

La soluzione di caricamento

a cura di V. Soglio adattato da Sambrook and Russel, Molecular Cloning: a Laboratory Manual

Prima di caricare i campioni di DNA su gel di agarosio per la corsa elettroforetica si, aggiunge la soluzione di caricamento. Essa contiene due coloranti (blu di bromofenolo e xilene cianolo) e il glicerolo in soluzione acquosa. Il glicerolo, più denso dell'acqua, ha la funzione di appesantire il campione e fare in modo che raggiunga il fondo del pozzetto e non si diffonda nel tampone TAE in cui il gel è immerso. I due coloranti facilitano il caricamento in quanto il blu rende visibile il campione che entra nel pozzetto.

Obiettivo

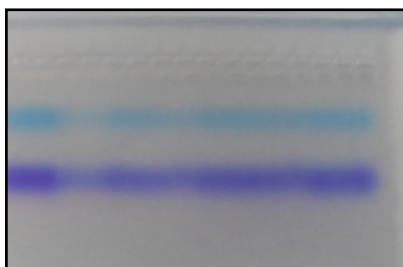
Preparare la soluzione per caricare i campioni di DNA su gel di agarosio.

Procedimento

1. Per preparare 100 ml di soluzione di caricamento aggiungere 30 ml di glicerolo a 70 ml di acqua deionizzata.
2. Pesare 0,25 g di blu di bromofenolo e 0,25 g di xilene cianolo.
3. Aggiungerli alla soluzione preparata al punto 1 e assicurarsi che si sciolgano.
4. Conservare la soluzione in frigorifero.
5. La soluzione di caricamento così ottenuta è 6X, questo significa che quando la si aggiunge ai campioni va diluita di 6 volte. Un esempio: se si vuole caricare su gel d'agarosio un volume totale di 24 μ l, si devono aggiungere 8 μ l di soluzione di caricamento 6X a 16 μ l di campione di DNA.

Osservazioni

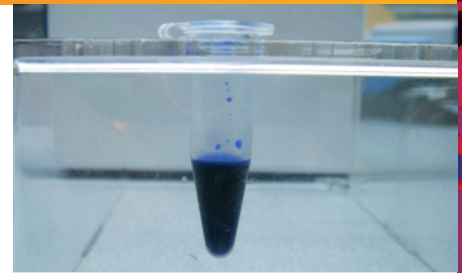
Durante la corsa elettroforetica anche i due coloranti della soluzione di caricamento si muovono all'interno del gel e più precisamente migrano verso il polo positivo. Poichè essi corrono con velocità diverse evidenziano due fronti (vedi figura sotto). Il blu di bromofenolo migra come un frammento di DNA di circa 300 paia di basi, mentre lo xilene cianolo si muove come un frammento di circa 3500 paia di basi. Nel caso in cui i pesi molecolari dei campioni di DNA caricati siano noti e usando i due fronti come riferimento, si può stimare la posizione delle bande di DNA nel gel anche durante la corsa elettroforetica.



— pozzetti
— xilene cianolo
— blu di bromofenolo

Reference

Sambrook and Russel. "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" CSHL Press



Tempo previsto

30 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Provette
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Blu di bromofenolo (colorante in polvere)
- ✓ Xilene cianolo (colorante in polvere)
- ✓ Glicerolo
- ✓ Acqua deionizzata

Strumentazione

- ✓ Bilancia