantità di DNA quali i frammenti di DNA di piccole dimensioni ottenuti con enzimi di restrizione

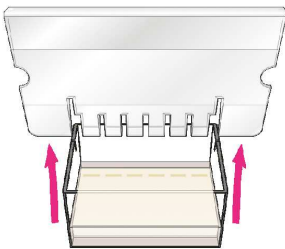
### Preparazione del gel di agarosio 0.8% (w/v)

- Preparare 500 ml di tampone TAE 1X ( 10ml di TAE 50x + 490 acqua distillata) -Pesare 0,8gr di agarosio in polvere (forniti nel kit), metterlo in una beuta e aggiungere a 100 ml di tampone TAE.
- Bollire la soluzione finchè la polvere si scioglie completamente e non siano visibili grumi.
- Inserire nella vaschetta per elettroforesi il pettine per creare i pozzetti
- Versare l'agarosio sciolto



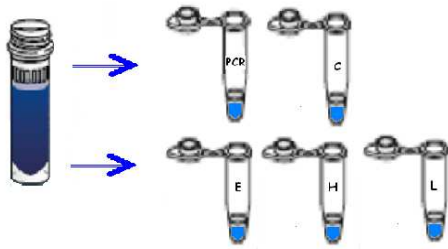
Agarosio a 55-60°C

- Attendere la solidificazione del gel (il gel solidificando diventa opaco).
- Rimuovere il pettine



Prima di rimuovere il pettine  
Versare il tampone TAE1X  
sopra il gel

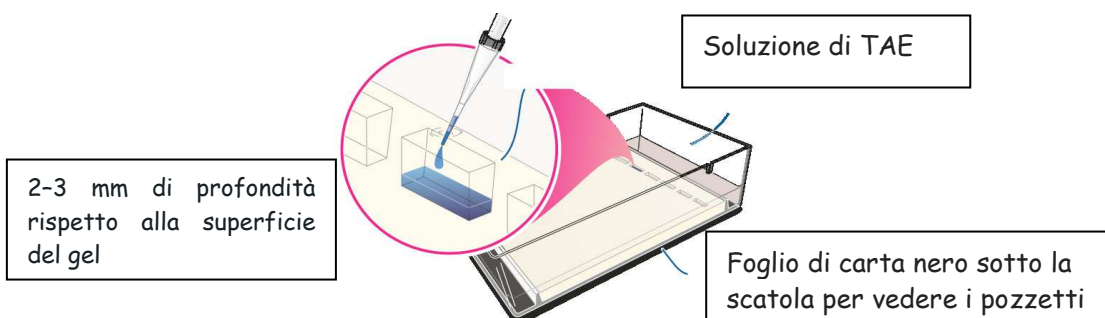
Aggiungere colorante di caricamento loading dye 6X (concentrato 6 volte) in ciascun campione di DNA. Per un campione di 10 microlitri aggiungere 2 microlitri di loading dye 6X.

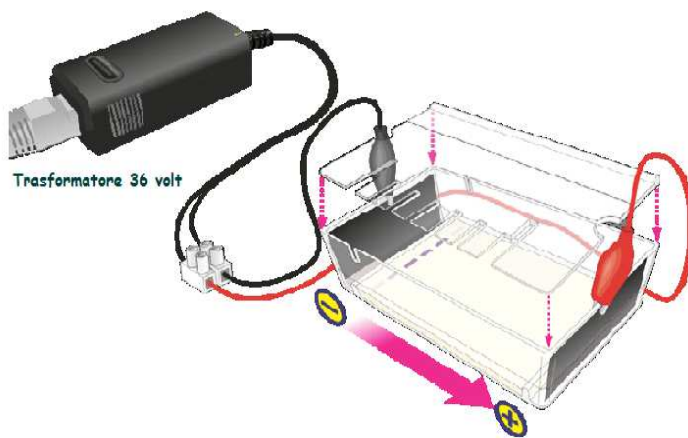
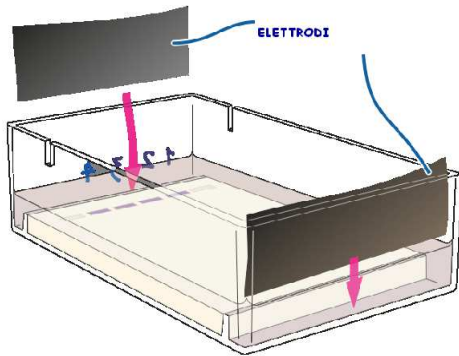


Il loading dye ha due scopi: 1) è disciolto in una soluzione densa di saccarosio e quando si caricano i campioni consente di mettere bene sul fondo il materiale 2) consente di seguire l'andamento della corsa elettroforetica perché a differenza del DNA è visibile

Inserire con la micropipetta (2-20 $\mu$ l) i campioni colorati (12  $\mu$ l) nei pozzetti numerati con il pennarello (1 2 3 4 5 etc). A ciascun numero deve corrispondere un determinato campione. Annotare la corrispondenza numero-campione e ricordarsi di mettere il marcatore di peso molecolare

1. 12  $\mu$ l controllo negativo PCR (provetta C) gruppo studenti A
  2. 12  $\mu$ l prodotto PCR (provetta PCR) gruppo studenti A
  3. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  non digerito (provetta L) gruppo studenti A
  4. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *EcoRI* (provetta E) gruppo studenti A
  5. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *HindIII* (provetta H) gruppo studenti A
- A
6. 5  $\mu$ l marcatore peso molecolare DNA ladder 1Kb
  7. NO caricamento
  8. 12  $\mu$ l controllo negativo PCR (provetta C) gruppo studenti B
  9. 12  $\mu$ l prodotto PCR (provetta PCR) gruppo studenti B
  10. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  non digerito (provetta L) gruppo studenti B
  11. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *EcoRI* (provetta E) gruppo studenti B
  12. 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *HindIII* gruppo studenti B





I frammenti grandi si muovono lentamente attraverso le maglie del gel mentre quelli piccoli si muovono più velocemente

Nota: il voltaggio che si deve applicare dipende da vari parametri: lunghezza e spessore del gel, concentrazione di agarosio, tipo di tampone di elettroforesi utilizzato. Per questo laboratorio consiglia di utilizzare una tensione costante di 45 V per 60 minuti



## Colorazione del gel di agarosio

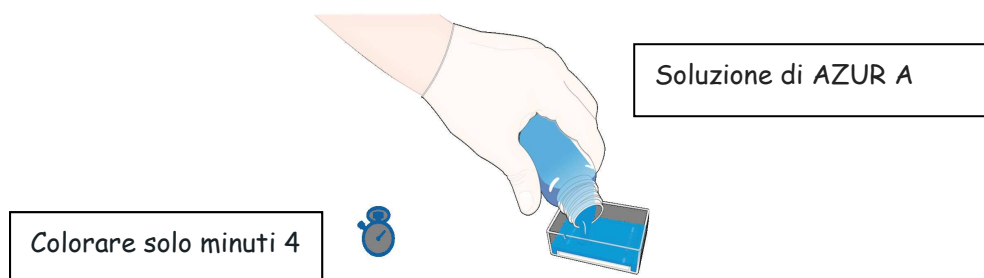
Dopo aver separato tramite elettroforesi i frammenti di DNA, ottenuti con la PCR o con la digestione con enzimi di restrizione, è necessario effettuare una colorazione che renda visibile tali frammenti per poter calcolarne le dimensioni e confrontarle con il risultato atteso.

### Materiali e reagenti

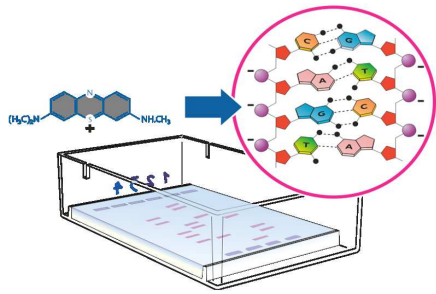
- una vaschetta di dimensioni maggiori del gel
- Azur A diluito 1X.
- acqua di rubinetto
- una vaschetta di dimensioni maggiori del gel
- una lastra sottile (tipo pellicola fotografica ) per sostare il gel nella vaschetta senza romperlo

### Procedimento

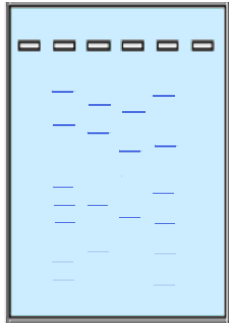
- 1-Immergere il gel in una vaschetta coprirlo con la soluzione di Azur  
Lasciare a temperatura ambiente per 4 minuti



- 2-Recuperare la soluzione di colorante e versarla in una bottiglia .Si può utilizzare più volte
- 3-Sciacquare il gel con acqua corrente per qualche secondo (il getto di acqua non deve essere violento)
- 4-Aggiungere acqua fino a coprire il gel
- 5-Eliminare l'acqua e ripetere il punto 4 e 5
- 6-Lasciare il gel in acqua e attendere la comparsa di bande colorate in blu.  
Può essere necessario attendere anche 1 ora



L'Azure A carico positivamente si lega ai gruppi fosfato del DNA



La colorazione con Azure A rende **visibili** i frammenti di DNA di diverse dimensioni (bande). Osservare che le bande corrispondenti a frammenti di piccole dimensioni sono quasi invisibili

Nella figura sottostante è mostrata la foto di un gel in cui sono stati caricati

- pozzetto 1
- pozzetto 2
- pozzetto 3

- 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *Eco*RI (provetta E)
- 12  $\mu$ l DNA  $\lambda$  digerito con *Hind*III (provetta H)
- 5  $\mu$ l marcatore peso molecolare DNA ladder 1Kb

Condizioni di corsa 80V per 2h. La corsa elettroforetica è stata interrotta dopo circa 10cm quando il colorante blu del loading buffer era arrivato alla fine del gel

1 2 3



## Costo del materiale necessario per Elettroforesi su gel di agarosio

<i>Descrizione</i>	<i>N. catalogo</i>	<i>Costo</i>
Agarose LE Agarose for Nucleic Acids routin screening electrophoresis. 500 g	Cod.EMR920500	155,00
TAE buffer (50X). 1 L	Cod.EMR064001	46,03
Primo boil-proof microcentrifuge tubes 1,5 ml in re-sealable bags. 1000 pcs	Cod.ET3415	9,80
PRIMO gilson yellow beveled 2-200 ul Racked. 960 pcs.	Cod.ECTY200RN	24,95
Pipetta meccanica monocanale Primo® 2 - 20ul.	Cod.ECP10020	78,00

Ditta fornitrice del materiale

**EuroClone S.p.A**

**Via Figino, 20/22 -20016 Pero (MI) Italia**

**Tel + 39.02.38.19.51**

**Fax +39.02.38.10.14.65**

I costi sono relativi all'offerta 185587 del 25/11/2014