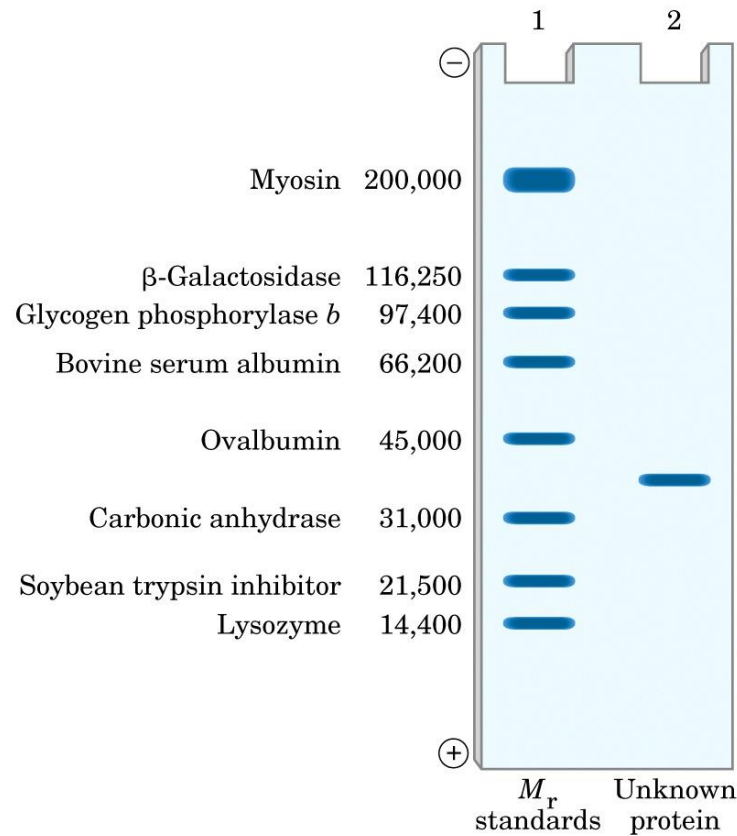


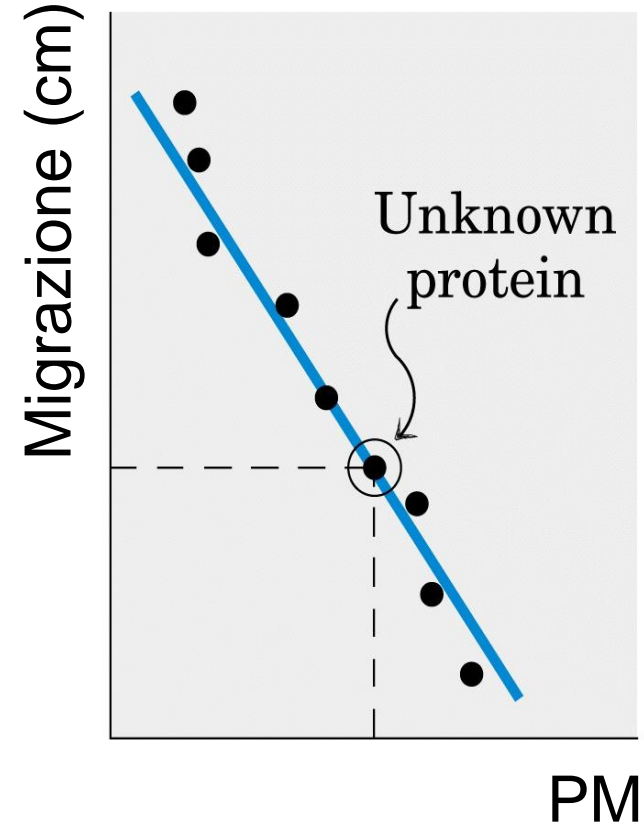
SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

$$Y = 35 \text{ cm}$$

$$X = \text{[purple box]}$$



$$Y = -1.3 X + 89.1$$

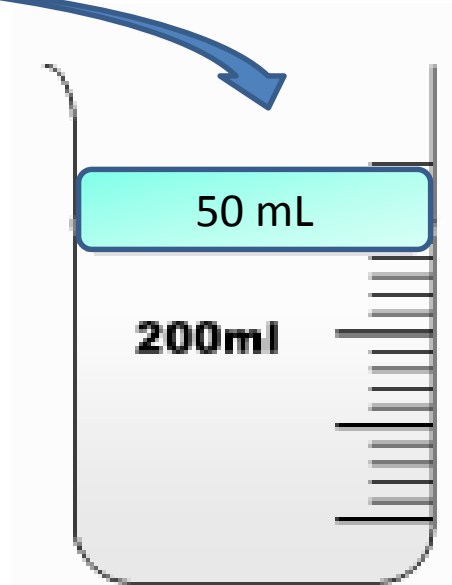
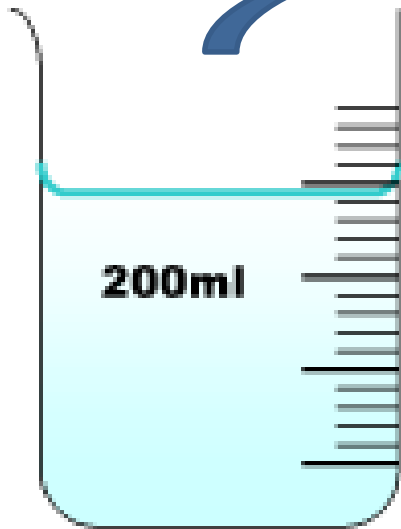


DILUIZIONI

Soluzione A

50 mL

Soluzione B



Concentrazione
iniziale (C_i o C_1) = 100 mM

Concentrazione
finale (C_f o C_2)?

Quanto sono V_1 e V_2 ?

Conti di laboratorio più frequenti

Molarità (M) = n° moli soluto/Litro di soluzione
n° moli = massa/PM

% p/p: 10% p/p di KCl

10 g di soluto in 100 g di soluzione, ovvero 10 g di KCl + 90 g di solvente (es. H₂O).

% p/V: 10% p/V di KCl

10 g di soluto in 100 mL di soluzione, cioè 10 g di sale portati a volume sino a 100 mL, con H₂O

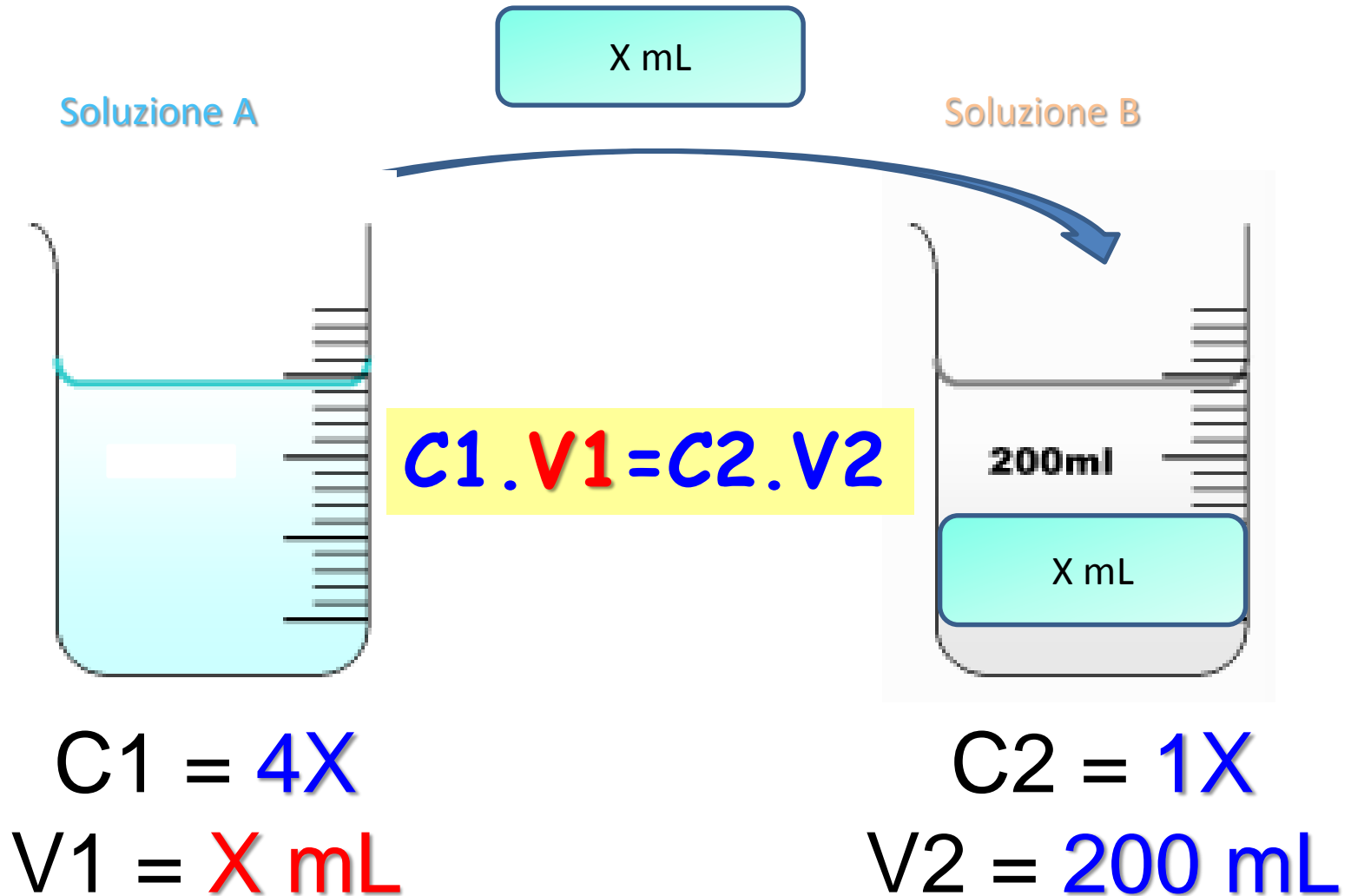
% p/V = % p/p . d (densità)

d = Massa/Volume

DILUIZIONI :

$$C1.V1 = C2.V2$$

DILUIZIONI



Condizioni sperimentali

GEL di PAA 8% (15 mL)

TBE 5X	→ 1X
Acril/bisAcril 40%	→ 8%
APS	→ 0.66%
TEMED 10 μ M	→ 10 nM
H ₂ O	



15 mL

m → μ → n

Condizioni sperimentali

PAA: 8% (15 mL)


Campione: 10 μL + 1 μL coloranti

TBE 5X	→ 1X	3.00 mL
Acril/bisAcril 40%	→ 8%	3.00 mL
APS	→ 0.66%	100 μL
TEMED	→ 0.066%	10 μL
H ₂ O		8.89 mL
		<hr/>
		15 mL

Colorazione

100 mL di TBE e 5 μL di Bromuro di Etidio a T amb.

PROTOCOLLO DI PCR

	Concentrazioni finali	Volumi (μ l)
DNA (100 ng/uL)	4 ng/ μ L	
Buffer (10 x)	1 x	
dNTPs (2 mM)	0.2 mM	
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mM	
DMSO	4 %	
Primer F (6.8 Pmol/uL)	0.272 Pmol/uL	
Primer R (6.8 Pmol/uL)	0.272 Pmol/uL	
Enzima (5 U/ μ L)	0.5 U/camp.	
H ₂ O		

50 ul

95° C	5'	} 30 cicli
95° C	30"	
67° C	30"	
72° C	30"	
72° C	10'	

Esercizi sulle diluizioni

Detergente Tween 20

2,0 mM

100 mL

Ne prelevate 5 μ L e li miscelate a 45 μ L di H₂O bidistillata.

Qual'è la concentrazione finale?

$$C1 \quad V1 \quad = \quad C2 \quad V2$$

X =

Esercizi sulle diluizioni

Si è smarrita la concentrazione di un reagente, l'SDS.

Avete 50 mL di una soluzione di SDS allo 0,1% e sapete che era stata ottenuta miscelandone 2 mL di madre con 48 mL di H₂O.

Quanto era concentrata la madre?

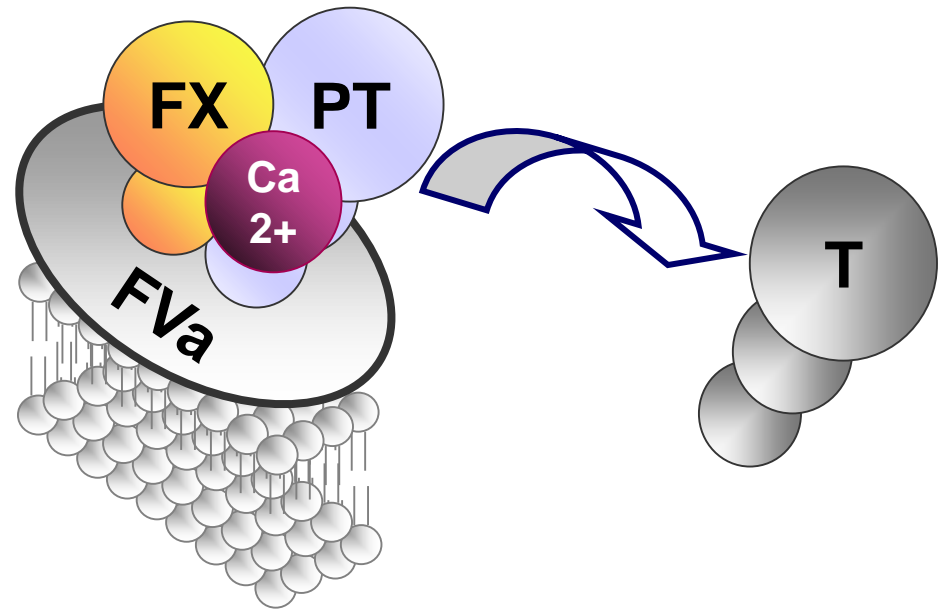
$$C1 \quad V1 \quad = \quad C2 \quad V2$$

X

PCR

	Concentrazioni finali	Volumi (μ l)
DNA (100 ng/ μ L)	5 ng/ μ L
Buffer (5 x)	1 x
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 mM
DMSO	5 %
Primer F (7 Pmol/ μ L)	0.35 Pmol/ μ L
Primer R (7 Pmol/ μ L)	0.35 Pmol/ μ L
Enzima (5 U/ μ L)	0.5 U/campione
H ₂ O	
		<hr/>
		50 μl

Saggio funzionale



C1

FX = 800 nM (soluzione madre)

FVa = 200 μ M (madre)

PT = 1 μ M (madre)

Ca²⁺ = 1 M (madre)

Incubazione a 37°C 10', aggiunta substrato fluorogenico (SFT)

SFT = 10 mM (madre)

C2

10 pM

10 pM

250 nM

5 mM

V1

250 nM

V2 = 100 μ L

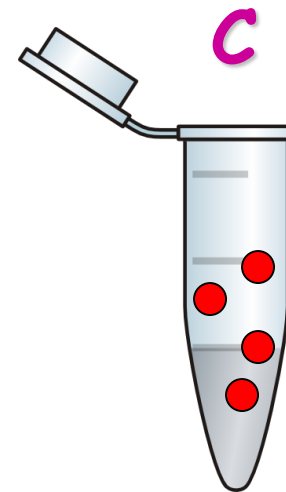
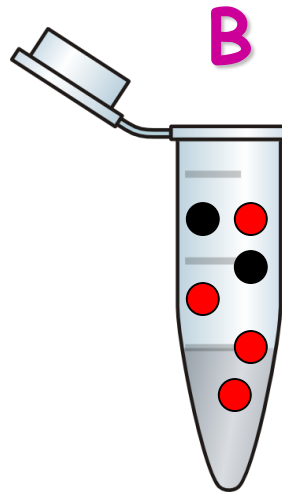
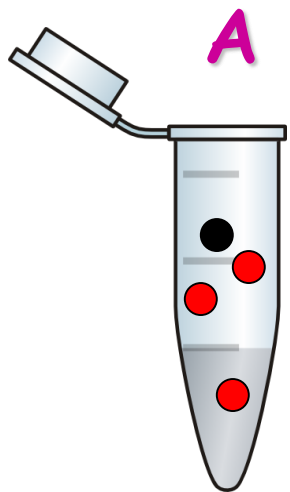
Unità enzimatica

Per polimerasi

La quantità di enzima che incorpora 10 nmoli di dNTPs in un DNA in 30' a 74°C.

Per enzimi di restrizione

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



- E att.
- E inatt.

Restrizione enzimatica (Mlu I)

Normale 360 bp

Mutazione 290 bp 70 bp Crea un sito di restrizione

Eterozigote 360 bp 290 bp 70 bp

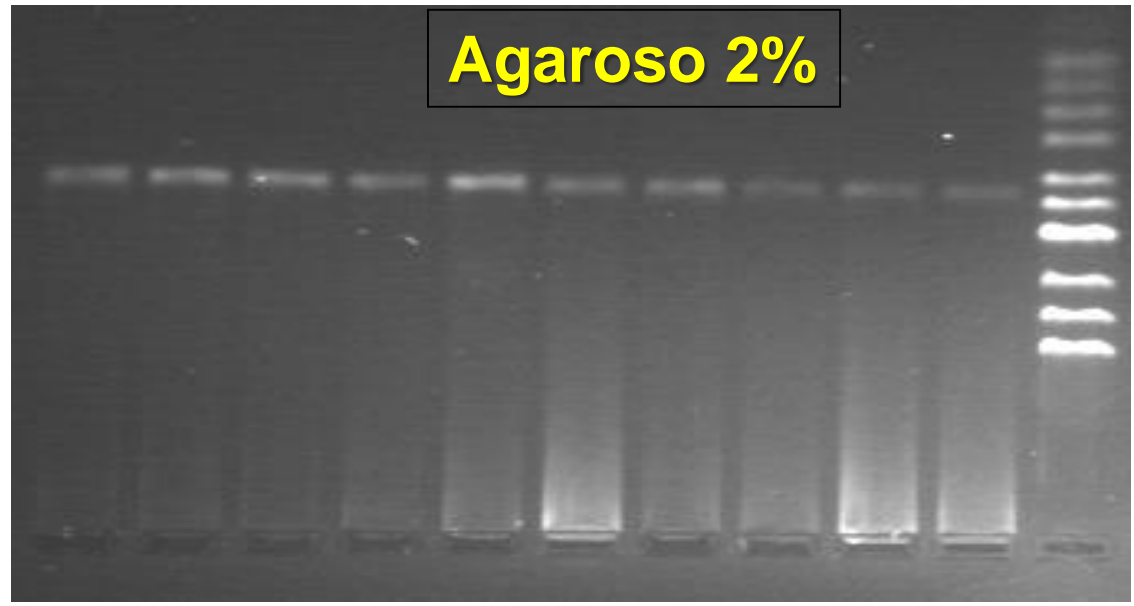
Indigerito 360 bp

PCR

A B C D E F G H I L Marker 8

Agaroso 2%

360 bp →



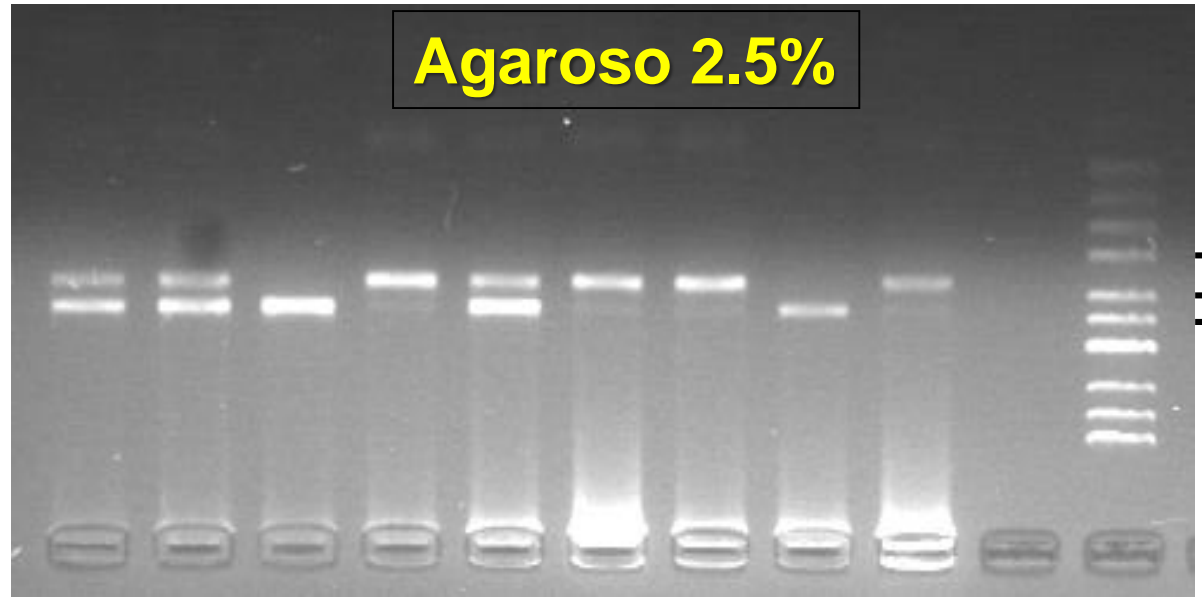
DIGESTIONE

A B C D E F G H I

Agaroso 2.5%

Mutazione →
Normale →

bp
— 242
— 331
— 404



Protocollo di digestione

Conc. iniziali Conc. finali Volumi

DNA 100 ng/mL
Buffer
BSA
Enzima 10 U/ μ l
H₂O

10 ng/mL
10%
1%
4 U/Campione

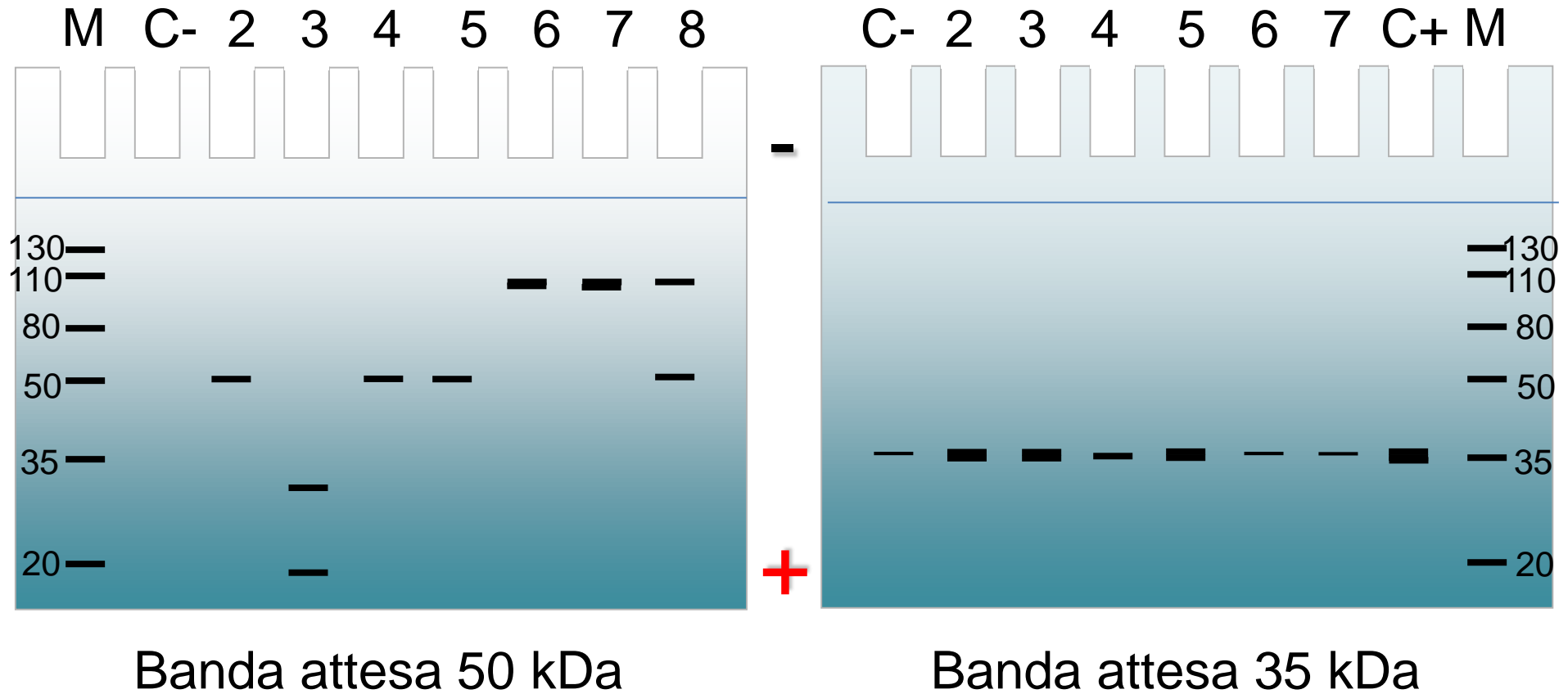
25 μ L

Tempo di digestione: X ore
Temperatura: X °C

DIGESTIONE ENZIMATICA

Conc. iniziali	Conc. finali	Volumi finali
DNA	2,0 ng/uL	1 uL
Buffer ?	10%
Enzima 15 U/ μ l	3 U/Campione
H ₂ O	
		<hr/>
		40 uL

ESERCIZIO DI WB



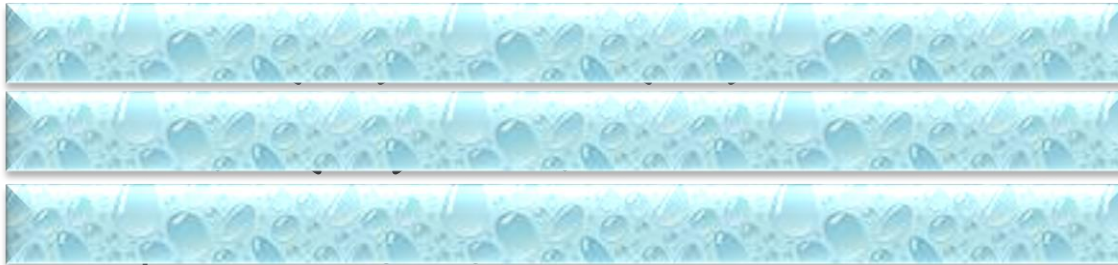
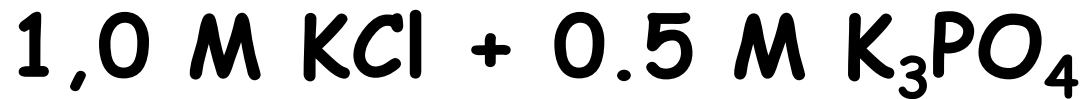
FORZA IONICA

$$\mu = \frac{1}{2} \sum cz^2$$

c = concentrazione specie ionica
z = carica dello ione

L'unità di misura di μ è la **molarità**.

Calcolo della forza ionica della soluzione:



GEL DI PAA

TBE 20X → 1X	<u>mL</u>
<u>Acril/bisAcril</u> 40% → 10%	<u>mL</u>
APS → 0.7%	<u>μL</u>
TEMED → 0.07%	<u>μL</u>
H ₂ O	<u>mL</u>
<hr/>		
	6	<u>mL</u>

REAZIONE DI PCR

Concentrazioni finali

Volumi (μ l)

DNA (200 ng/ μ L)

5 ng/ μ L

.....

Buffer (20 x)

1 x

.....

dNTPs (10 mM)

0.2 mM

.....

MgCl₂ (25 mM)

2.0 mM

.....

Primer F (5 Pmol/ μ L)

0.25 Pmol/ μ L

.....

Primer R (5 Pmol/ μ L)

0.25 Pmol/ μ L

.....

Enzima (5 U/ μ L)

0.25 U/25 μ L

.....

H₂O

.....

50 μ l