

ESERCITAZIONE DI BIOLOGIA MOLECOLARE E GENETICA

Esercitazione per la determinazione della mappa di restrizione mediante analisi elettroforetica di frammenti di DNA del vettore di espressione pTRc99A-ADH

Le distanze di migrazione elettroforetica di frammenti di DNA su gel di agarosio sono inversamente proporzionali alla loro massa e quindi alla loro lunghezza. Pertanto, l'analisi elettroforetica di frammenti di DNA di dimensioni ignote permette di stabilirne le lunghezze, utilizzando come parametro la loro migrazione e come riferimento le distanze di migrazione di frammenti campione a lunghezza nota. L'analisi elettroforetica di campioni di DNA idrolizzati con vari enzimi di restrizione (R.E.) consente di stabilire la cosiddetta mappa di restrizione, cioè la disposizione relativa dei vari siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione sulla sequenza di DNA.

Materiale specifico occorrente:

Agarosio

Soluzione tampone per l'elettroforesi (Tampone TAE: Tris-Acetato-EDTA)

Forno a microonde

Bagno termostato a 37°C

Enzimi di restrizione

Camera elettroforetica con relativo generatore di corrente.

Soluzione addensante per il caricamento dei campioni nel gel di Agarosio.

Preparazione del gel all'1% di Agarosio

Volume totale: 30 ml

Agarosio 300 mg

Tampone TAE 30 ml

Sciogliete l'agarosio direttamente nel tampone in un forno a microonde o a bagnomaria fino ad ottenere una soluzione limpida. Lasciate raffreddare sul banco fino a quando la temperatura della soluzione non sia scesa a circa 50°C. Aggiungete 3 microlitri di una soluzione di Bromuro di Etidio (10 mg/ml in acqua).

Nota di sicurezza : il bromuro d'etidio è un intercalante del DNA. E' risultato mutageno al test di Ames ed è un potenziale cancerogeno. L'esercitatore indosserà guanti e camice per maneggiare le soluzioni che lo contengono.

Mescolate per agitazione. Il bromuro di etidio ci consente di visualizzare il DNA grazie alla sua capacità di intercalarsi fra le basi del DNA e di emettere luce in fluorescenza una volta illuminato con luce UV.

Versate la soluzione ancora calda nei vassoi apposti sui quali avrete preventivamente adagiato dei pettini per la formazione dei pozzetti di caricamento. Lasciate gelificare per raffreddamento spontaneo avendo cura che il piano d'appoggio sia perfettamente orizzontale. A gelificazione avvenuta estraete il pettine dal gel e collocate il vassoio in una camera elettroforetica.

a) Digestione con enzimi di restrizione

Il DNA del plasmide (circa 600 ng) viene digerito per 30' a 37°C con tre enzimi di restrizione, HindIII, EcoRV e NdeI allo scopo di mappare le posizioni dei siti EcoRV e NdeI. L'enzima HindIII riconosce un sito unico nel plasmide e quindi ci consente di stabilire la distanza di migrazione del plasmide intero linearizzato. La digestione viene effettuata nelle condizioni di pH e forza ionica suggerite dalla casa produttrice dell'enzima e utilizzando 1 unità di enzima per ogni digestione. Una unità di enzima di restrizione è definita come la quantità di enzima che digerisce 1 microgrammo di DNA a 37°C in 1 ora.

Volume totale di digestione 20 microlitri (20µl)

Campioni	1	2	3	4
Tipo di digestione	EcoRV	NdeI	EcoRV/NdeI	HindIII
Plasmide µl 100ng/µl	6µl	6µl	6µl	6µl
H ₂ O	10 µl	10 µl	8 µl	10 µl
Buffer B (10X)	2µl	2µl	2µl	2µl
Enzima (0.5u/µl)	2µl	2µl	2µl +2µl	2µl
TOTALE	20 µl	20 µl	20 µl	20

b) Elettroforesi

La migrazione dei campioni di DNA plasmidico digeriti enzimaticamente deve sempre essere confrontata con il DNA plasmidico non trattato enzimaticamente e con frammenti di DNA di peso molecolare noto (marcatori o standards di peso molecolare).

A tale scopo preparate altri due campioni (P e C):

	P	M
Plasmide non digerito (100 ng/ml)	3 μ l	
Marcatore (0.25 μ g/ μ l)		2 μ l
H ₂ O	17 μ l	18 μ l
TOTALE	20μl	20μl

Aggiungete a tutti i campioni 2 μ l di S.B. ("Sample Buffer") 10x, (un tampone che contiene Blu di Bromofenolo e Xilene Cianolo, due coloranti che consentono di seguire la corsa elettroforetica, e glicerolo che aumenta la densità del campione da caricare). Caricate un campione per pozzetto introducendo la punta della micropipetta nel pozzetto ma avendo cura di non bucarne il fondo. Svuotate la punta lentamente ma con continuità. Chiudete la camera elettroforetica con l'apposito coperchio, collegate gli elettrodi all'alimentatore in modo che il catodo (polo negativo) sia vicino ai pozzetti. Il DNA è carico negativamente e pertanto in queste condizioni migra verso l'anodo (polo positivo). Si esegue la corsa elettroforetica a 100 volts costanti per circa 30 minuti. Al termine della corsa il gel viene osservato al transilluminatore.

Nota di sicurezza: I raggi UV sono nocivi e si deve usare lo schermo protettivo e gli occhiali contro gli UV durante l'esame del gel sul transilluminatore

c) Esame della foto del gel

- *Allestimento curva di calibrazione del DNA ladder su fogli di carta semilogaritmica*
- *Determinazione delle dimensioni dei frammenti*
- *Costruzione della mappa di restrizione*

Al termine della corsa si misura la migrazione (in cm o mm) del plasmide linearizzato (5200 coppie di basi) e quella dei frammenti a peso molecolare noto (standard) presenti nel marcatore, riportando i valori nella tabella che segue:

Lunghezza frammenti di riferimento in coppie di basi	Distanza di migrazione
6108	
5090	
4072	
3054	
2036	
1636	
1018	
506/517	
396	

Si costruisce una curva di riferimento, riportando sulle ascisse la migrazione (in mm o in cm) dei singoli frammenti di riferimento e sulle ordinate, che sono in scala logaritmica, la lunghezza dei frammenti in coppie di basi. Dalle distanze di migrazione delle bande presenti nei campioni del plasmide digerito con EcoRV e NdeI si risale alla loro lunghezza in coppie di basi e si può quindi costruire la relativa mappa di restrizione. Confrontate anche la migrazione dei plasmide linearizzato e di quello non digerito.