

Estrazione del DNA plasmidico

- con un pennarello scrivere su una provetta vuota la sigla utilizzata per identificare la provetta con la mini-coltura batterica; prelevare 200 µl di coltura batterica e trasferirli nella provetta vuota;
- centrifugare la mini-coltura batterica 3 minuti a 13 Krpm (cioè 13.000 rivoluzioni per minuto) ed eliminare il surnatante in un *becker*; la provetta va poi fatta sgocciolare sulla carta assorbente
- risospendere il *pellet* con 400 µl di soluzione A (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 50mM pH8; saccarosio 8%; Triton 0,5%) già addizionata con 1µl di proteinasi K
- miscelare con la micropipetta per risospendere le cellule o vortexare
- addizionare 20 µl della soluzione di lisozima
- miscelare per inversione (5 x) e lasciare 5 min a temperatura ambiente
- incubare per 2 minuti a 95°C in un termostato a secco
- centrifugare 5 minuti a 13 Krpm
- prelevare 400 µl di surnatante e trasferirli in una nuova provetta precedentemente siglata

Precipitazione del DNA

- al surnatante addizionare 50 µl di NaCl al 5% e 400 µl di isopropanolo e "vortexare"
- centrifugare 3 minuti a 13 Krpm, eliminare il surnatante
- addizionare 400 µl etanolo 70%
- centrifugare 3 minuti a 13 Krpm, eliminare il surnatante
- asciugare il pellet in termostato a secco a 60 °C
- risospendere con 50 µl TE + RNAsi A (che degrada l'RNA)
- aggiungere 5 µl dell'enzima EcoRI (miscelato con il suo tampone) incubare 10 minuti a 37°C

Preparazione del gel di agarosio

Nota di laboratorio: la concentrazione di agarosio del gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni e alla struttura (lineare o circolare) delle molecole di DNA da separare. Nel nostro caso, dovendo separare molecole di plasmide di qualche Kb (chilobasi, 1000 coppie di basi) e frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2.000 bp (*base pairs*, coppie di basi), si utilizza un gel di agarosio all' 1 %.

- preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di "nastro adesivo di carta"
- verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia "a bolla"
- pesaregr di agarosio, metterli in una beuta e aggiungere 30 ml di tampone TBE 1x
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde agitando di tanto in tanto.
- quando la soluzione di agarosio raggiunge una temperatura intorno ai 50°C, aggiungere 1 µl di colorante EuroSafe nella beuta e agitare dolcemente, quindi versare la soluzione, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine.
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- mentre si aspetta che il gel solidifichi, fare delle prove di caricamento dei pozzetti nei gel di prova (8-10 µl di *loading dye* 1x)
- togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella
- togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolari rispetto al gel

Corsa elettroforetica

Preparazione dei campioni

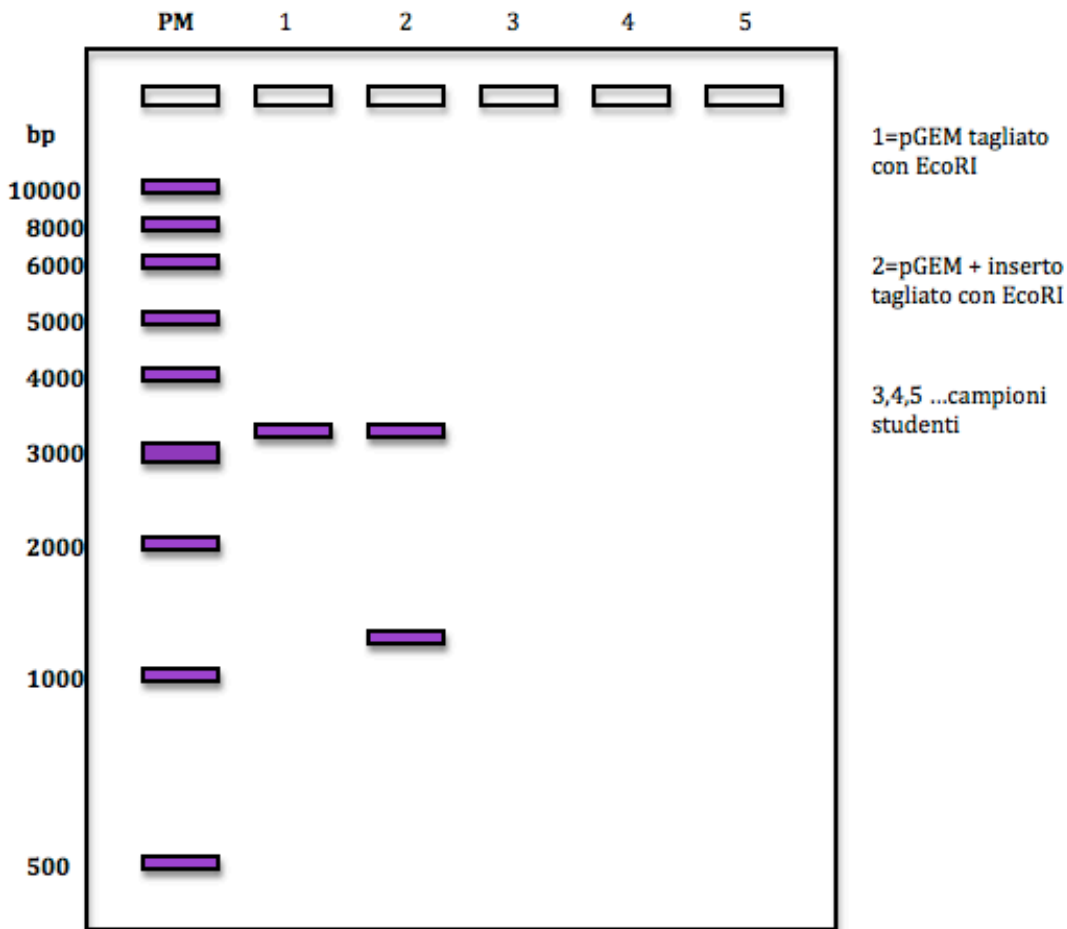
- a ciascuna provetta, già contenente *loading dye*, aggiungere 2 µl del rispettivo campione di DNA
- centrifugare brevemente (in gergo di laboratorio, si dice "spinnare" da *spin*, centrifugare)
- caricare lentamente ciascun campione (10 µl) nei singoli pozzetti (ogni pozzetto ha un volume di circa 15 µl), ponendosi con la punta della micropipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolare rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo dello stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
- chiudere la cella elettroforetica e collegare i morsetti ai poli del *power supply*; il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo
- alla fine della corsa elettroforetica osservare il gel al transilluminatore

Marcatori di peso molecolare utilizzati

Come marcatore di peso molecolare di DNA con struttura lineare è stato utilizzato 1 Kb DNA ladder. I frammenti di 1,0 e di 3,0 Kb sono stati intensificati per servire da banda di riferimento.

Risultati ed interpretazione

Il risultato del gel di agarosio è riportato nello schema sottostante.



Descrizione dettagliata del gel:

Nella prima corsia c'è il peso molecolare: frammenti di DNA a peso molecolare noto

Nella seconda corsia c'è il DNA plasmidico estratto da una colonia blu e tagliato con EcoRI. Poiché le colonie blu contengono il plasmide pGEM (non ricombinante), si osserva una banda delle dimensioni di quelle del plasmide (3197 pb)

Nella terza corsia c'è il DNA plasmidico estratto da una colonia bianca e tagliato con EcoRI. Il DNA ricombinante contiene un inserto di 1000 pb quindi dopo il taglio con l'enzima di restrizione si osserva il plasmide pGEM linearizzato e la banda dell'inserto.

Nelle corsie successive troviamo i campioni caricati dagli studenti