

SOUTHERN BLOTTING (DNA BLOTTING) → DNA

NORTHERN BLOTTING → RNA

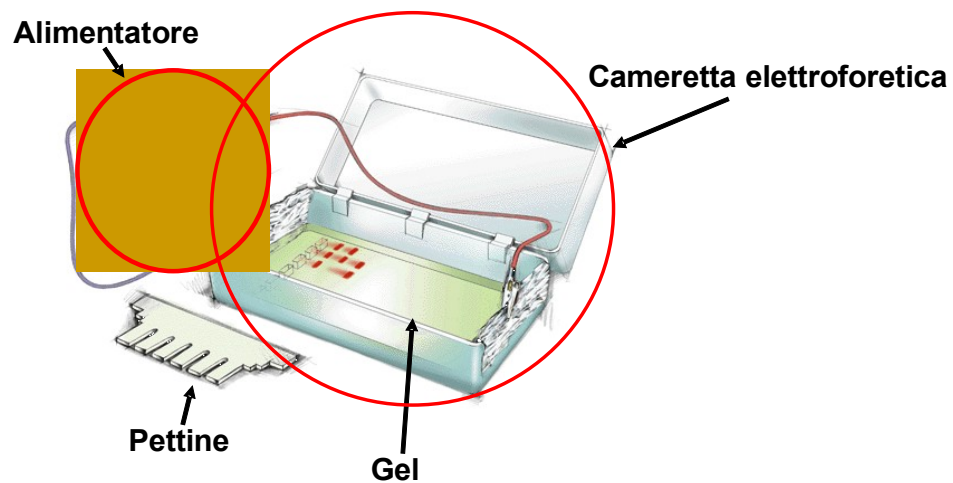
WESTERN BLOTTING → PROTEINE

Rivelare la presenza di una specifica molecola in una miscela complessa

1. Separare le molecole della miscela
2. Trasferire su filtro
3. Identificare la molecola di interesse

## Elettroforesi su gel di agarosio

Tecnica basata sul movimento di particelle (molecole) elettricamente cariche quando sottoposte ad un campo elettrico



## GEL DI AGAROSIO

Agarosio: polimero lineare composto da residui di L- e D-galattosio

Polvere + tampone di corsa

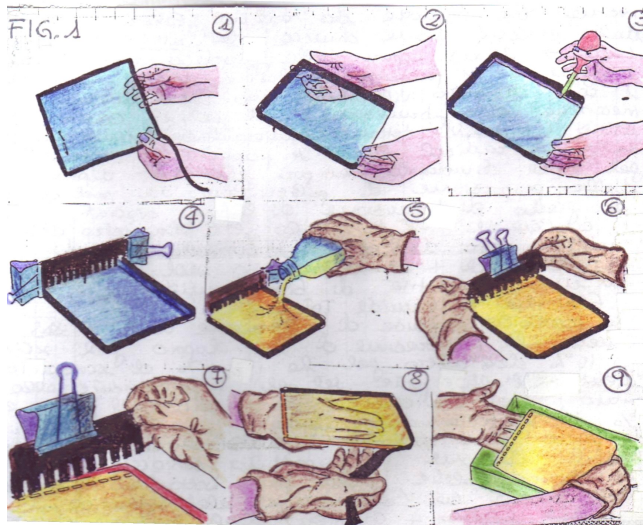


Mediante riscaldamento e successivo raffreddamento



gelificazione

Gel (matrice porosa)



## GEL DI AGAROSIO

Rete tridimensionale: diametro canali **50nm > 200nm**

% agarosio (peso/volume)	Dimensione frammenti DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tasso di migrazione inversamente proporzionale al  $\log_{10}$  del numero delle cb

**Frammenti lunghi più lenti dei frammenti corti**

---


Fattori che influenzano l'elettroforesi

CAMPIONE: **CARICA NETTA:** dipende dal pH del mezzo secondo la legge di Handerson-Hasselback la velocità di migrazione aumenta in funzione della carica

**DIMENSIONI:** la velocità di migrazione diminuisce all'aumentare delle dimensioni

**FORMA:** molecole di dimensioni simili ma di forma diversa possono mostrare caratteristiche frizionali diverse.

CAMPO ELETTRICO:  $I = V/R$

TAMPONE: 

---

---

## Tampone elettroforetico

### Condizioni native (DNA)

- Permettere la conduzione della corrente
- Mantenere lo stato di ionizzazione delle molecole (pH ~8)

La mobilità elettroforetica del DNA è influenzata dalla forza ionica della soluzione

**Bassa fi:** minor produzione di calore, ma alta diffusione dei campioni

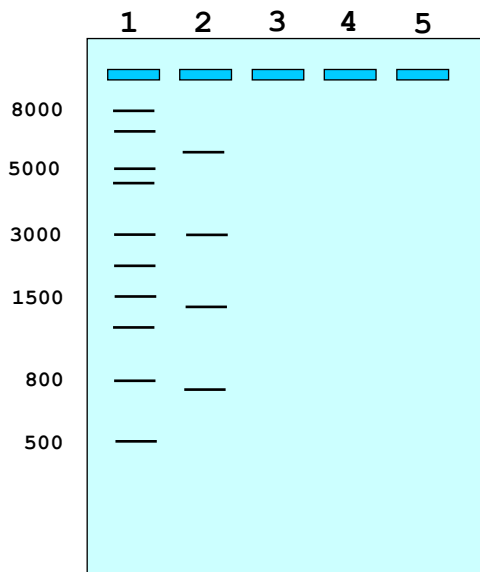
**Alta fi:** diminuzione della velocità di migrazione, sviluppo eccessivo di calore

Concentrazione salina tra 50 E 100 Mm

TAE: Tris Acetato EDTA

TBE: Tris Borato EDTA

---



**Bromuro di etidio:** si intercala tra le basi  
interagendo mediante legami di van der Waals  
Eccitazione UV (254 nm) → Emissione nel visibile

### Frammentazione DNA genomico mediante digestione enzimatica

DNA genomico: 3 miliardi cb

Enzimi di restrizione

Origine batterica

TIPO I	TIPO II	TIPO III
Bifunzionale	Endonucleasi separata dalla metilasi	Bifunzionale
Sequenza asimmetrica di 5-7 cb	Sequenza di 4-6 cb, spesso palindromica	Sequenza bipartita e asimmetrica
24-26 cb a valle	Sito di riconoscimento	Aspecifico, a >1000 cb

EcoRI

5'-GGGATCCCTGAGCTGAGAG**AATTC**ACTGGTCGTACAAATTGC-3'  
3'-CCCTAGGGACTCGACTCT**CTTAA**GTGACCACGATGTTTAACG-5'

5'-GGGATCCCTGAGCTGAGAG-3'      5'-AATTC**ACTGGTCGTACAAATTGC**-3'  
3'-CCCTAGGGACTCGACTCTCTTAA-5'      3'-GTGACCACGATGTTTAACG-5'

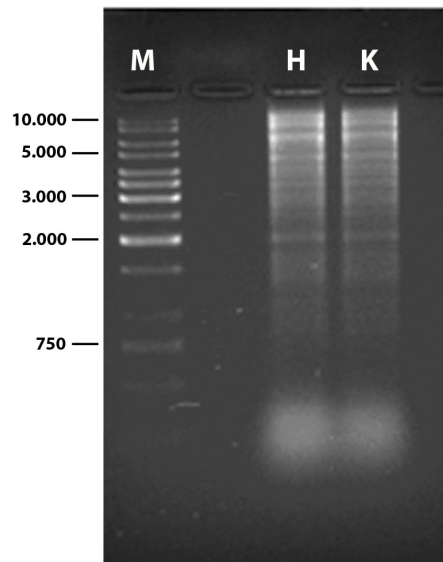
**Estremità appiccicose (sticky ends)**

5'-██████████-3'      5'-██████████-3'      **5' protrudenti (5' protuding)**  
3'-██████████-5'      3'-██████████-5'

5'-██████████-3'      5'-██████████-3'      **3' protrudenti (3' protuding)**  
3'-██████████-5'      3'-██████████-5'

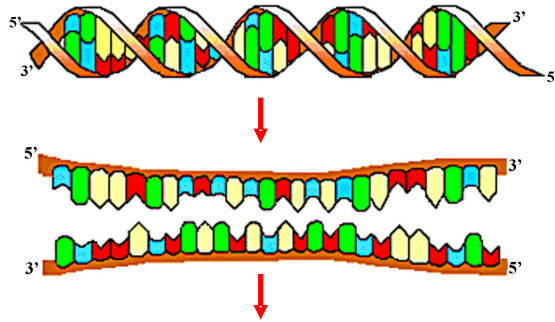
**Estremità piatte (blunt ends)**

5'-██████████-3'      5'-██████████-3'  
3'-██████████-5'      3'-██████████-5'



## Trattamento del gel dopo la corsa elettroforetica

### Frammento DNA



### Ibridazione



## Trattamento del gel dopo la corsa elettroforetica

1.

Frammenti di interesse > 1,5 kb



Depurinazione: trattamento in HCl 0,25M

2.

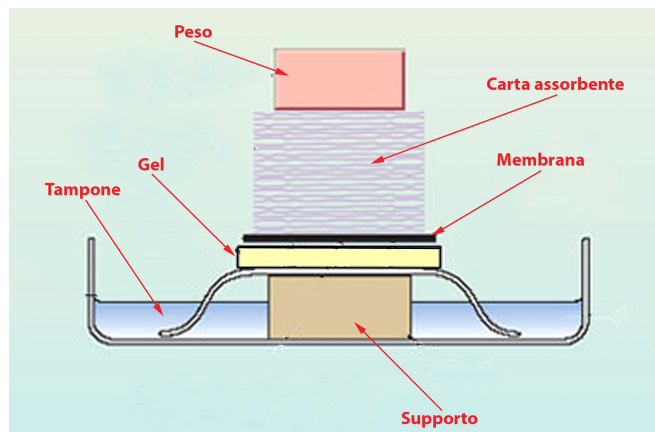
Denaturazione del DNA in condizioni alcaline  
(NaOH 0,5M)

3.

Trasferimento con tampone SSC 20X

	Nitrocellulosa	Nylon
Capacità ( $\mu\text{g}$ acido nucleico/ $\text{cm}^2$ )	80-120	100-500
Tampone trasferimento	Alta forza ionica a pH neutro	Bassa forza ionica a valori di pH variabili
Immobilizzazione	Stufa a vuota a 80 °C (backing)	- Stufa a vuota a 80 °C (backing) - Irradiazione UV
Resistenza	Bassa	Alta

## TRASFERIMENTO



**8-24h**

