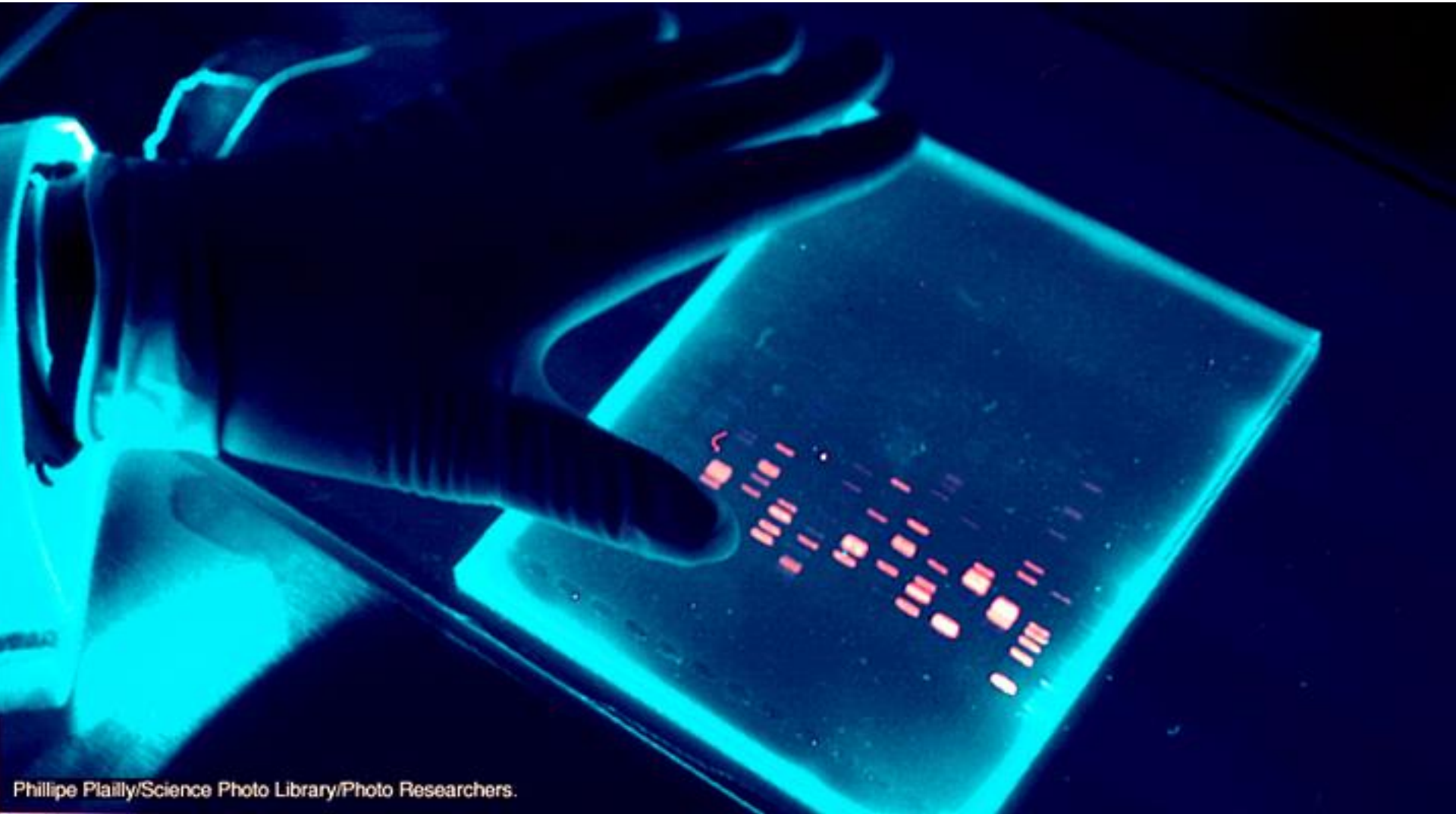


# ELETTROFORESI



Phillipe Plailly/Science Photo Library/Photo Researchers.

# ELETTROFORESI

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

Anioni → **ANODO (+)**



Cationi → **CATODO (-)**

$$\mu = v/E$$

$$v = E \cdot q/f$$

**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

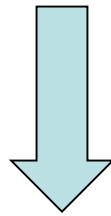
pori

molecola

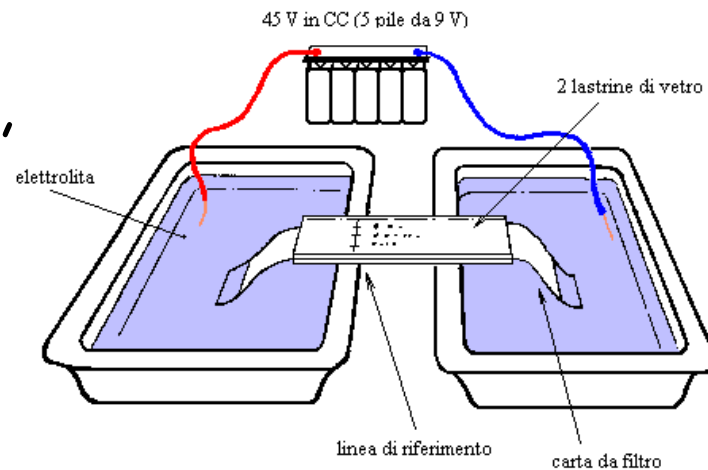
# PRIME ELETTROFORESI

In soluzione libera

*Diffusione convettive  
Corrente semplice*



Carta,  
Acetato di cellulosa,  
Silice,  
Allumina  
Agar-agar

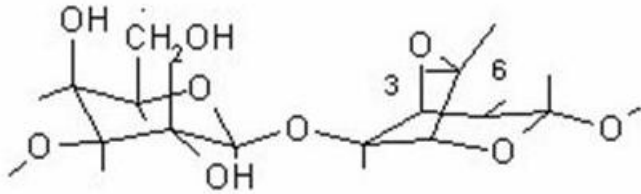


# GEL D'AGAROSIO

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



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



Legame O-glicosidico

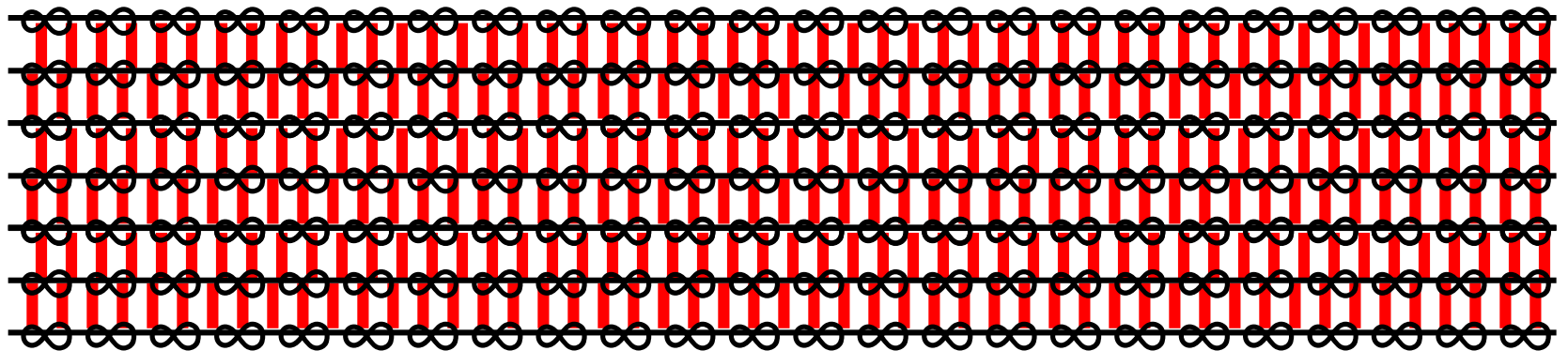
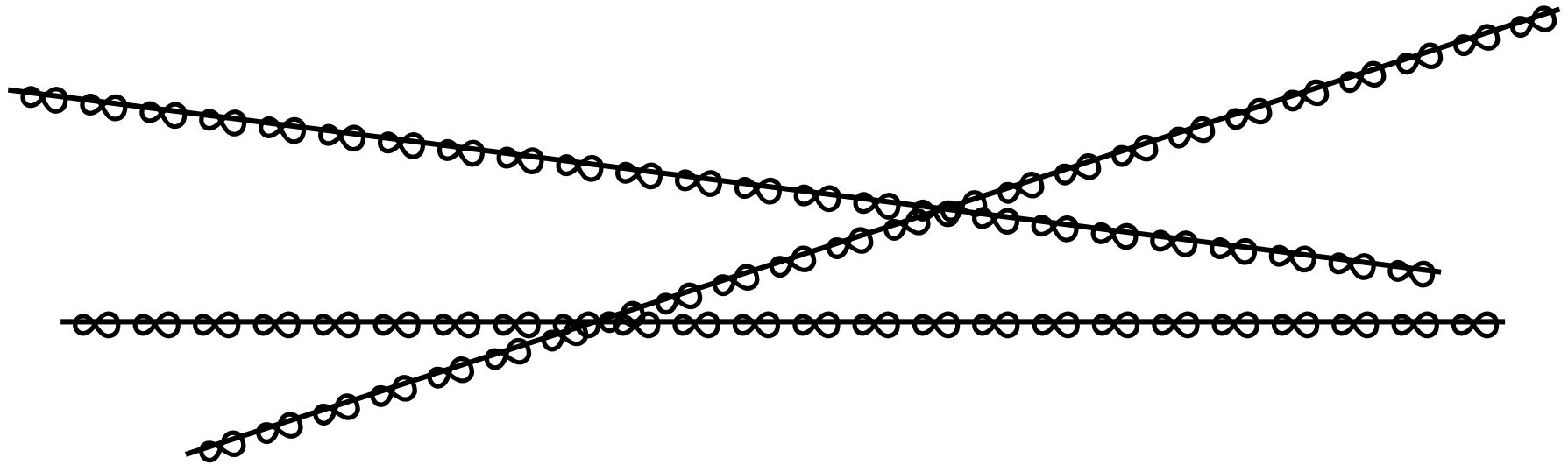


Maggiore è la [agarosio], più piccoli sono i pori nel gel.

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



# NATURA CHIMICA DEL GEL DI AGAROSO

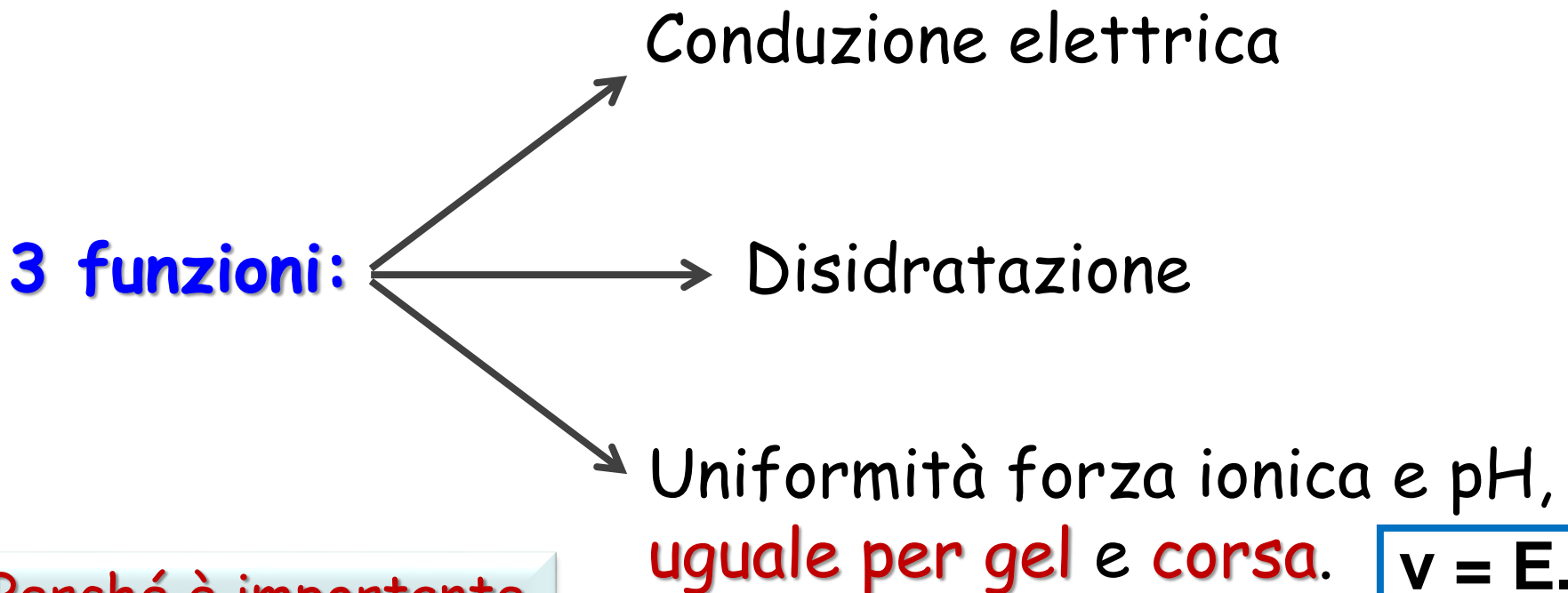


Fra i polimeri di agaroso si formano ponti H

# TAMPONE DEL GEL D'AGAROSIO

## Buffer TAE

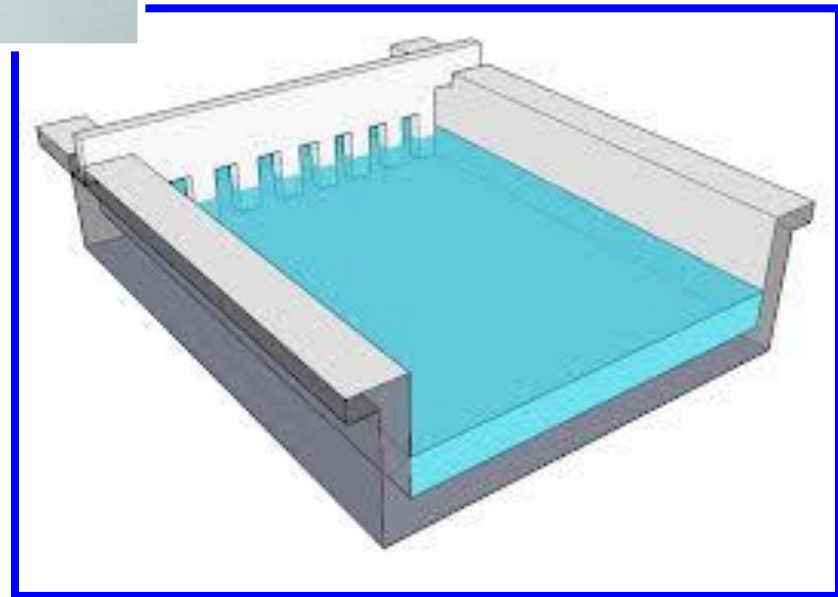
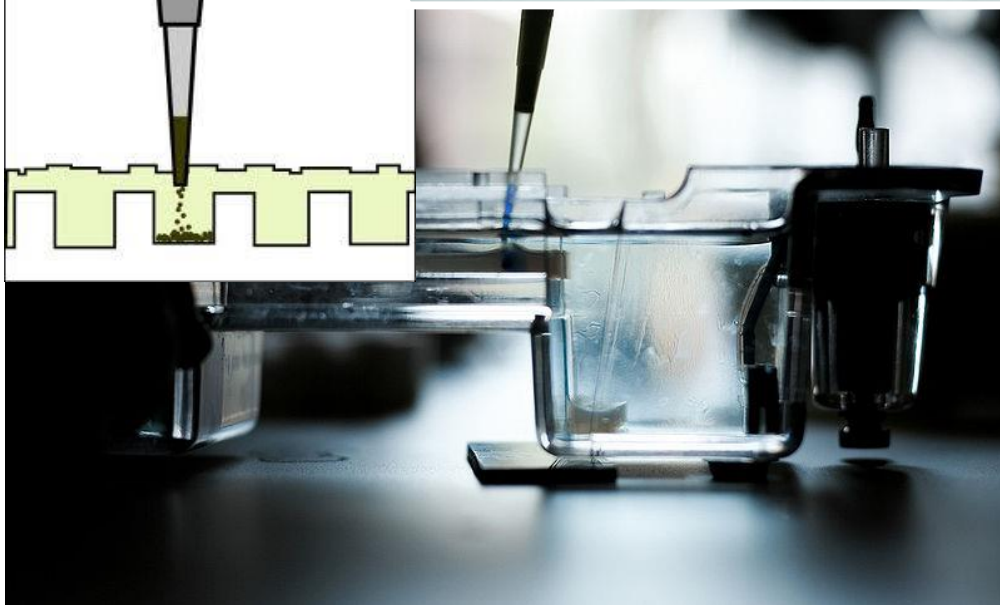
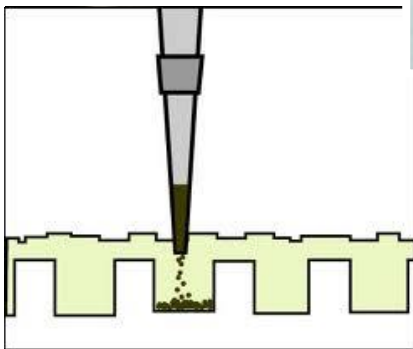
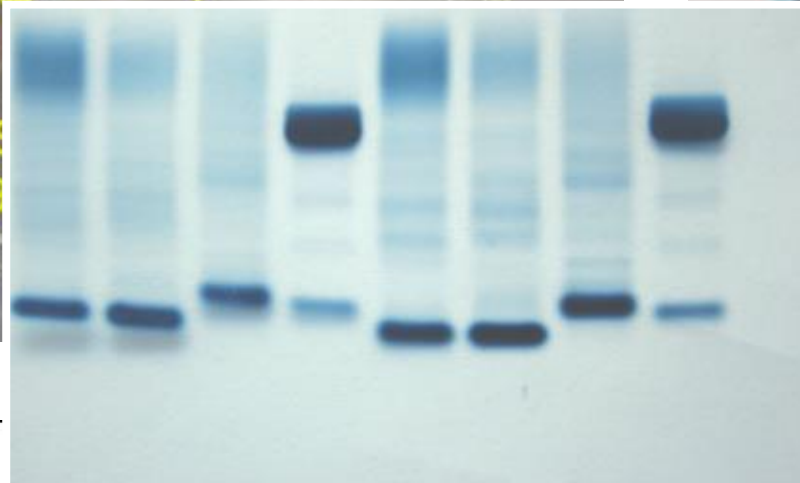
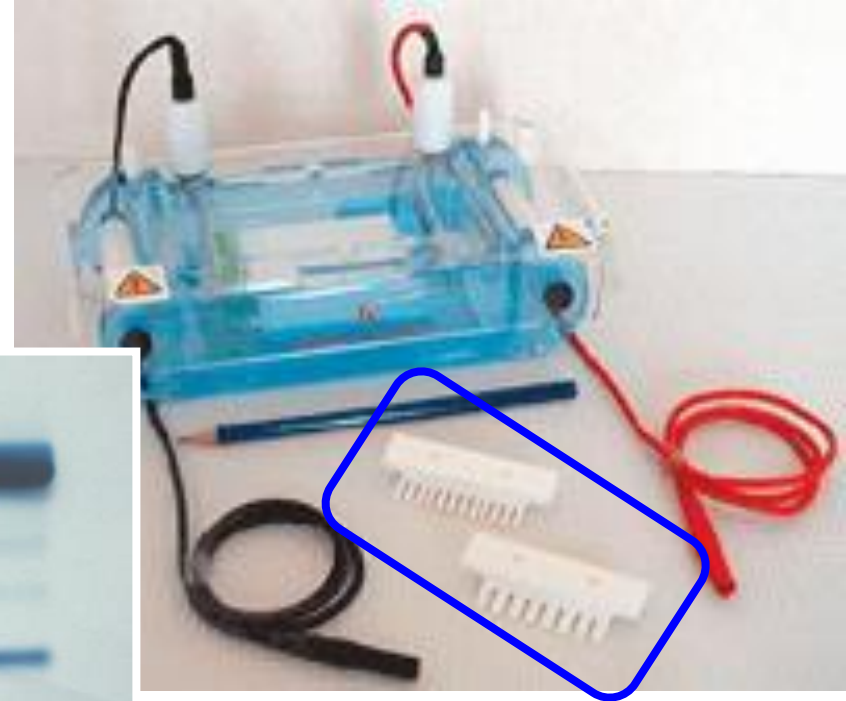
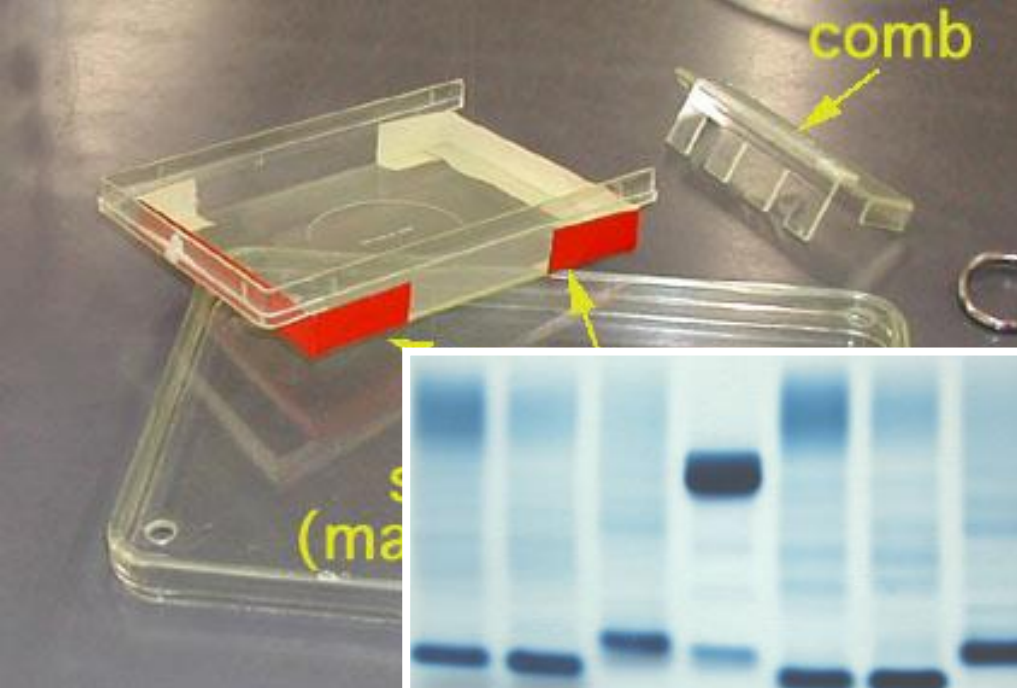
TRIS + Acido acetico glaciale + EDTA



Perché è importante la costanza del pH?

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





# VELOCITA' DI MIGRAZIONE

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

## 1) Dimensioni del DNA:

$$V = K / \text{Log}_{10}\text{bp}$$

parametro K varia al variare della [agarosio] nel gel.



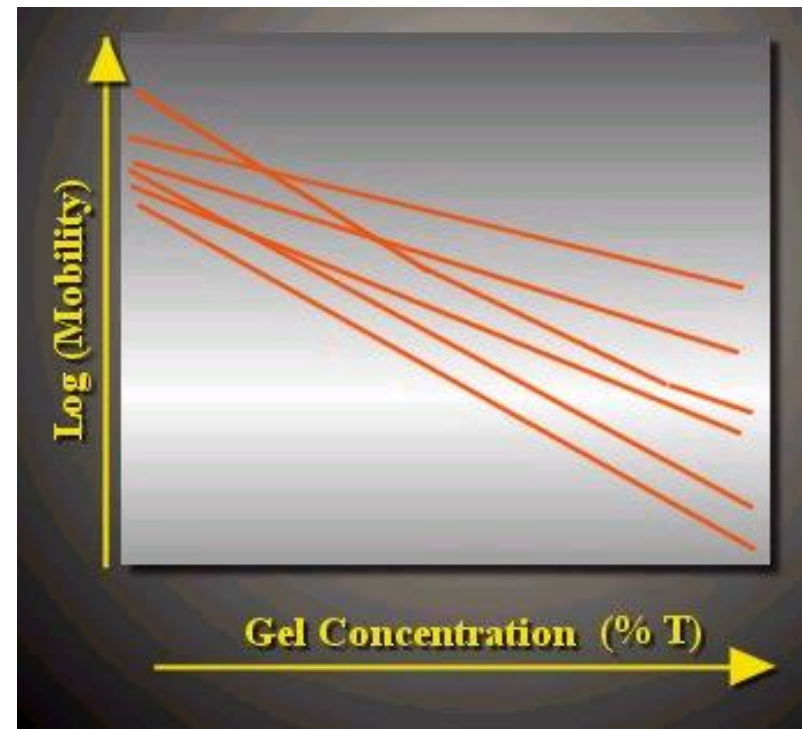
## 2) Concentrazione di agarosio del gel:

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

$\mu_0$  = mobilità libera del DNA

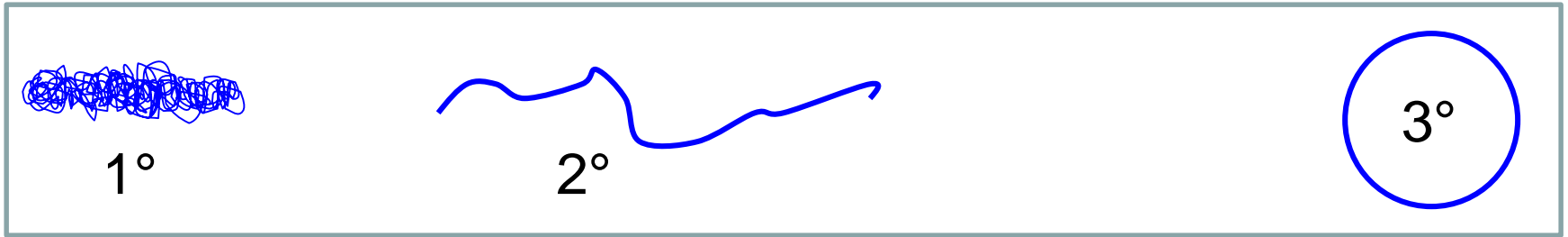
$K_R$  è il coefficiente di ritardo

Relazione lineare tra il logaritmo della mobilità elettroforetica ( $\mu$ ) e la concentrazione del gel ( $\dagger$ ).



### 3) Conformazione del DNA:

DNA superavvolto, circolare e lineare dello stesso peso molecolare migrano con velocità diverse



### 4) Composizione in basi e temperatura:

generalmente NON influenzano la migrazione

### 5) Voltaggio applicato:

Proporzionalità diretta a bassi voltaggi (5 V/cm)

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

# EFFETTO JOULE



$$C = i^2 R t$$



C = calore dissipato

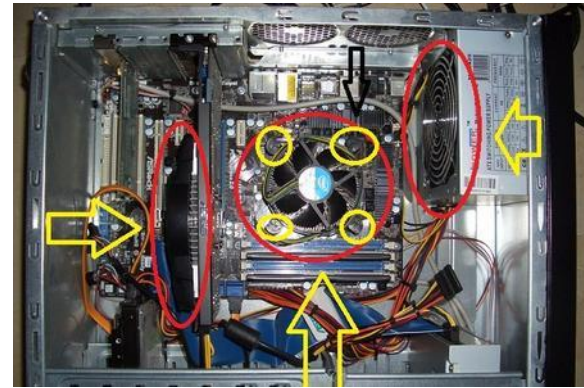
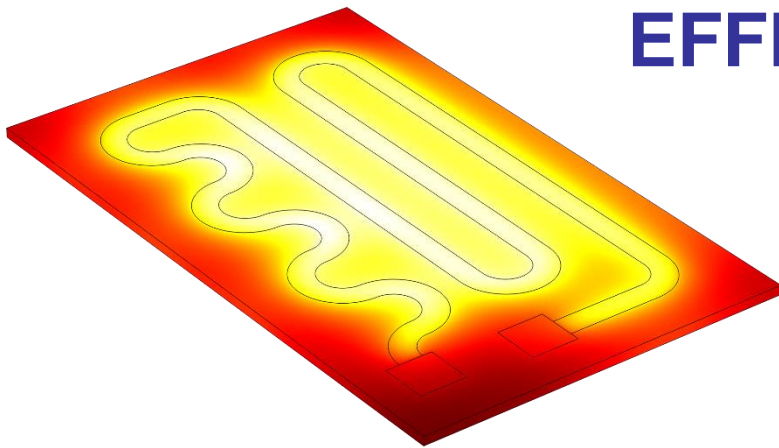
i = intensità di corrente

R = resistenza elettrica

t = tempo



# EFFETTO JOULE



$$C = i^2 R t$$



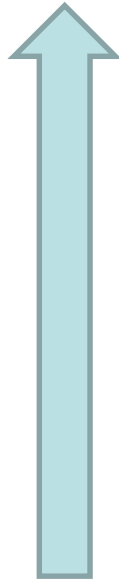
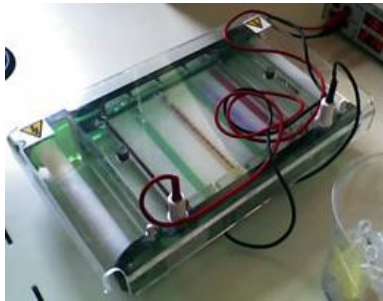
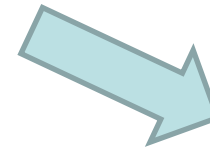
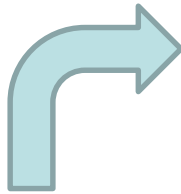
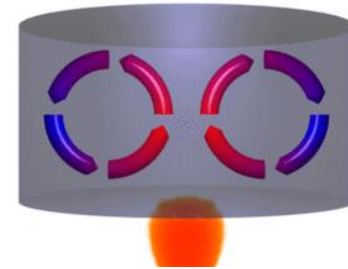
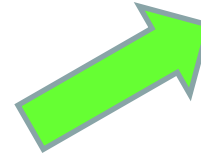
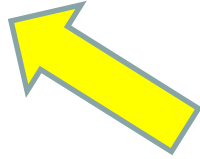
C = calore dissipato

i = intensità di corrente

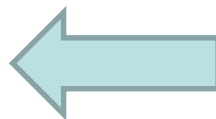
R = resistenza elettrica

t = tempo

# EFFETTO JOULE ED ELETTROFORESI



$$C = i^2 R t$$



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



# RISVOLTI PRATICI DELL'EFFETTO JOULE

1)



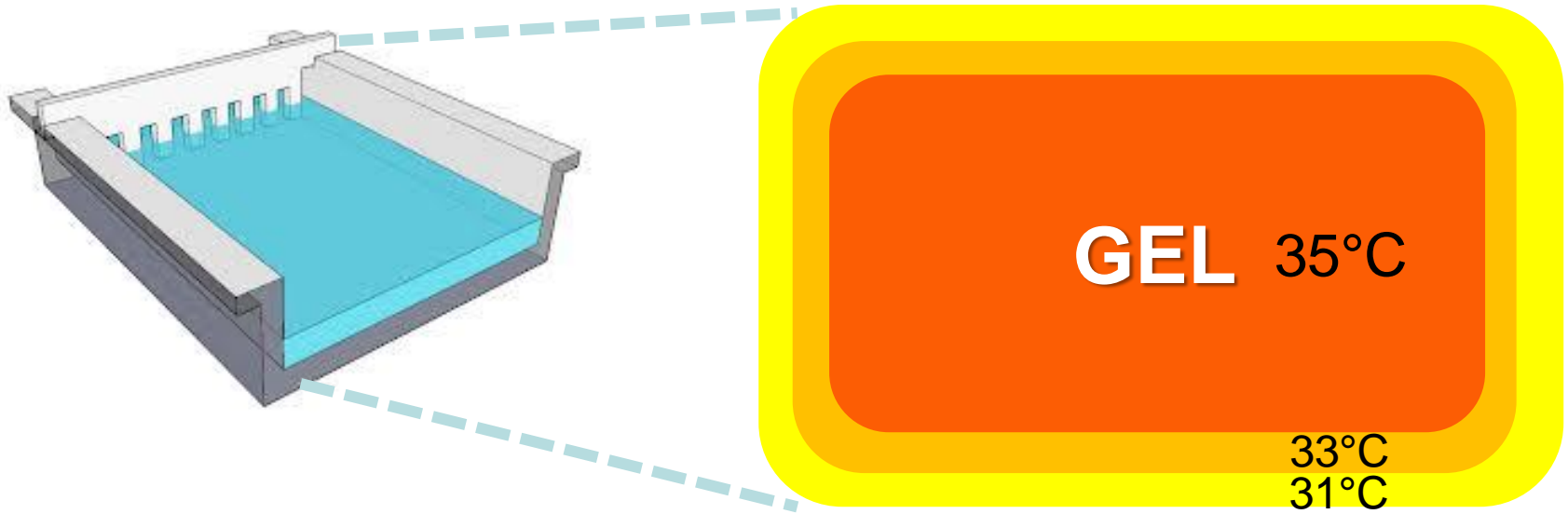
+ ghiaccio

2)

DDP < di 5 Volt/cm

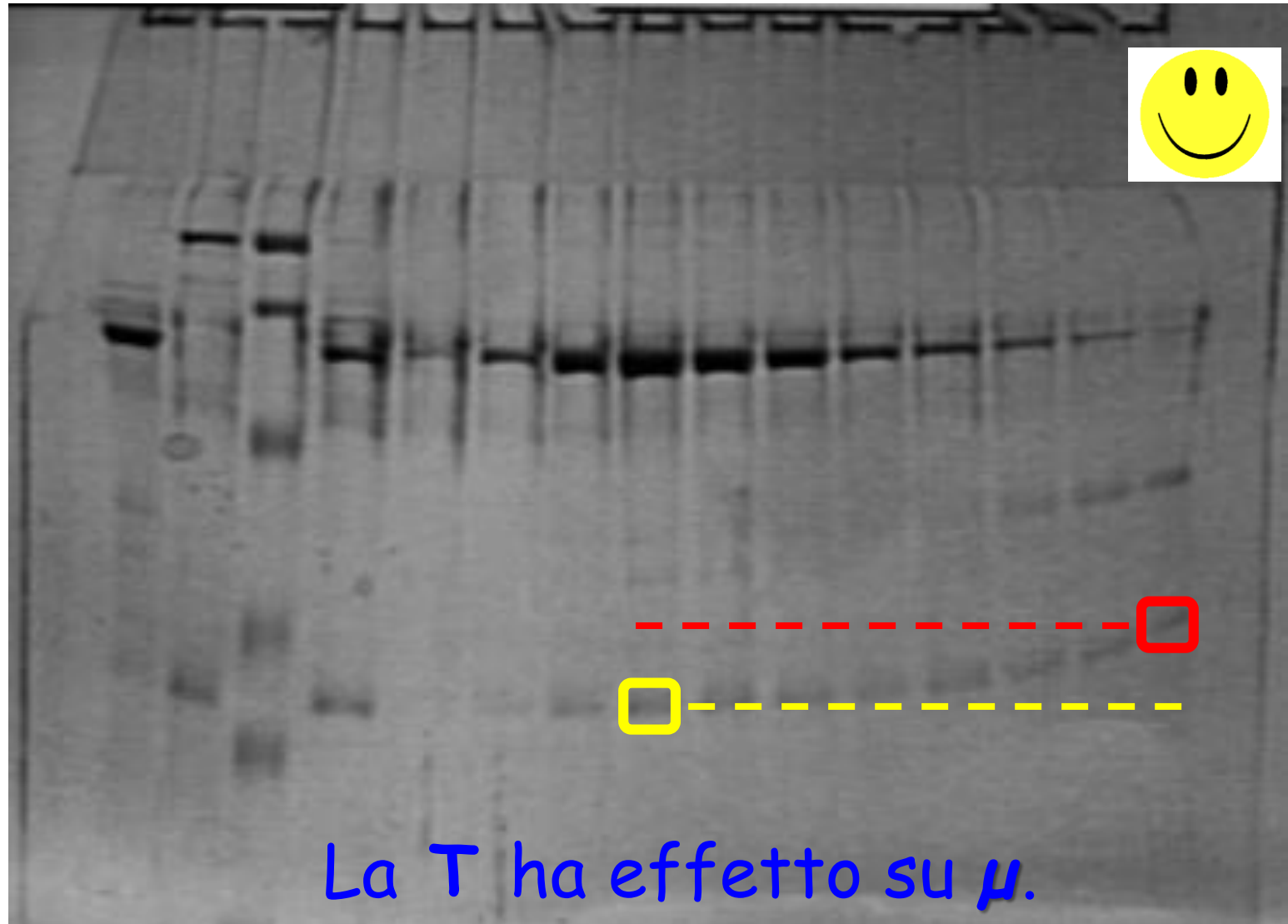


# DISPERSIONE NON OMOGENEA DEL CALORE



# TEMPERATURA NON OMOGENEA NEL GEL

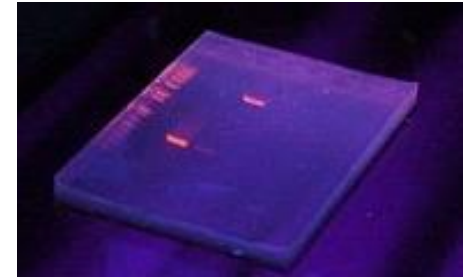
3)



Lo stesso campione migra diversamente per effetto Joule.

## 6) Presenza di bromuro di etidio:

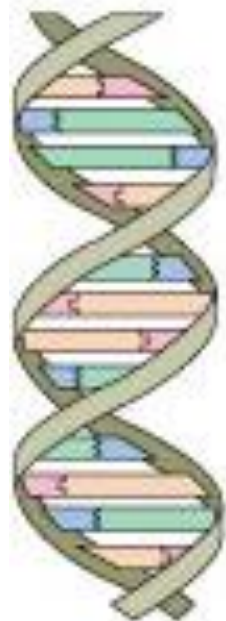
Colorante fluorescente (**intercalante**) utilizzato per visualizzare il DNA.



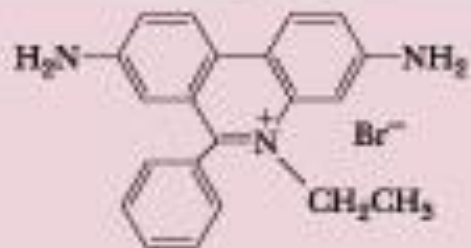
Radiazione UV assorbita a  $\lambda = 254 \text{ nm}$  dal DNA  
Riemessa a **590 nm** (arancione).

Il colorante riduce la velocità di migrazione del DNA di circa il **15%** .

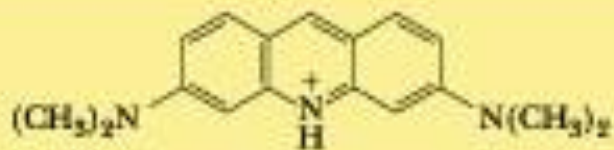
B-DNA before intercalation



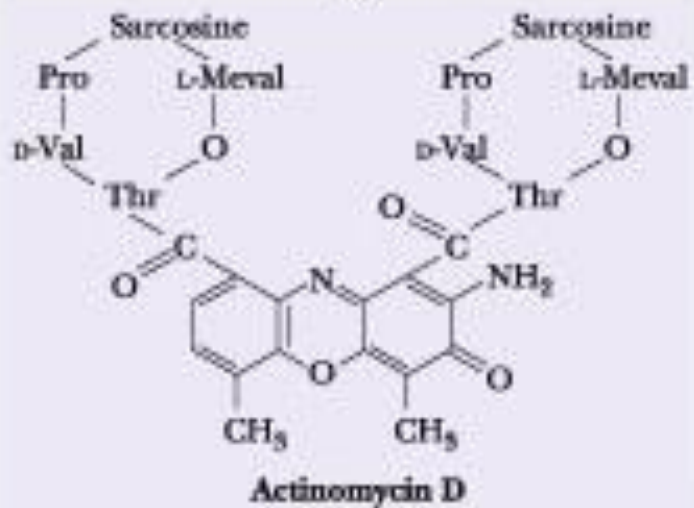
Intercalating agents



Ethidium bromide  
or



Acridine orange  
or

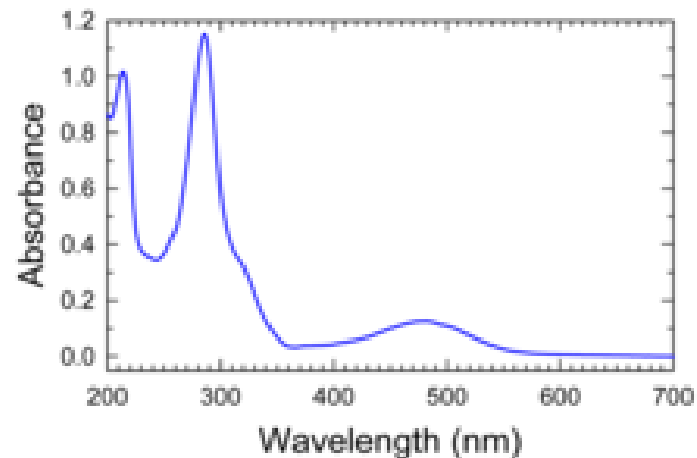


Actinomycin D

B-DNA after intercalation



Sensibilità  
0,1 µg DNA



## 7) Composizione e forza ionica del buffer:

Forza ionica molto **ridotta** → conduttività elettrica bassa → migrazione lenta

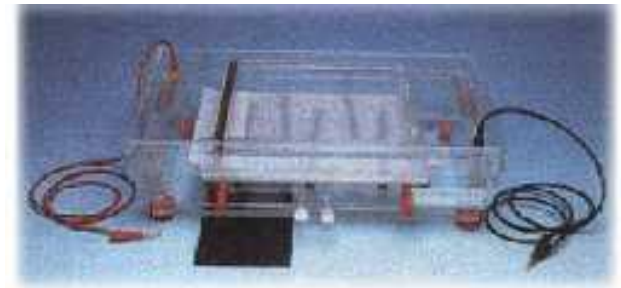
Forza ionica **elevata** → conduttività alta → si genera una gran quantità di calore che può sciogliere il gel e denaturare il DNA.

Il più comune tampone utilizzato è il **TAE**.

# Preparazione di un gel d'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 colorante, il quale serve semplicemente come indicatore di corsa (es: orange)
- 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.

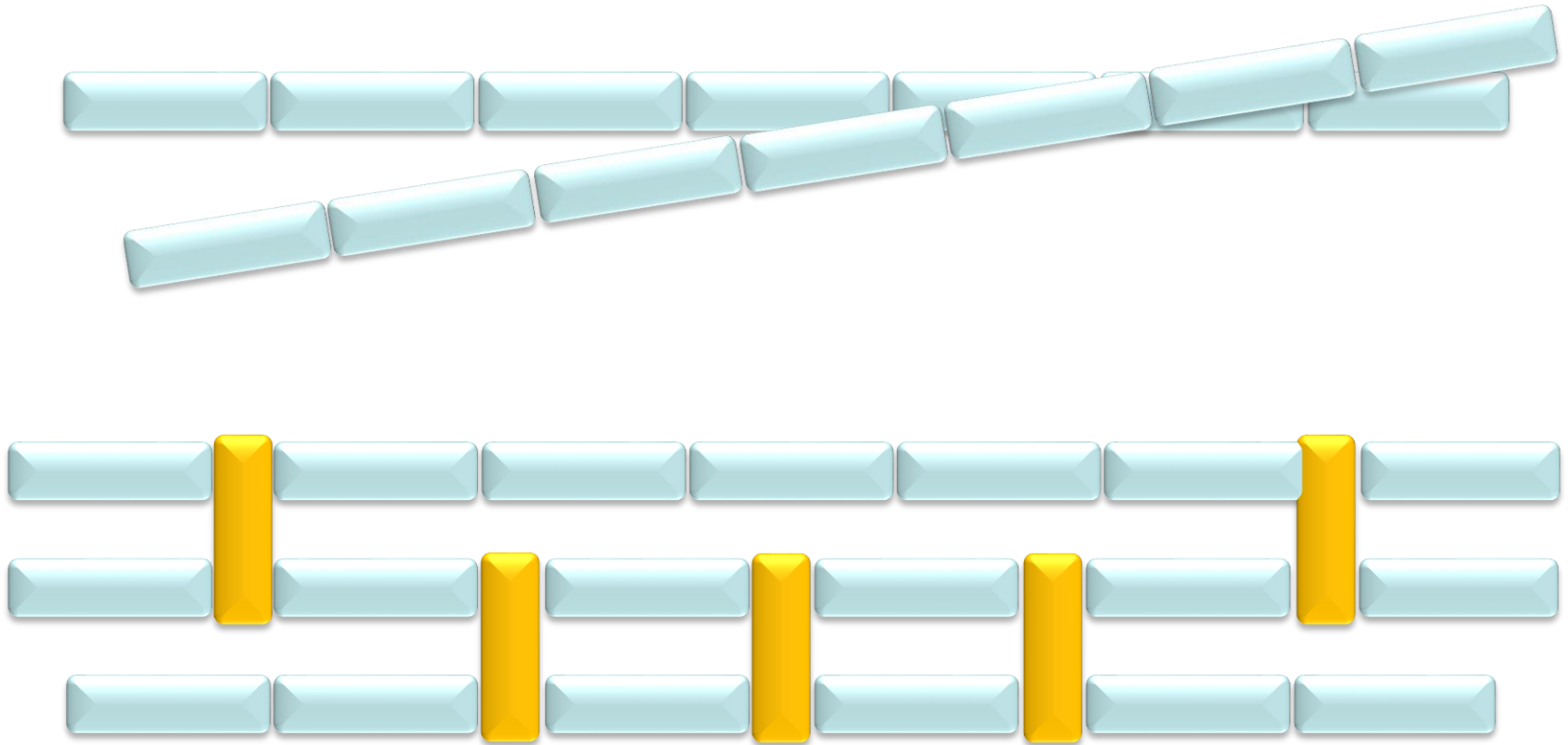
Gel di agarosio alcalino: viene utilizzato soprattutto per l'analisi di molecole a singolo filamento e spesso per analizzare i cDNA.

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.



# GEL DI POLIACRILAMIDE (PAA)

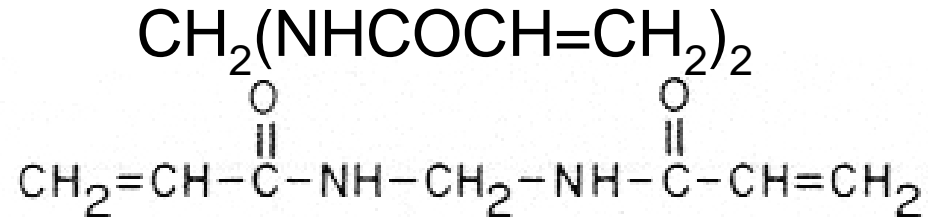
L'**acrilamide** è un **monomero** ( $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ ) che viene fatto polimerizzare con un **agente** in grado di stabilire legami crociati in presenza di un **catalizzatore** e di un **iniziatore**.



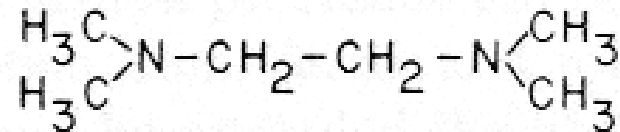
Sono coinvolti solamente **legami covalenti**.

# ELEMENTI INDISPENSABILI PER LA POLIMERIZZAZIONE

**Agente cross-linker:** N,N'-metilenbisacrilamide



**Catalizzatore:** TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)

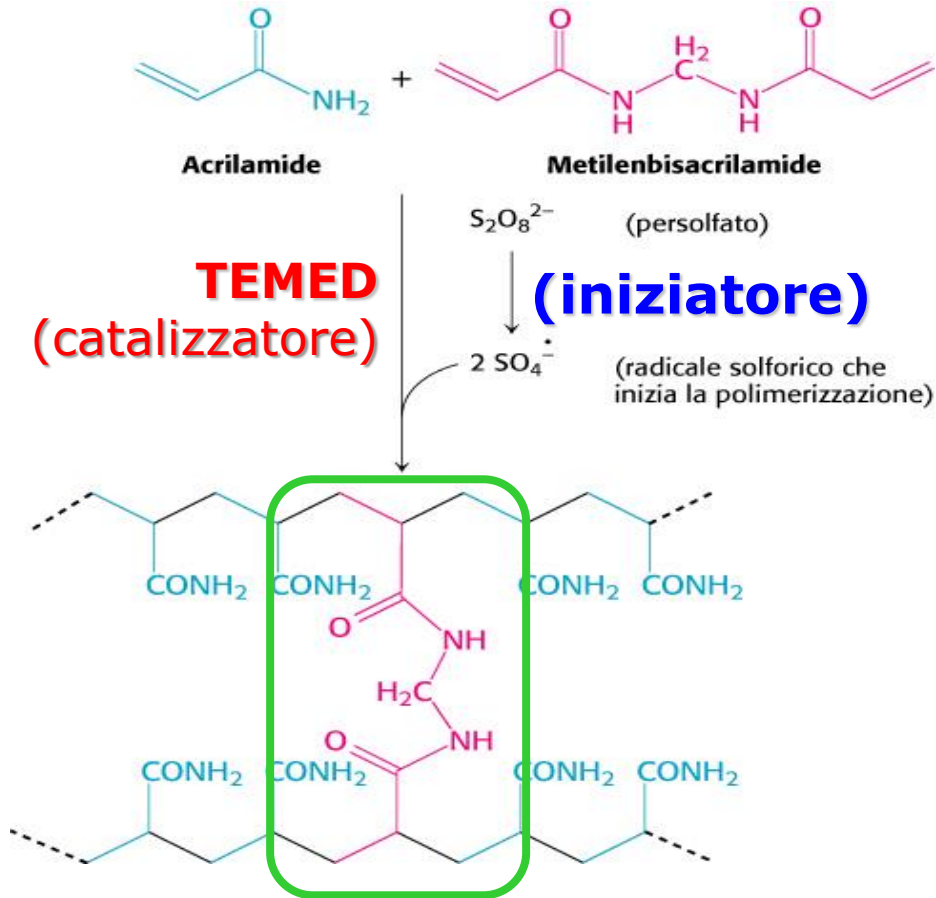


**Iniziatore:** ammonio persolfato (APS)

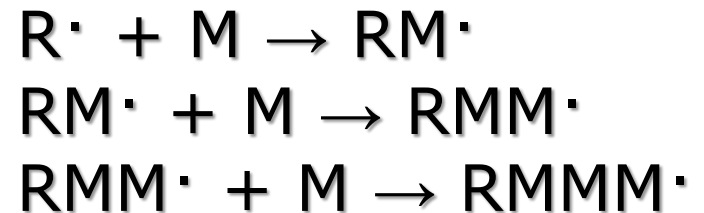
estere disolfato dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, omolisa rapidamente a radicali liberi.



# POLIMERIZZAZIONE



**Reazione a catena:**  
i monomeri (M) di acrilamide polimerizzano a formare lunghe catene.



Perché si formi il gel è **necessario** l'agente cross-linker.

# CARATTERISTICHE

## Porosità del gel:

dipende dalle concentrazioni di acrilamide e di metilenbisacrilamide.

**3 - 30%** di acrilamide → porosità 2 - 0,5 nm

## Tampone TBE:

Tris, acido bórico, EDTA.

> potere tamponante e > ddp applicabile (8 Volt/cm)

## VANTAGGI

- Maggiore efficienza nel separare piccoli frammenti di DNA (da 5 a 2000 bp),
- **elevato potere risolutivo**,
- possibilità di analizzare maggiori quantità di DNA senza perdite significative di risoluzione,
- possibilità di ottenere DNA estremamente puro.

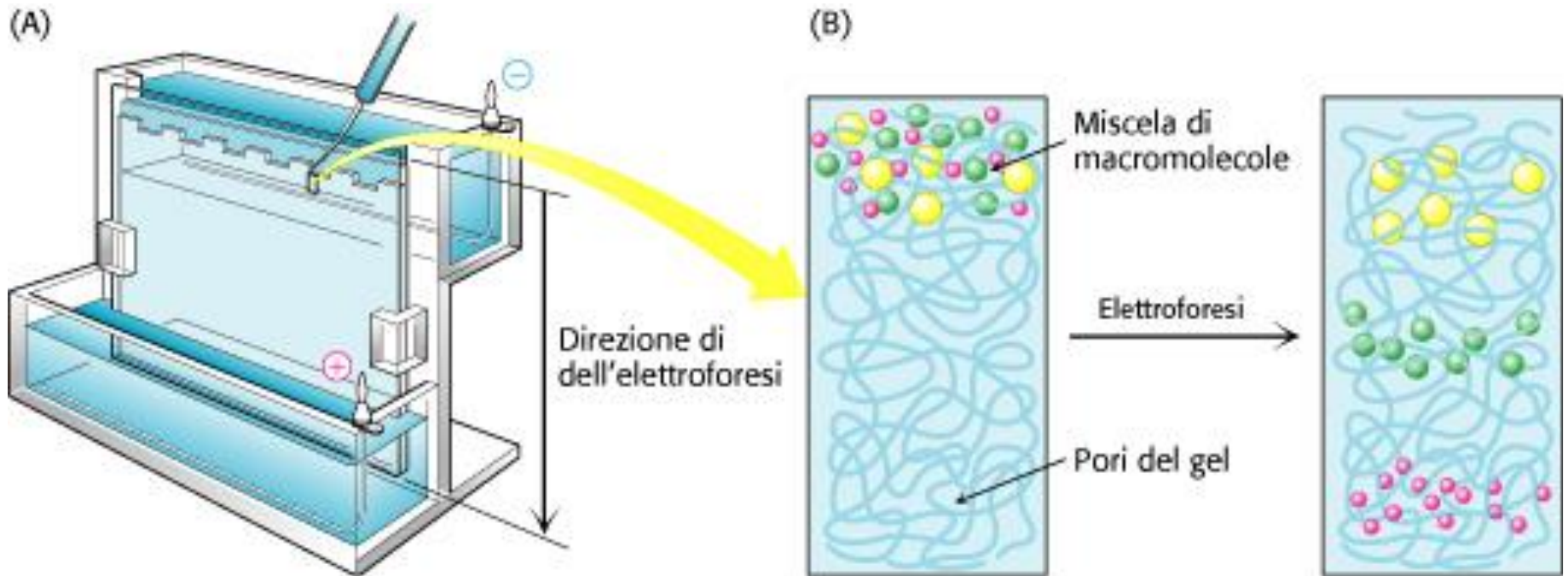


## SVANTAGGI

- **Neurotossicità** dell'acrilamide, che può essere assorbita dalla pelle (ma non come gel → lenti a contatto),
- preparazione più lunga e laboriosa del gel di agarosio.

# DIFFERENZE PRATICHE

- Corse elettroforetiche in **verticale**.





# DIFFERENZE PRATICHE

- Corse elettroforetiche in **verticale**.
- L'aria (bolle nel gel) non solo ostacola il passaggio della corrente, **impedisce** anche la **polimerizzazione**.
- Necessario un **lavaggio** dei pozzetti per eliminare residui di acrilamide e **spessore** del gel.
- Tampone **TBE**
- **Fine irreversibile dell'esperimento**. Campione caricato assieme a **traccianti** (xilen-cianolo + blu di bromofenolo) per fornire indicatori di corsa e **addensante** (glicerolo o saccarosio) per facilitare l'entrata nei pozzetti del campione.
- Utilizzo del bromuro di etidio **successivo** alla elettroforesi. Possibile perchè il gel è di **1 mm**, contro **1 cm** per l'agaroso.

Qual'è  
l'ottava  
differenza?

# VISUALIZZAZIONE DEL DNA SIA SU AGAROSO, SIA SU PAA

## TRANSILLUMINATORE CLASSICO



Schermo  
trasparente  
agli UV

# VISUALIZZAZIONE DEL DNA

## TRANSILLUMINATORI MODERNI



Può esser provvisto di sistema per la rilevazione e **fotografia** delle bande.



# ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

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

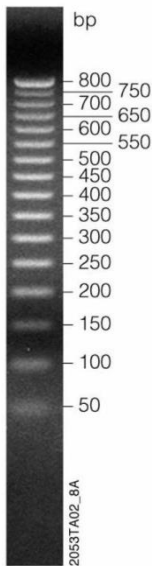
**Agaroso 0.3%: doppie eliche da 5.000 a 60.000 bp**

**Agaroso 2%: doppie eliche da 100 a 3.000 bp**

- **Campione:** il DNA a singolo frammento più flessibile di quello a doppia elica.

- **Tracciante:** **orange**, **blu di bromofenolo**, **xilen-cianolo**.  
Aggiunto al campione assieme ad un addensante.

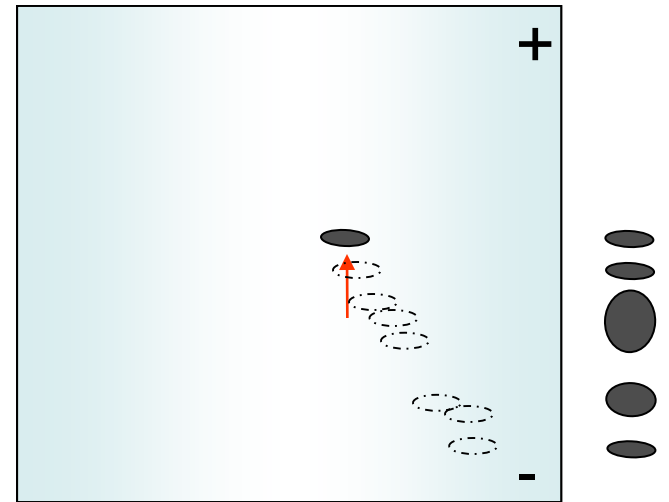
- **Marcatore di dimensioni:** DNA fagici o plasmidi frammentati per restrizione enzimatica. Fungono da confronto per campioni di DNA a doppia elica e lineari.



# ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

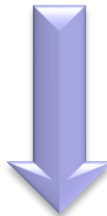
- Separa DNA anche di **2.000.000 bp** (cromosomi!).  
Gli altri metodi max 60.000 bp.

- Su **agaroso**, con 2 campi elettrici, applicati con angoli diversi ed alternativamente.



- DNA più piccoli si **riallineano** prima al nuovo campo e migrano + velocemente attraverso il gel.
- DNA più grandi possono anche risultare immobili.

# ELETTROFORESI DI RNA

- Prevalentemente su gel di **agaroso**, per dimensione.
- Usata per verificare l'**integrità** dell'RNA e l'assenza di DNA come contaminante, prima di proceder con altri studi.
- **Problema**: tendenza a formare strutture secondarie (es. a “trifoglio” dei tRNA)  

- Utilizzo di **denaturanti** nel gel e nel tampone di corsa (es. **formaldeide**).
- Quando occorra + risoluzione, si passa alla **PAA**; separazione RNA transfer 4S dall'RNA ribosomiale 5S.



# E-gel CloneWell



Sistema elettroforetico che **non** richiede l'impiego di sostanze cancerogene ed UV.

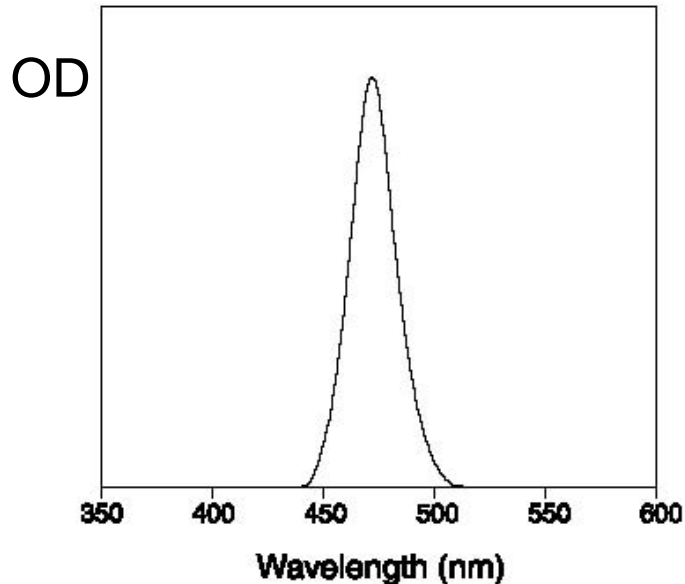


Rivelazione **rapida** e 5 volte più **sensibile** rispetto al bromuro di etidio, **da 0,1  $\mu\text{g}$  a 0,02  $\mu\text{g}$ .**

# E-gel CloneWell

La sorgente luminosa è costituita da 12 LED.

Diversamente dal transilluminatore UV, l'E-Gel® Imager™ non produce luce UV, bensì blu a **480 nm** (filtro blu).



“A proprietary stain incorporated in the gels is excitable by visible **blue light**”

Spettro di emissione dell'E-Gel® Safe Imager™ Realtime Transilluminator.

# FASI OPERATIVE



Inserire il gel  
(commerciale)



Caricamento



Corsa  
rapida (12')

# FASI OPERATIVE - VISUALIZZAZIONE



Eventuale recupero del campione.

# E-gel CloneWell

## VANTAGGI

- Separazione completa in circa 12 minuti.
- Rivelazione di DNA estremamente sensibile.
- > **Sensibilità**, significa **quantità < di campione**.
- Facile check della integrità anche dei campioni di RNA.
- **Visualizzazione della migrazione del DNA senza i rischi connessi all'uso di luce UV.**



# UTILIZZI

Genealogia

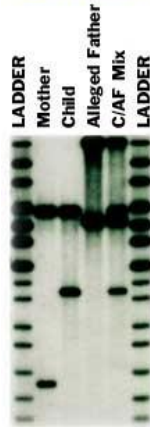


Check di una PCR

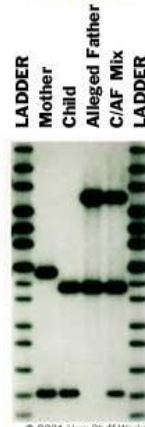
Complessità di una miscela

Ricerca di contaminanti e patogeni

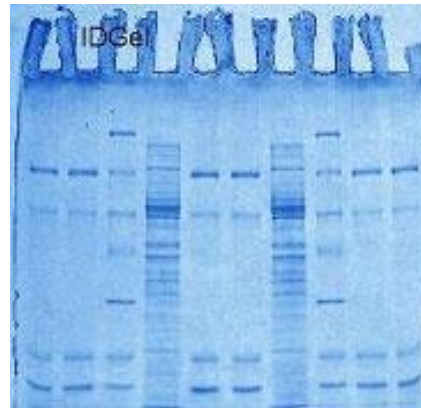
Paternity Exclusion



Paternity Inclusion



© 2001 How Stuff Works



Ricerca di mutazioni

Sequenziamento

Presenza di OGM