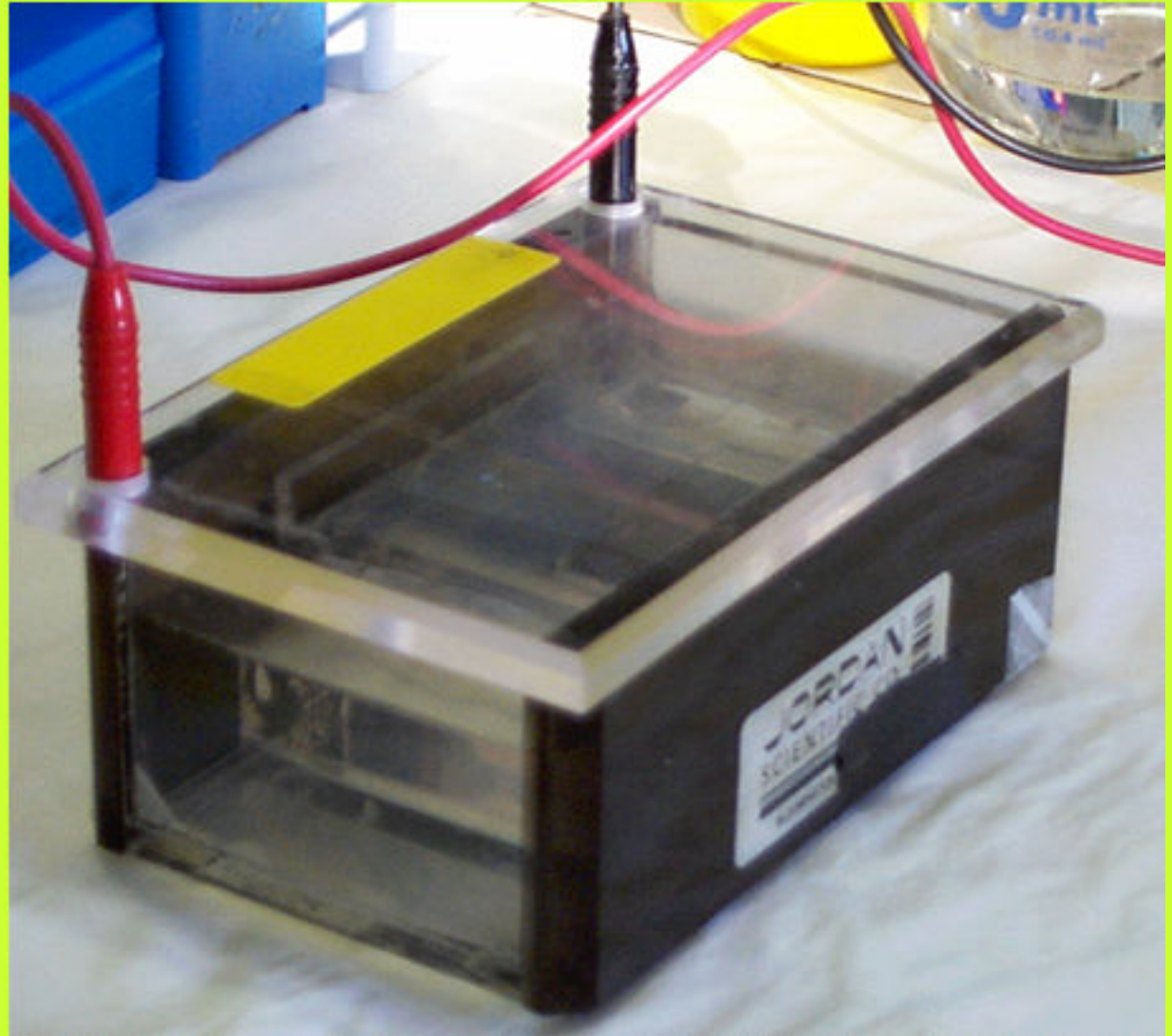




# Elettroforesi in gel di Agarosio

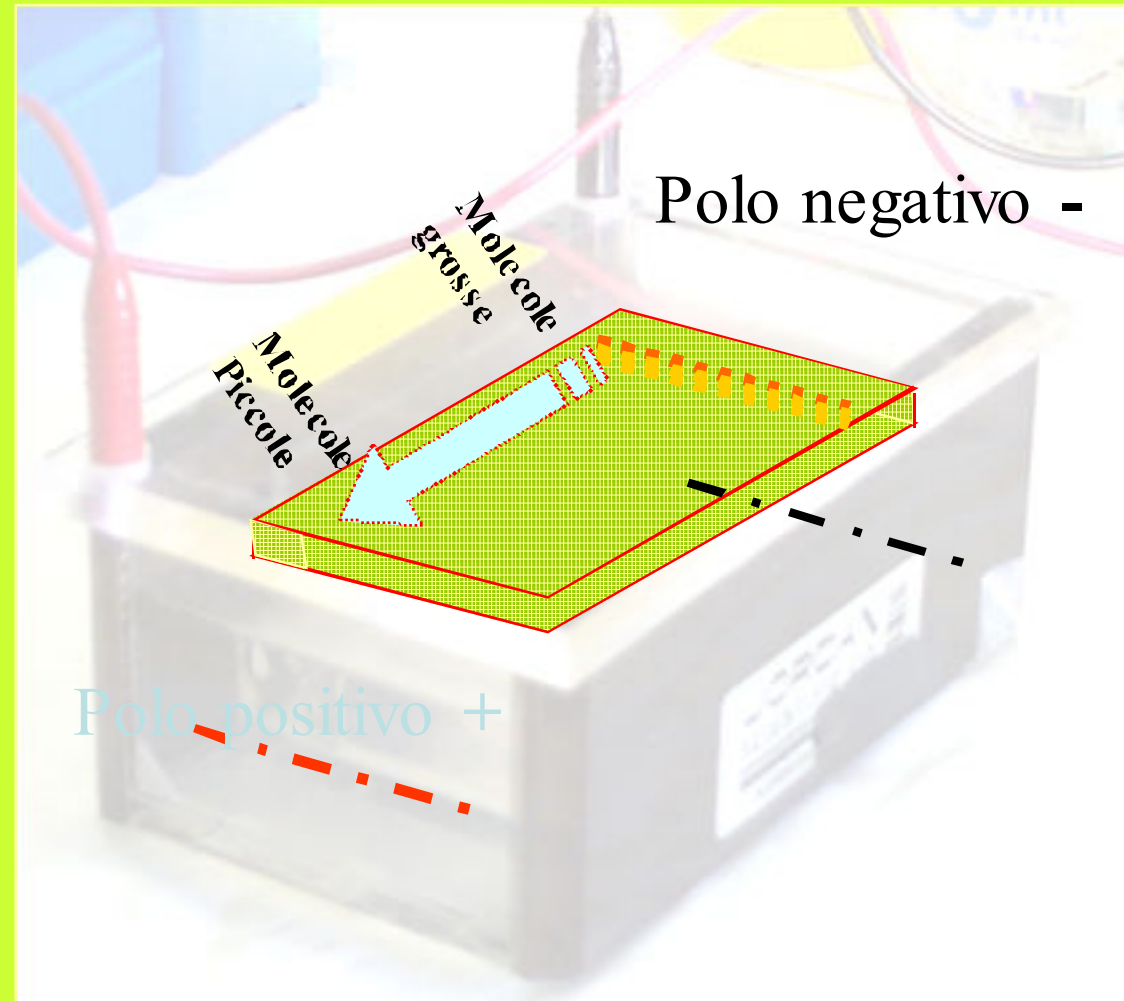
Le molecole di DNA possono essere separate in base alla loro dimensione, facendole migrare attraverso una matrice polimerica sotto l'attrazione di un campo elettrico





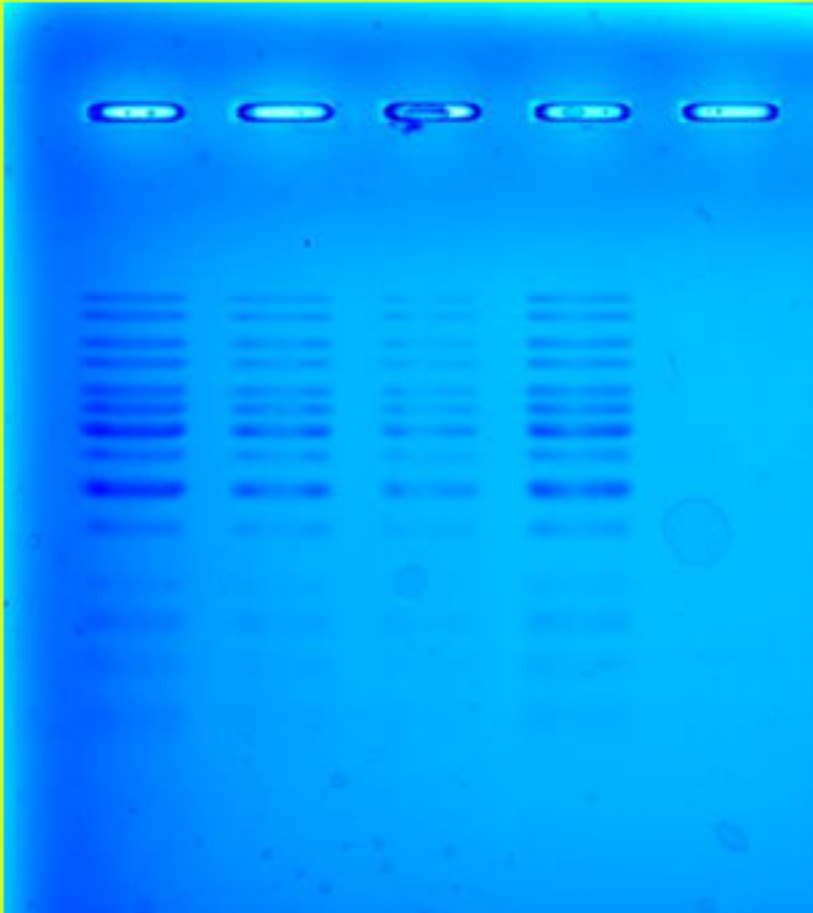
# Elettroforesi in gel di Agarosio

Il gel di agarosio svolge la funzione di «setaccio molecolare», opponendo una maggiore resistenza alla migrazione delle molecole più grandi, che pertanto si sposteranno più lentamente.





# Visualizzare il DNA



La visualizzazione del DNA presente nel gel al termine della separazione elettroforetica viene tipicamente effettuata con un colorante intercalante, il bromuro di etidio, che risulta fluorescente quando eccitato ai raggi UV.

Purtroppo questa sostanza è pericolosa essendo mutagena. Anche l'uso di raggi UV non è poi scevro da rischi.

Di recente sono state però immessi in commercio alcuni coloranti dotati di tossicità molto limitata, come il ***SYBR Safe***, il **Gel Green** o il **Gel Red** che non risultano nocivi alle concentrazioni d'uso.

Una altra possibile alternativa, dotata di minore sensibilità, consiste nella post-colorazione del gel con una **soluzione acquosa di Blu di Metilene**.



# Materiale minimo da procurare



Volendo realizzare un esperimento di elettroforesi, l'aspetto economicamente più impegnativo è costituito dall'apparato di elettroforesi. Vedremo come è possibile superare questo scoglio.

E' comunque indispensabile disporre di:

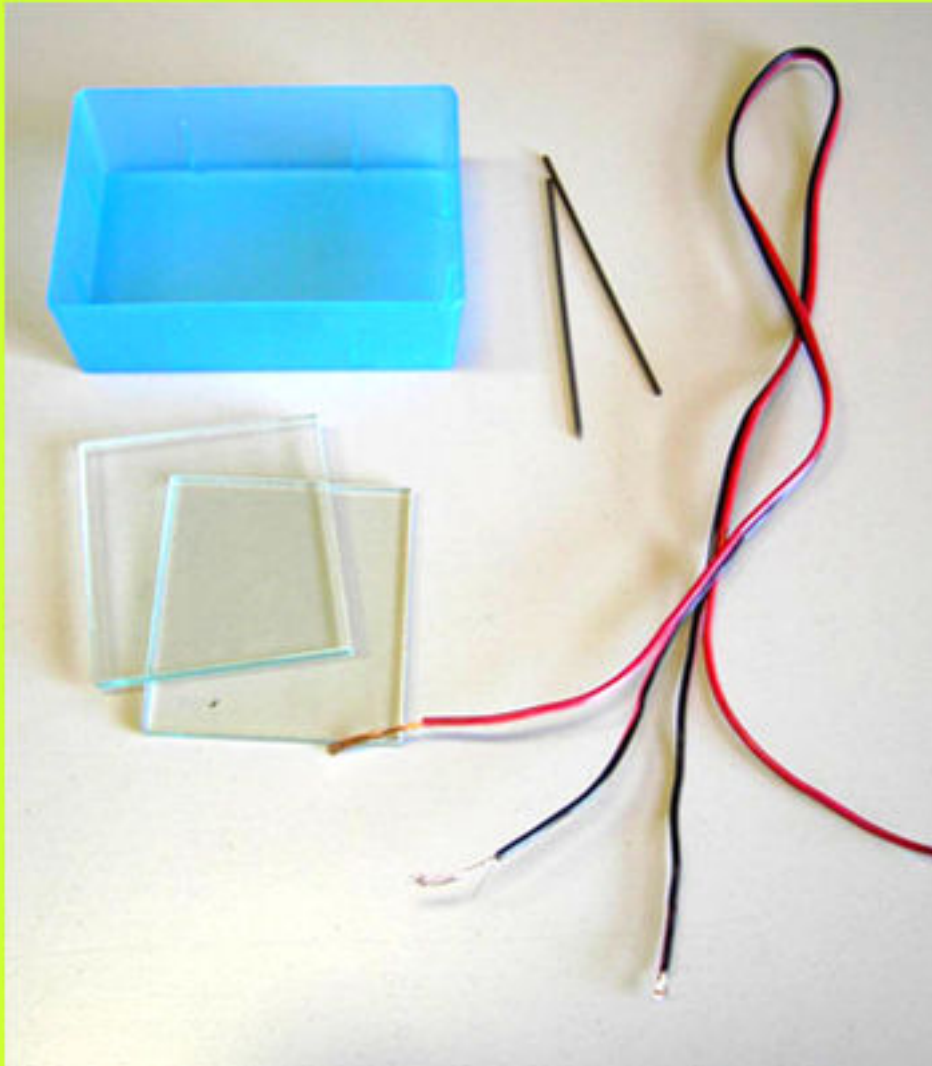
- Agarosio per elettroforesi
- Tampone elettroforetico Tris-Acetato-EDTA
- Campioni di DNA da analizzare (plasmidi o miscele di frammenti di DNA)
- Gel loading buffer
- Colorante per DNA
- Marker di peso molecolare (opzionale)
- Micropipetta o capillari tarati per la preparazione ed il caricamento dei campioni

Questi prodotti sono facilmente reperibili dai fornitori di materiale da laboratorio. Per il loro utilizzo e composizione, vedere anche la presentazione «Miniprep ed elettroforesi»





# Autocostruzione di un apparato per elettroforesi



Procurarsi:

- Una scatoletta di plastica rettangolare (le dimensioni indicative vanno da circa 7x12 a 10x15 cm.)
- due lastre di vetro quadrate di 5 mm di spessore e di lato uguale alla larghezza interna della scatoletta
- Due mine di grafite da 2 mm per matita (il grado di durezza non è determinante ma se si devono acquistare è meglio richiedere quelle dure, come le 2H, perché più resistenti)
- 40 cm di cavo elettrico bipolare (meglio la piattina rosso/nero)



# Preparazione degli elettrodi



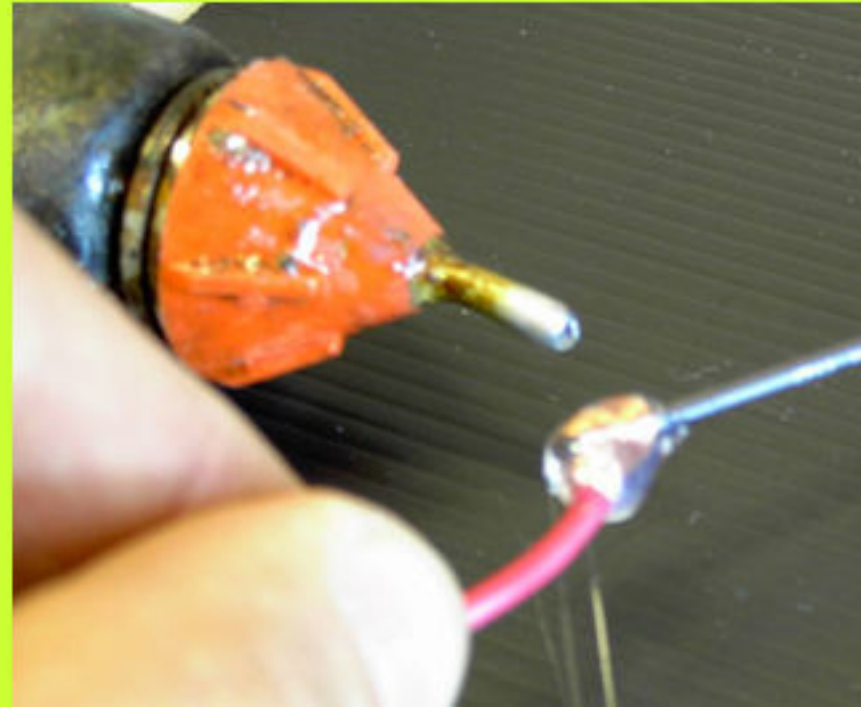
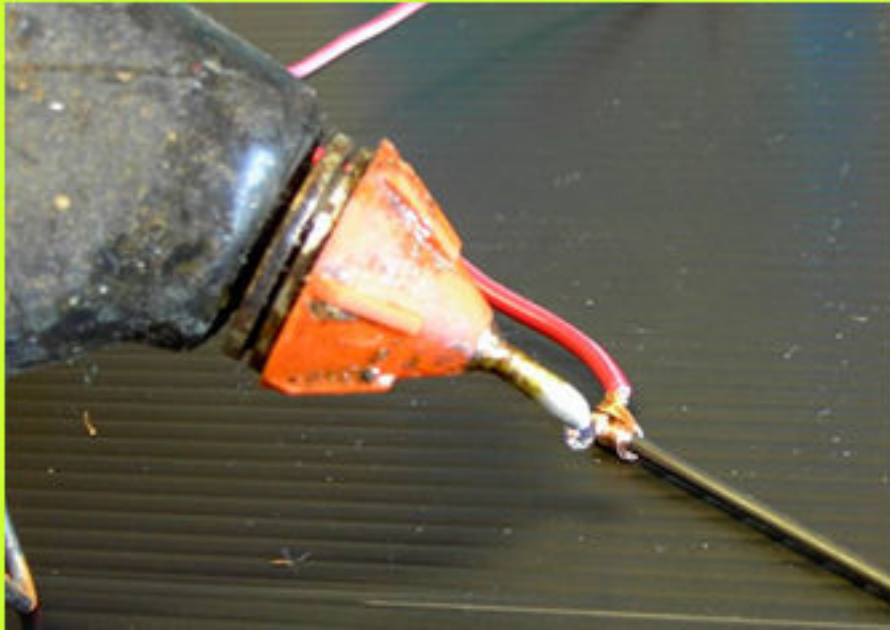
Le mine di grafite saranno rotte alla misura corrispondente al lato corto della vaschetta

Per i collegamenti elettrici si denudano circa 2 cm di conduttore all'estremità del cavo e si avvolgono sulla porzione terminale della mina, abbastanza stretti da garantire un buon contatto elettrico.





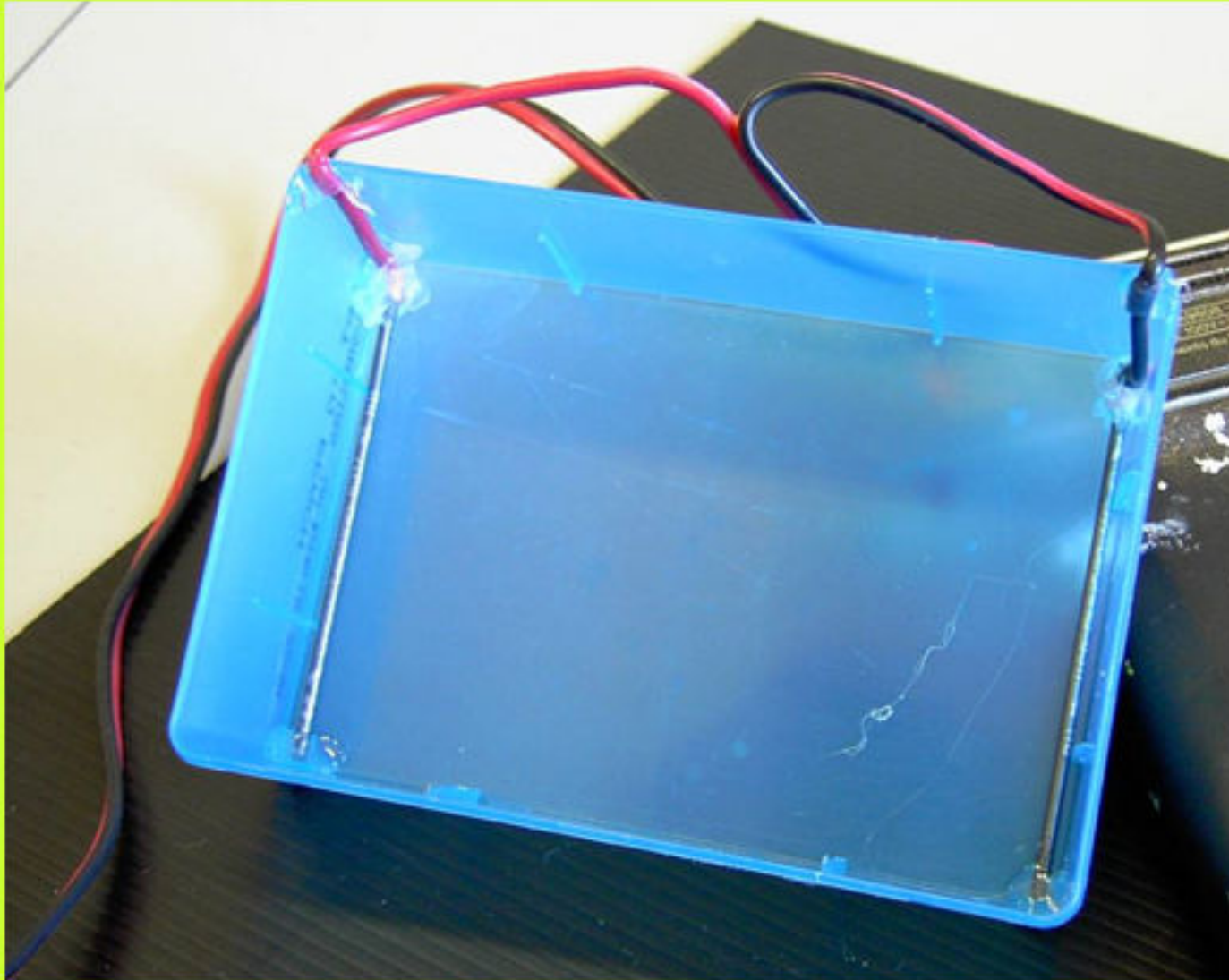
# Sigillatura degli elettrodi



Utilizzando del sigillante al silicone o una pistola per colla a caldo, si riveste accuratamente il punto di giunzione in modo da isolare completamente il rame nudo da ogni contatto con l'esterno.



# Fissazione degli elettrodi

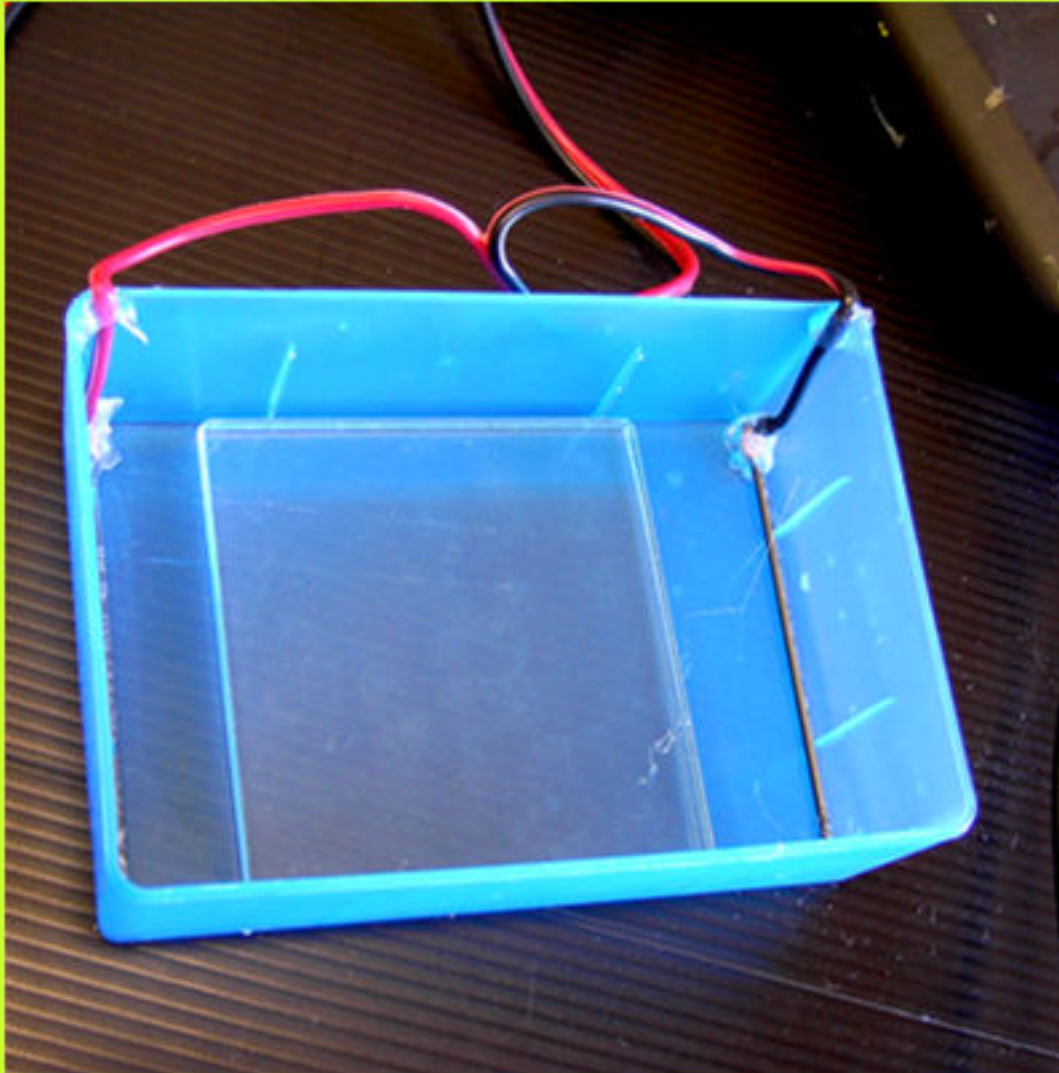


Quindi, con lo stesso adesivo, si fissano i due elettrodi sul fondo della vaschetta, uno per ognuno dei lati corti





# Piano di supporto

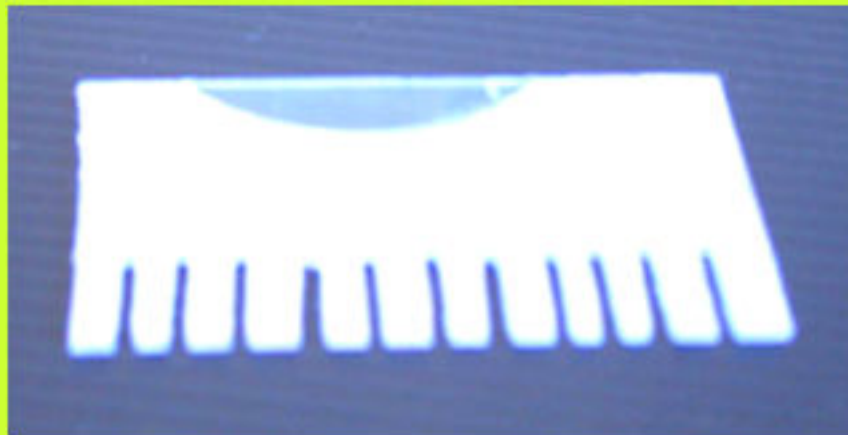


Al centro della vaschetta si posiziona uno dei due vetrini, che servirà come appoggio per l'altro vetro, sul quale sarà preparato il gel di agarosio.

Questo accorgimento è necessario per garantire un sufficiente livello di tampone alle due estremità del gel durante la corsa elettroforetica.



# Preparazione del pettine



Il pettine è costituito da un qualsiasi attrezzo in grado di lasciare l'impronta dei pozzetti nel gel (al limite anche un pettine per capelli con i denti un po' larghi).

Nel nostro caso il pettine è stato realizzato tagliando con un seghetto per metallo un vecchio CD inutilizzato, e ricavandone dei denti di circa 4 mm di larghezza, poi rifiniti con una limetta.



# Alimentatore per elettroforesi



Per l'alimentazione, quando si voglia ripetere l'esperimento solo tre o quattro volte, si possono usare 5 pile transistor da 9v, che saranno collegate in serie per dare circa 45v. *Per motivi di sicurezza non è opportuno utilizzare più di cinque pile collegate in serie.*

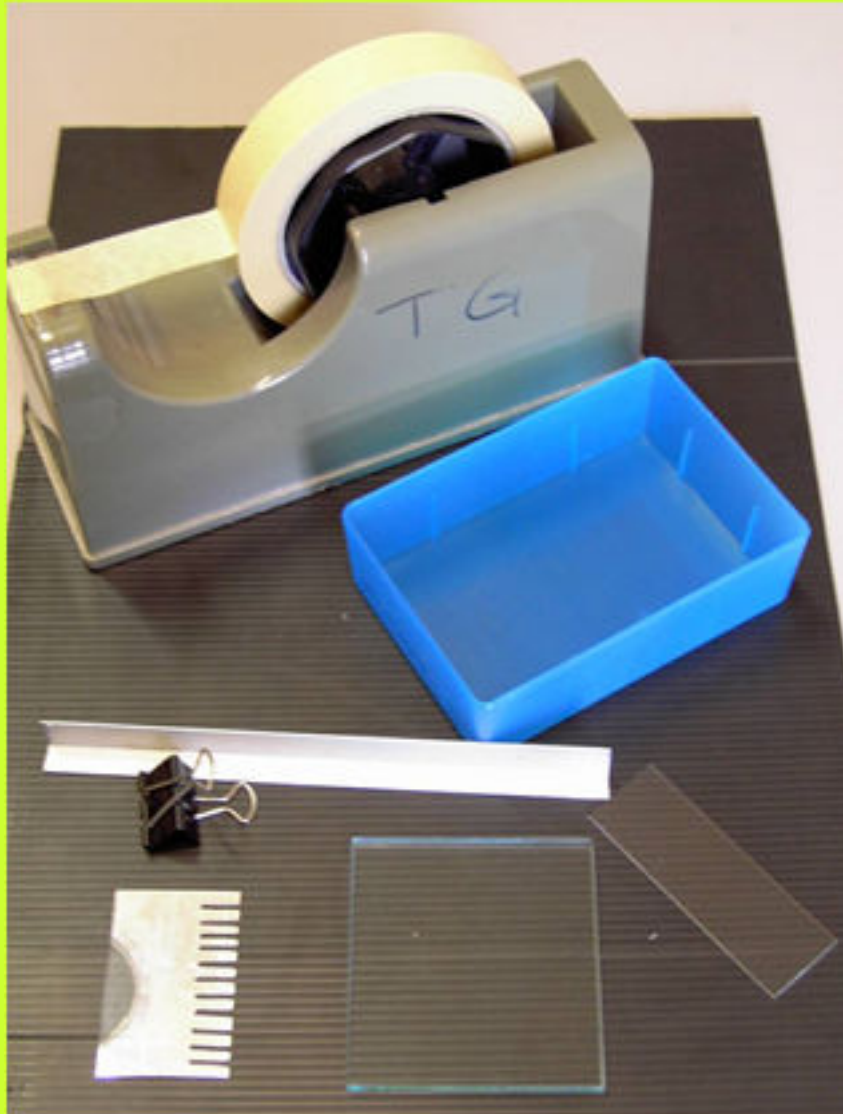
(Per un utilizzo più intensivo, può essere conveniente procurarsi un piccolo alimentatore in grado di erogare 35-50V ed una corrente di 50-100mA)

45V





# Struttura per la preparazione del Gel elettroforetico



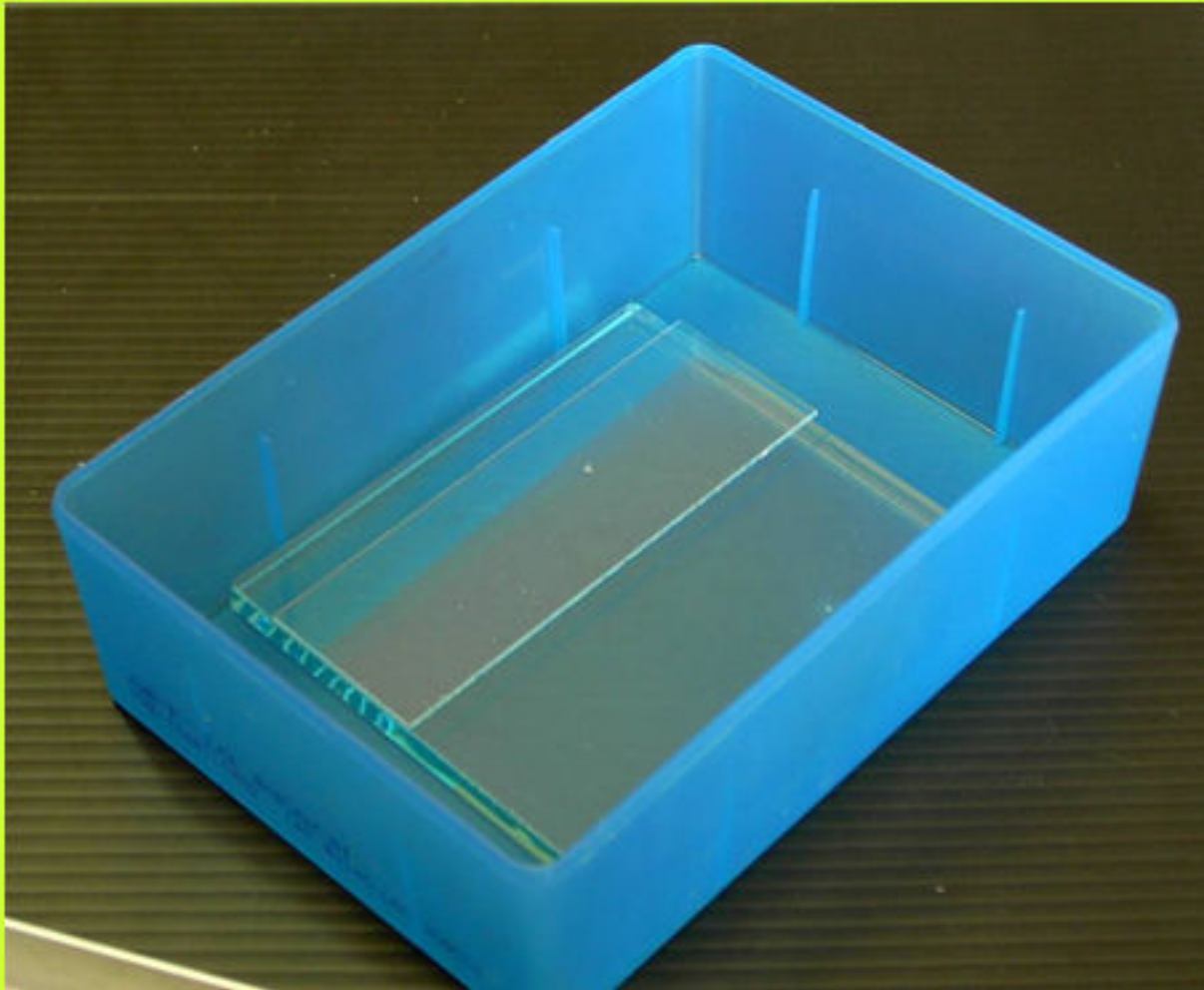
E' costituita da:

- una lastrina di vetro come supporto per il gel
- Una barretta di sostegno per il pettine
- Una molletta per fogli
- Un pettine autoprodotta
- Una scatoletta o la stessa vaschetta in cui si farà l'elettroforesi
- Del nastro adesivo di carta
- Un vetrino o un cartoncino di circa 1 mm di spessore





# Preparazione del pettine

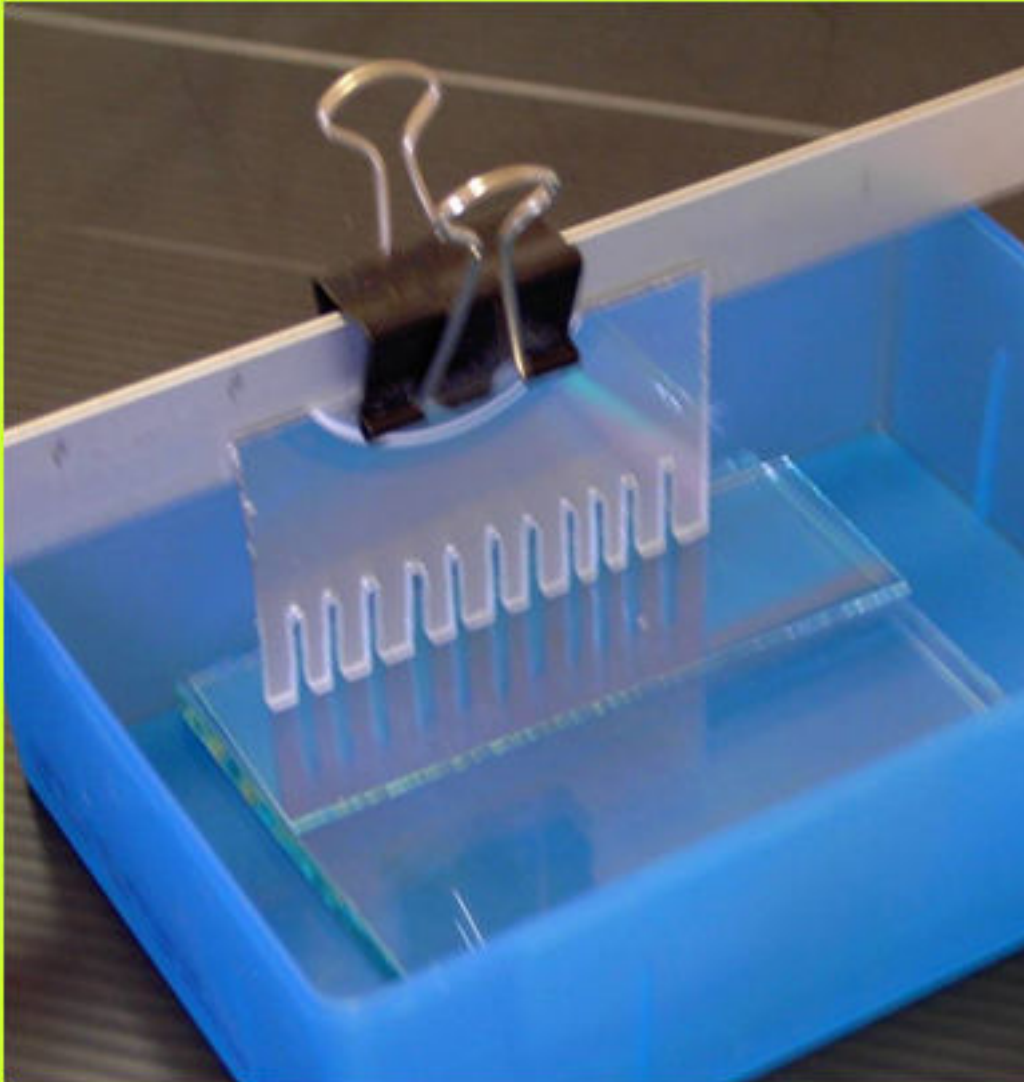


Inserire la lastrina di vetro su fondo della scatola, avendo cura che sia bene in piano.

Appoggiare lo spessore da 1 mm sopra la lastrina di vetro.



# Regolazione del pettine



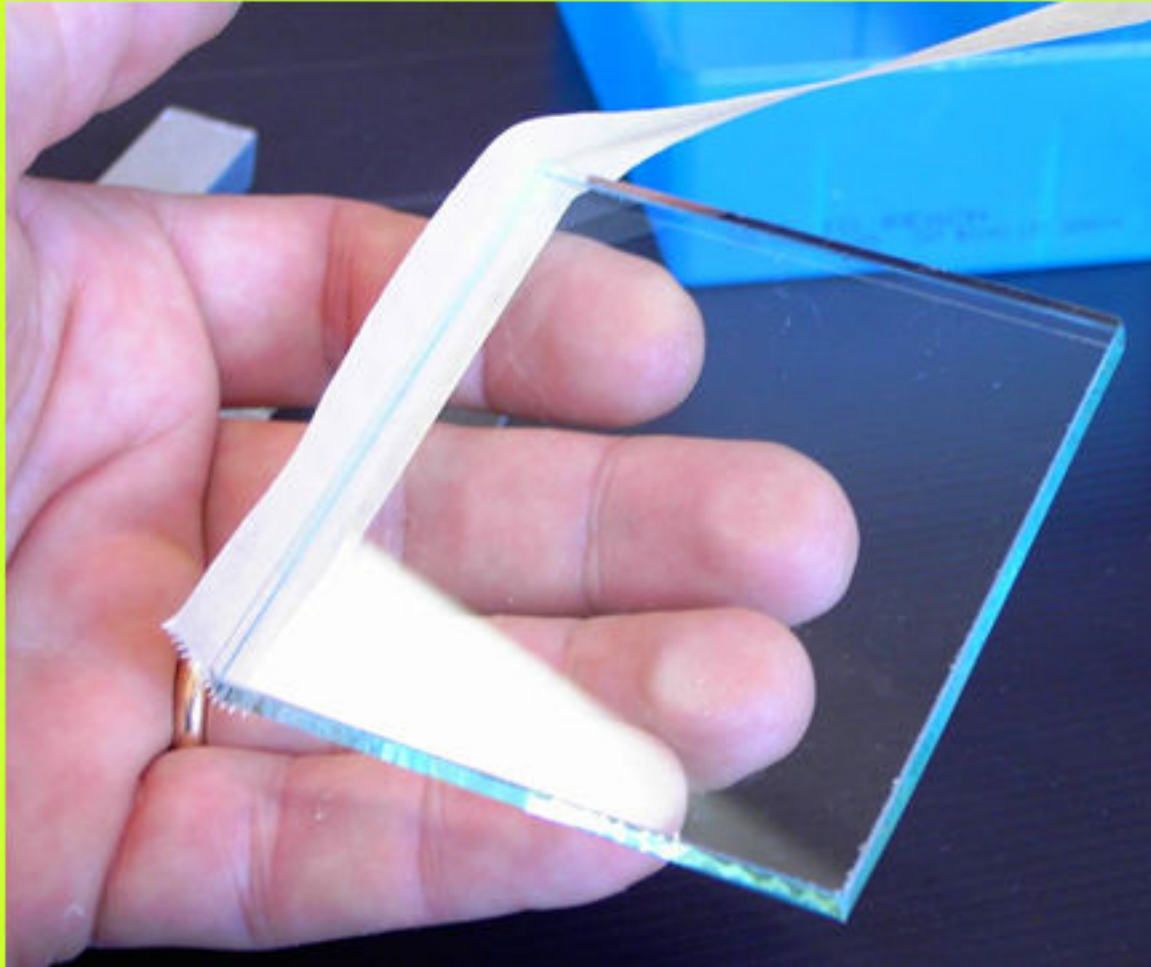
Fissare il pettine alla barretta di supporto con la molletta fermafogli.

Appoggiando la barretta sui bordi della scatola allentare la molletta e fare appoggiare i denti del pettine sullo spessore.

Bloccare il pettine in questa posizione e toglierlo dalla scatola.



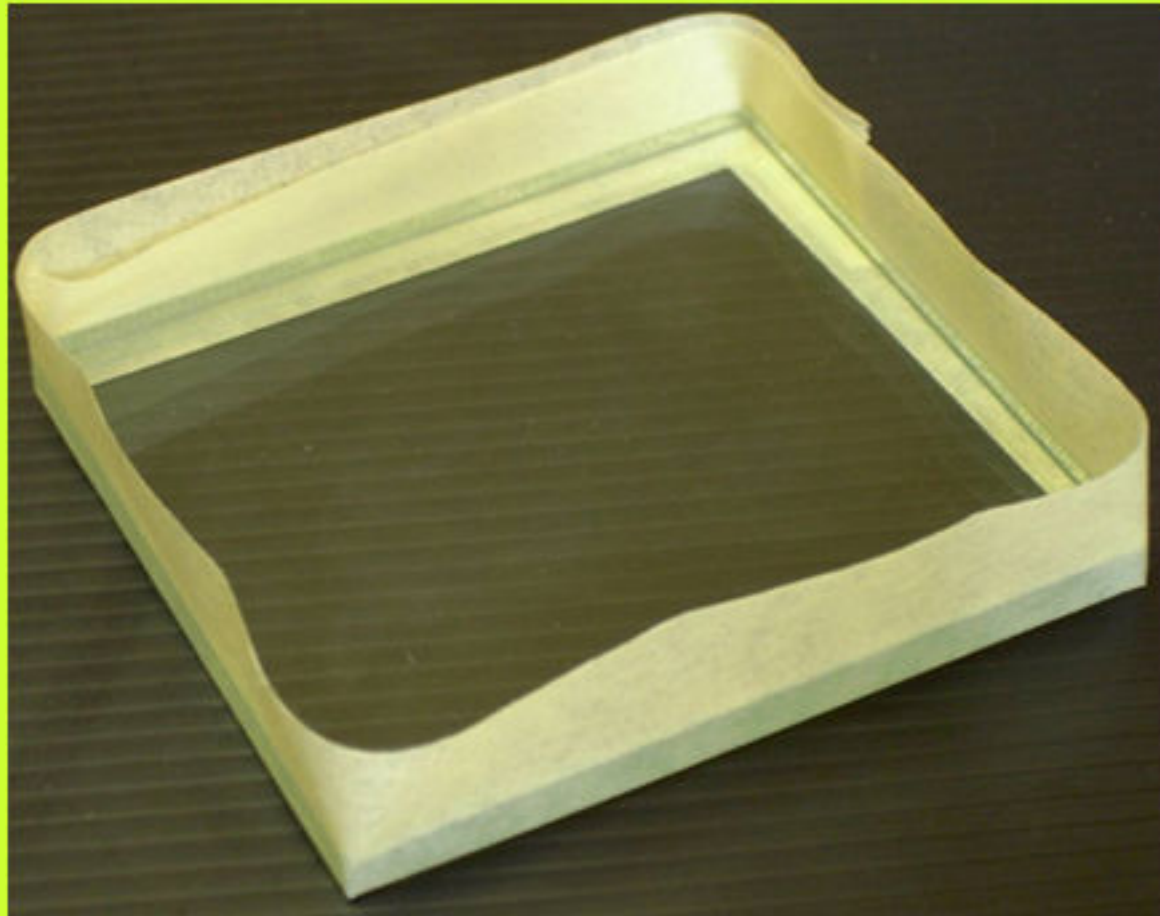
# Preparazione del supporto



Estrarre il supporto di vetro dalla scatoletta e circondarne il profilo con il nastro adesivo, avendo cura di posizionarlo bene aderente al profilo e rivoltandone qualche millimetro anche sulla faccia inferiore del vetro.



# Supporto per il gel

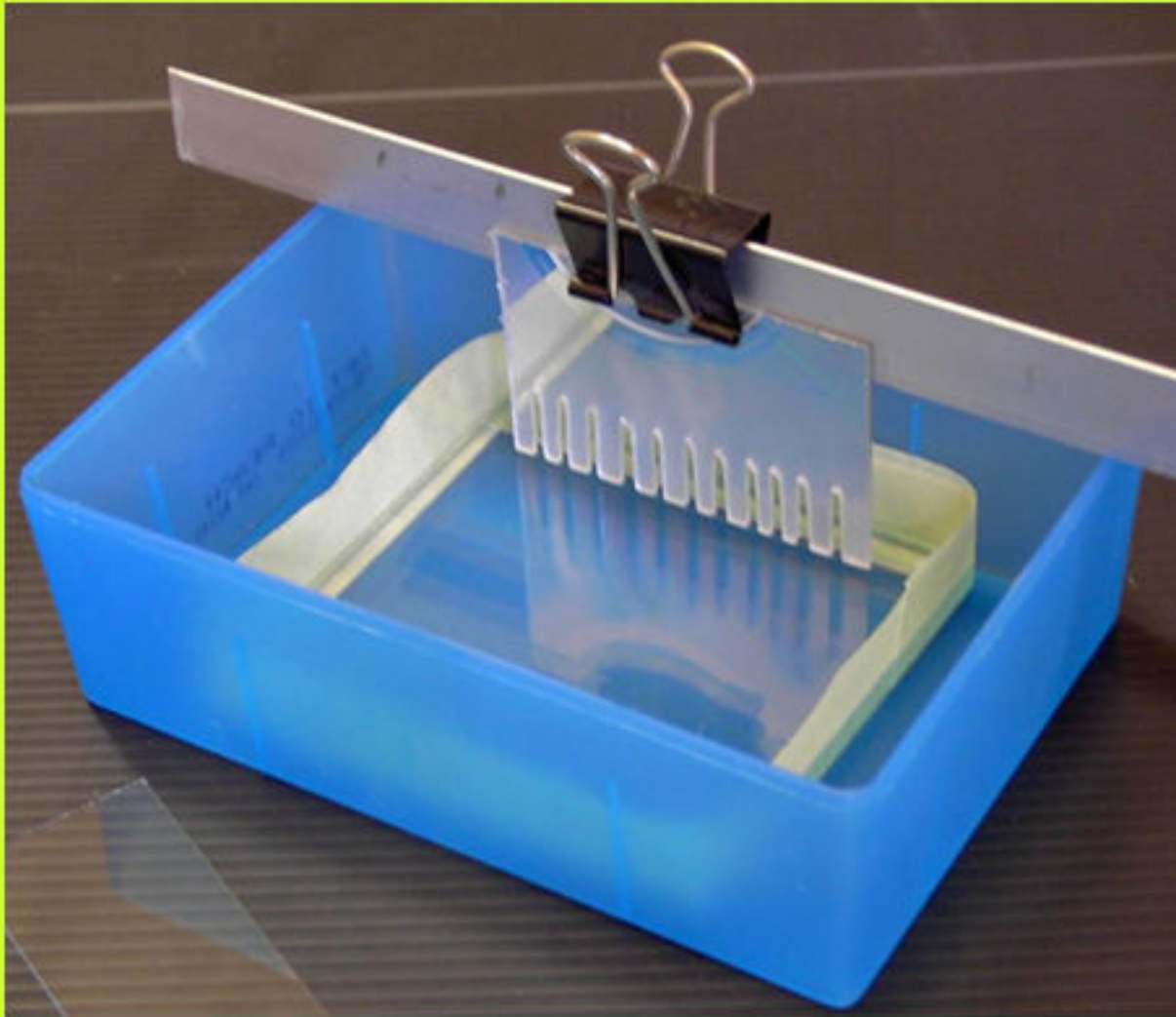


In questo modo si ottiene il vassoio per colare il gel, che andrà riposto nuovamente dentro la vaschetta





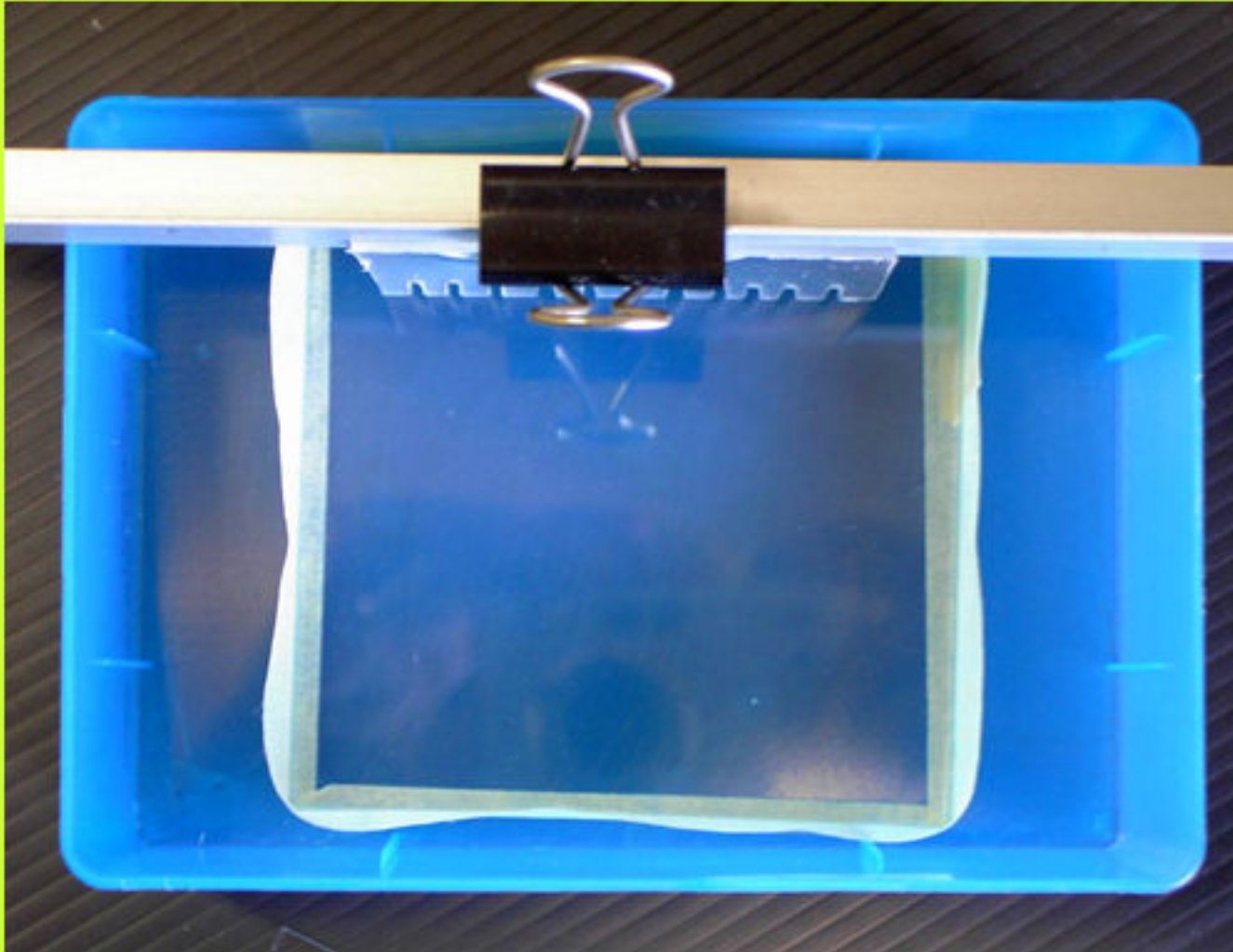
# Posizionamento del pettine



Si riposiziona quindi sulla vaschetta la barretta con il pettine precedentemente fissato in modo da risultare sollevato di circa 1 mm dal vetro.



# Posizionamento del pettine



Si centra la posizione del pettine a circa 1 cm dal lato superiore e parallelo ad esso



# Preparazione del gel



Preparare un recipiente graduato, il tampone TAE 1X, e l'agarosio.

Il quantitativo di gel da preparare è quello necessario per uno spessore di 5 mm, per cui si moltiplicano le dimensioni del vassoietto (in centimetri) tra di loro e quindi per 0,5, cioè

*Volume in ml\* = cm Altezza x cm larghezza x 0,5 cm*

Nel nostro caso

$10 \times 8 \times 0,5 = 40 \text{ ml}$

\* (= cc o  $\text{cm}^3$  o g di  $\text{H}_2\text{O}$ )





# Preparazione del gel



Si versa il quantitativo di Tampone TAE 10x nel flacone graduato.  
Si pesa quindi un quantitativo di polvere di agarosio adatto per un gel allo 0,7-0,8%.

$$\underline{0,8 \times 40 \text{ ml} = 0,32 \text{ g}}$$







# Calcolo della quantità di agarosio

Una volta verificata la densità della polvere di agarosio si può semplicemente prelevarne un volume fisso invece che pesarla (nel nostro caso usiamo come dosatore una provettina da 0,5 cc)  
Si aggiunge la polvere di agarosio al tampone





# Forno a microonde



L'agarosio non è solubile in acqua a temperatura ambiente ma per solvatarsi deve essere riscaldato.  
Lo strumento migliore a questo scopo è il forno a microonde





# Riscaldamento del gel



Si porta ad ebollizione con impulsi intervallati il liquido agitando con un movimento rotatorio il flacone tra un riscaldamento e l'altro.

Il tappo rimane leggermente svitato, ma si deve fare attenzione che il liquido non fuoriesca durante il riscaldamento

Si termina il riscaldamento quando non è più visibile alcun frammento di agarosio

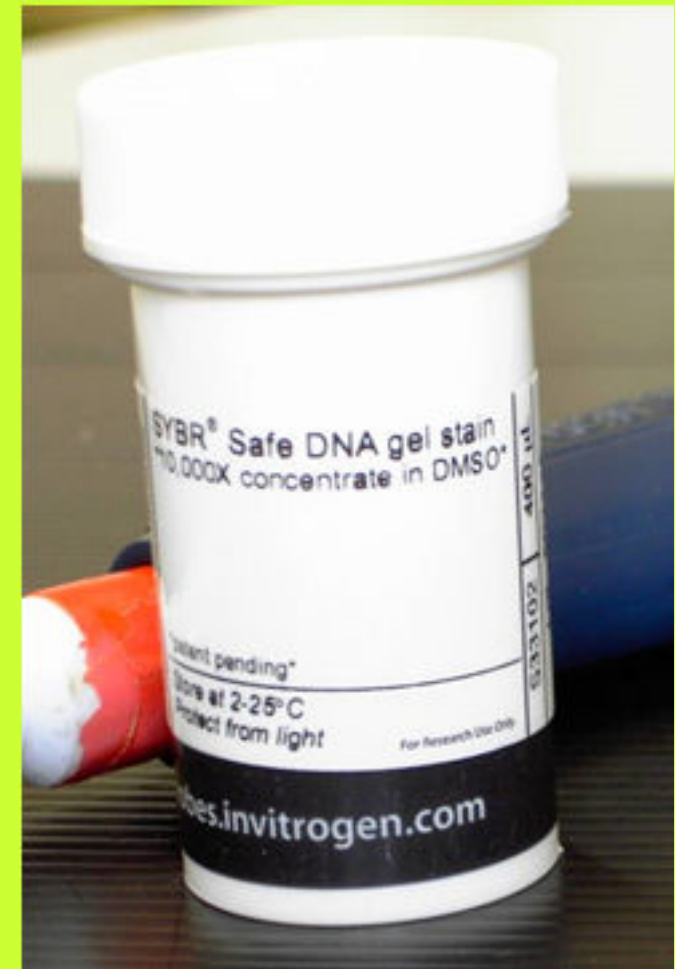
Si lascia raffreddare a temperatura ambiente o in acqua a 50° fino a che non si riesce a sopportare il calore del flacone appoggiato alla guancia (circa 45-50°)



# SYBR Safe

Una volta tiepida, si aggiunge alla soluzione il colorante per il DNA. Nel nostro caso usiamo il SYBR Safe per ragioni di sicurezza.

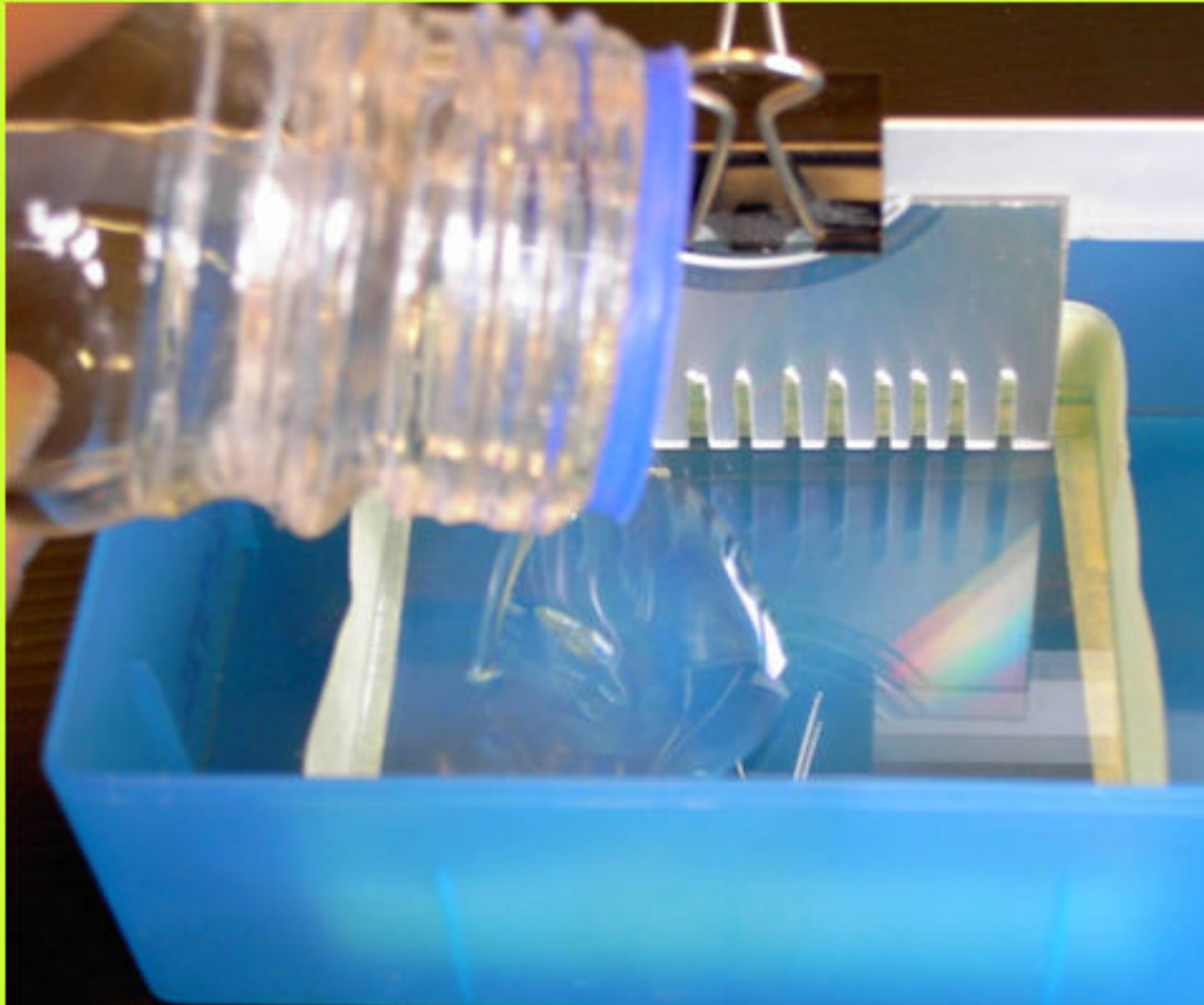
Aggiungiamo un microlitro di colorante ogni 10 ml di gel, per cui 4 $\mu$ l







# Versamento del Gel



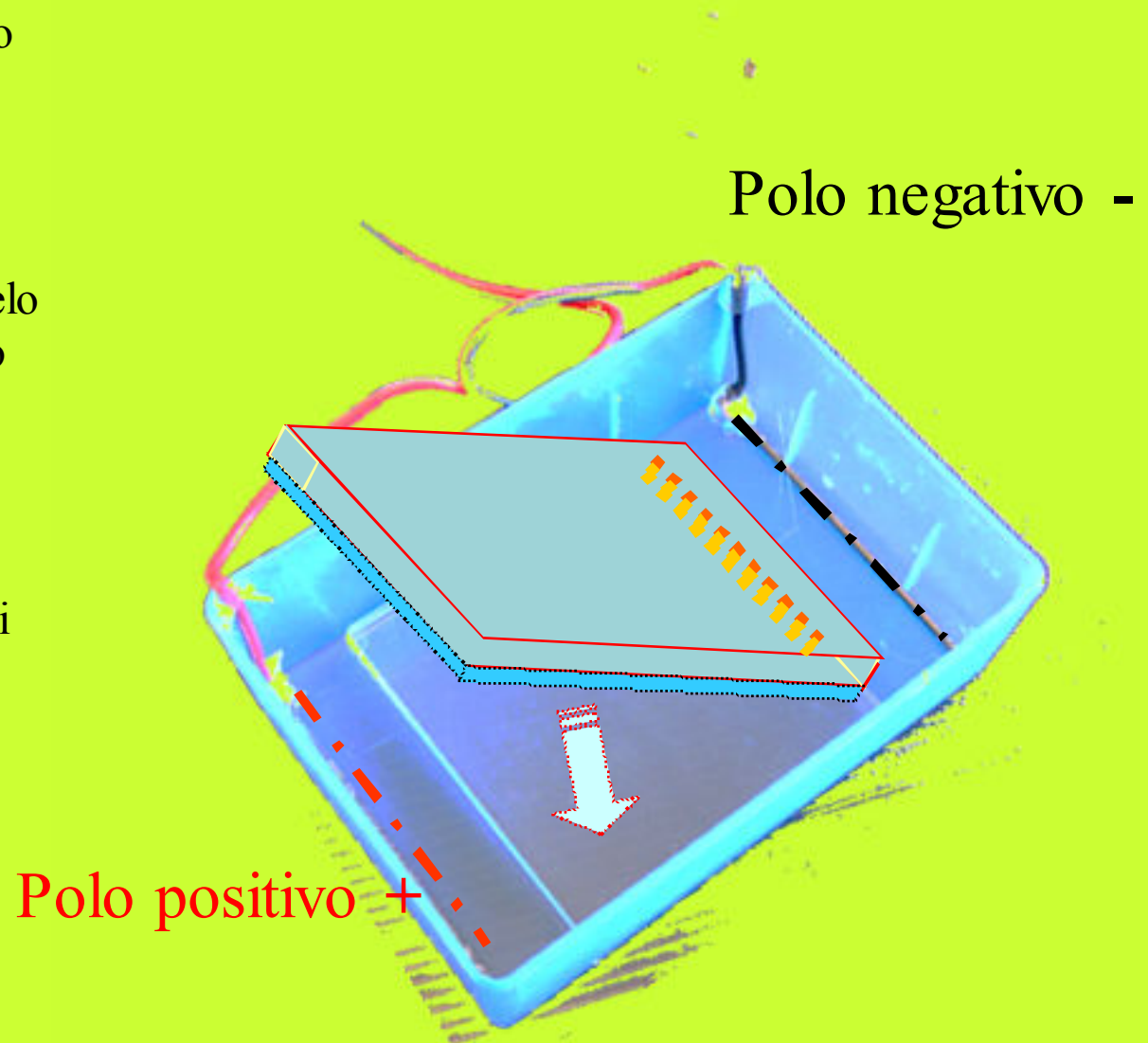
Si procede a versare il liquido tiepido nel vassoietto con un movimento continuo ed evitando di trasferire eventuali bolle d'aria nel vassoio.

Si attende che il gel si solidifichi completamente a temperatura ambiente (circa 1 ora).



# Elettroforesi in gel di Agarosio

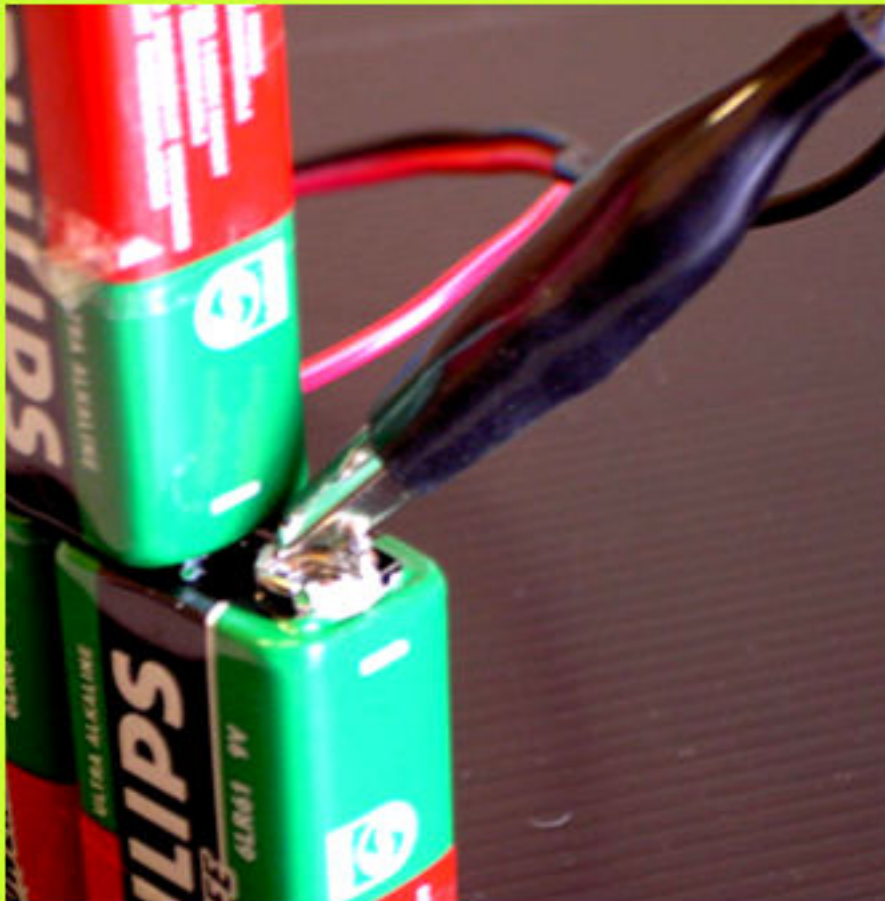
Rimosso delicatamente il pettine e tutto lo scotch, si riposiziona il gel nella vaschetta appoggiando il vetro di supporto sopra al vetro già presente all'interno della vaschetta. Il lato del gel con i pozzetti sarà parallelo ed adiacente all'elettrodo negativo (filo nero). Si versa il tampone di corsa all'interno della vaschetta fino a sommergere completamente il gel e i pozzetti. Si procede al caricamento dei campioni all'interno dei pozzetti, dopo averli addizionati con il Gel loading buffer.





# Collegamento all'alimentazione

Si collegano le estremità opposte del cavo alla batteria utilizzando dei morsetti a pinza oppure, più semplicemente, delle graffette da carta.



E' importante prestare attenzione alla polarità del collegamento (Positivo= rosso).

Si procede alla corsa per 45' - 60' prima di verificare la separazione dei campioni.







# Illuminatore per SYBR Safe

Al termine della corsa si può osservare il gel.

Il *SYBR Safe* (come anche il *Gel Green*) è un colorante fluorescente che si eccita con i raggi UV, ma presenta fluorescenza anche se eccitato alla luce blu (attorno ai 480 nm). Questa lunghezza d'onda è quella emessa dai led a luce blu, che possono costituire un efficace ed economico sistema di visualizzazione del gel. La visibilità migliora se il gel viene osservato o fotografato attraverso un filtro arancio o rosso

