

Elettroforesi di DNA

a cura di E. Scortecci e V. Soglio

Preparare una corsa elettroforetica e analizzarne il risultato è una procedura usata quotidianamente nei laboratori di biologia molecolare per separare frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. In questo protocollo è descritto come realizzare questa esperienza anche nei laboratori di scuole secondarie di secondo grado. Grazie a questa attività, gli studenti possono sperimentare direttamente che le molecole di DNA hanno una carica negativa, infatti esse si muovono verso il polo positivo quando sono poste in un campo elettrico. Inoltre è possibile osservare come il gel di agarosio funzioni da setaccio molecolare consentendo di separare i frammenti di DNA in base al loro peso molecolare e quindi alla loro lunghezza.

Obiettivo

Preparare un gel di agarosio e realizzare l'elettroforesi di campioni di DNA.

Procedimento

1. Pesare 1 g di agarosio e aggiungerlo a 100 ml di una soluzione tampone TAE 1X.
2. Scaldare usando un forno a microonde o una piastra elettrica fino a quando la soluzione diventa limpida.
3. Versare la soluzione nella vaschetta di plastica che diventerà la cella elettroforetica.
4. Inserire il pettine.
5. Lasciare raffreddare in frigorifero per 10 minuti fino a solidificazione del gel.
6. Aggiungere la soluzione tampone TAE 1X fino a ricoprire il gel.
7. Togliere il pettine facendo attenzione a non danneggiare i pozzetti che si sono formati in corrispondenza dei denti.
8. Aggiungere la soluzione di caricamento a ciascun campione di DNA (vedi protocollo 'La soluzione di caricamento').
9. Aggiungere la soluzione di caricamento anche al marcatore di peso molecolare e trasferirlo nel primo pozzetto del gel usando una micropipetta o una siringa da insulina. Il marcatore di peso molecolare è formato da una miscela di frammenti di DNA di cui si conosce la lunghezza in paia di basi e il peso molecolare.
10. Trasferire con una micropipetta o una siringa da insulina ciascun campione da esaminare in un pozzetto diverso.
11. Assemblare la cella elettroforetica come descritto nel protocollo 'Una cella elettroforetica fatta a scuola'.
12. Mantenere il collegamento con il generatore di corrente per almeno mezz'ora.
13. Interrompere il collegamento della cella con il generatore di corrente.
14. Trasferire il gel in una vaschetta vuota e procedere con la colorazione secondo il protocollo 'Colorazione del gel d'agarosio'.



Tempo previsto

2 ore

Materiali e Reagenti

- ✓ Vaschetta rettangolare (8x5 cm, profonda 2-3 cm)
- ✓ Foglio di plastica rigido e spesso per il pettine
- ✓ Becher
- ✓ Micropipetta o siringa da insulina
- ✓ Agarosio
- ✓ Soluzione tampone TAE 1X
- ✓ Soluzione di caricamento
- ✓ Campione di DNA
- ✓ Marcatore di peso molecolare

Strumentazione

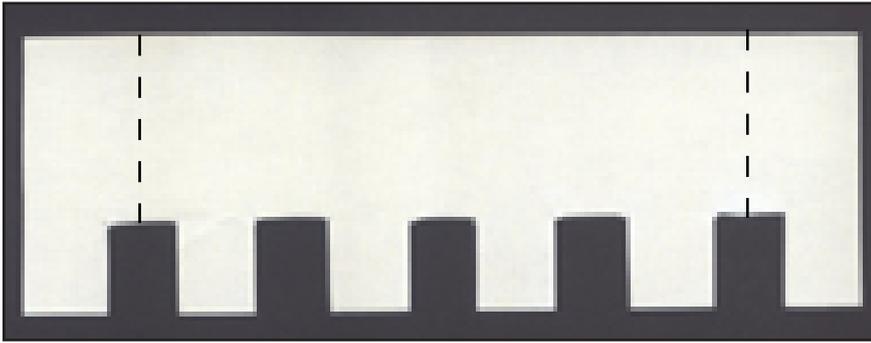
- ✓ Bilancia
- ✓ Forno a microonde o piastra riscaldante
- ✓ Cella elettroforetica

Per la preparazione della soluzione tampone TAE 1X

Per 1 litro di soluzione tampone TAE 10X:

48,4 g di Tris-base
11 ml di Acido Acetico Glaciale
20 ml di 0,5 M Na₂EDTA (pH 8)
portare a volume con acqua distillata.

Diluire 1:10 per ottenere una soluzione tampone TAE 1X (10 ml di soluzione TAE 10X e 90 ml di acqua distillata)



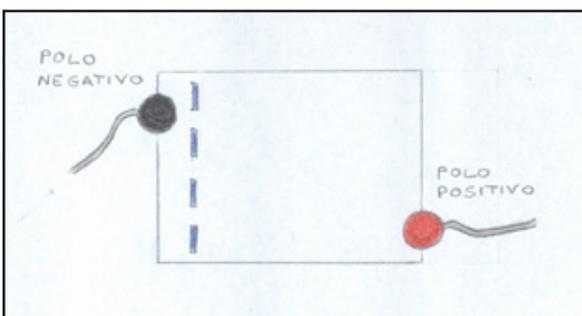
Modello per ritagliare il pettine da un foglio di plastica spesso e rigido; i denti devono essere larghi 10 mm, lunghi un po' meno della profondità della vaschetta e distanziati tra loro 10 mm. Le linee tratteggiate indicano la larghezza della vaschetta. Con questo pettine si ottengono 4 pozzetti.



A fianco l'immagine di come appare una vaschetta allestita, si noti che il pettine si trova a cavallo dei bordi della vaschetta.

Osservazioni

- Quale campione di DNA usare? Per esempio, il prodotto di PCR ottenuto con il protocollo 'Realizzare una PCR senza termociclatore', oppure parte degli acidi nucleici estratti da campioni vegetali come da protocollo 'Estrazione di acidi nucleici da vegetali'.
- Poichè le molecole di DNA hanno carica negativa, i pozzetti in cui si caricano i campioni devono essere vicini al polo negativo (vedi disegno sotto).
- La differenza di potenziale tra gli elettrodi induce le molecole di DNA, cariche negativamente, a migrare verso il polo positivo. Grazie alle maglie del gel d'agarosio, i campioni si separano in base alle loro dimensioni e quindi al loro peso molecolare.



Il disegno a fianco mostra come i pozzetti in cui sono stati caricati i campioni di DNA (in blu) siano vicini al polo negativo (morsetto nero).