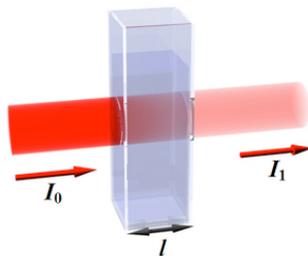


## Quantizzazione del DNA con spettrofotometro

Al termine della metodica di estrazione, occorre quantificare il DNA isolato. Un metodo per **quantificare** in modo preciso è quello spettrofotometrico. Si utilizza uno spettrofotometro che è uno strumento in grado di misurare la quantità di radiazione assorbita dalla materia che è proporzionale alla quantità di materia stessa.

Più in particolare la legge di Lambert-Beer, è una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita da un mezzo alla natura chimica, alla concentrazione ed allo spessore del mezzo attraversato.

Quando un fascio di luce (monocromatica) di intensità  $I_0$  attraversa uno strato di spessore  $l$  di un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte ne viene trasmessa con intensità residua  $I_1$ .



Il rapporto tra le intensità della luce trasmessa e incidente sul mezzo attraversato è espresso dalla seguente relazione (si veda dimostrazione seguente)

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-k\lambda l} = T = e^{-A}$$

dove  $k\lambda$  è il coefficiente di assorbimento (che è una costante tipica del mezzo attraversato e dipende dalla lunghezza d'onda  $\lambda$ ) e  $l$  è lo spessore di soluzione attraversata.

Definita quindi la trasmittanza ( $T$ ) come il rapporto  $I_1/I_0$  e come assorbanza ( $A$ ) l'opposto del logaritmo naturale della trasmittanza, la legge assume una forma ancora più semplificata:

$$A = k\lambda l$$

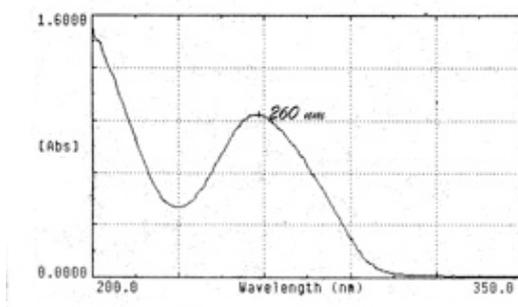
che per una soluzione viene ulteriormente modificata in

$$A = \epsilon_{\lambda} l M;$$

dove  $\epsilon_{\lambda}$  è detta estinzione molare,  $M$  è la molarità della soluzione e  $l$  è il cammino geometrico in cm. Il valore di  $\epsilon_{\lambda}$  è considerato costante per una data sostanza ad una data lunghezza d'onda.

La misura dell'assorbanza di soluzioni chimiche a lunghezze d'onda tipiche è il principio su cui si basa l'analisi per spettrofotometria.

Il tipico spettro di un acido nucleico è rappresentato in figura:



Il DNA presenta un picco di assorbimento a 260 nm di lunghezza d'onda. Quando un raggio di luce a tale lunghezza d'onda colpisce la soluzione di DNA, una parte di energia di tale raggio viene assorbita dalle basi azotate del DNA, così dalla cuvetta uscirà un raggio di minore intensità rispetto a quello incidente. A questa lunghezza d'onda viene misurato il valore di Assorbimento per calcolare la concentrazione del DNA.

Per il DNA, utilizzando cuvette di 1 cm di cammino ottico ad un valore di assorbanza a 260 nm pari a 1 unità di assorbimento, corrisponde una concentrazione di DNA di 50 µg/ml. Vale la seguente formula semplificata:

$$1 \text{ u.a.}_{260} = 50 \text{ µg/ml}$$

Con una semplice proporzione si ricava

$$\text{Concentrazione di DNA (µg/ml)} = A_{260} \times 50 / 1 \text{ u.a.}$$

In pratica inserendo ad es. 4 µl di DNA estratto in una cuvetta da 1 ml (4 µl+996 H<sub>2</sub>O) la concentrazione espressa in µg/ml si ricava semplicemente così:  $A_{260} \times 50$ . Lo spettrofotometro ci indica che nella cuvetta da 1 ml ci sono ( $A_{260} \times 50$ ) µg di DNA. Tale quantità deriva dai µl di DNA che abbiamo inserito nella cuvetta. Avendo caricato 4 µl del campione di DNA estratto, la concentrazione del campione, espressa in µg/µl, sarà

$$A_{260} \times 50 / 4 .$$

Osservando lo spettro, è possibile valutare anche la **purezza** del DNA isolato, infatti tracce di proteine o fenoli mostrano uno spettro deformato con un picco aggiuntivo (o una "gobba") a 280 nm.

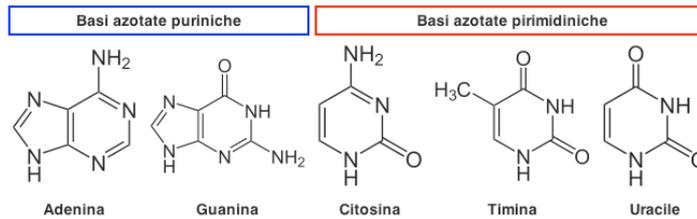
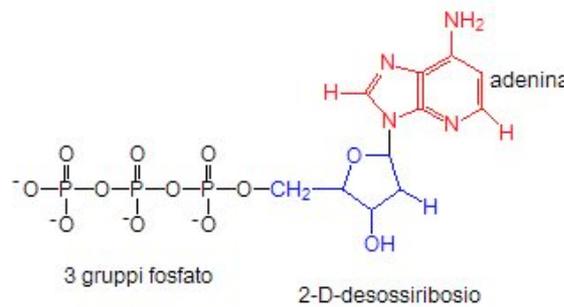
Per un DNA di buona qualità il rapporto dei valori di assorbimento a 260 e 280 nm deve essere di 1,8. Se tale rapporto risulta inferiore significa che ci sono possibili contaminazioni di proteine o composti fenolici. In questi casi il DNA dovrà essere ulteriormente purificato perché tali contaminazioni possono interferire con le reazioni enzimatiche che si utilizzano in biologia molecolare.

## Elettroforesi su gel di agarosio

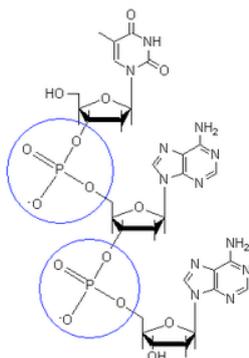
Una metodica di routine per analizzare il DNA, che consente di valutarne in modo approssimativo la concentrazione, l'integrità ed il peso molecolare (la lunghezza), è l'elettroforesi su gel di agarosio.

Consiste nel caricare campioni di DNA in soluzione acquosa all'interno di un gel e sottoporlo ad un campo elettrico. Il DNA è carico negativamente a causa dei gruppi fosfato che fanno parte dello scheletro del DNA. Se sottoposto ad un campo elettrico migra verso il polo positivo.

Il DNA è costituito da monomeri, i **nucleotidi**.



**Il legame fosfodiester**



**Rappresentazione del DNA**

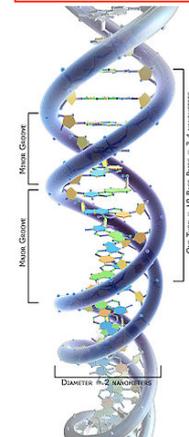
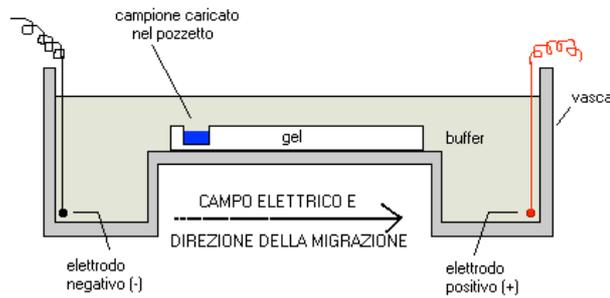


Figure riassuntive della struttura del DNA

### Rappresentazione di un apparato elettroforetico



Il DNA migra attraverso le maglie del gel di agarosio con una velocità che dipende dal proprio peso molecolare: frammenti brevi migrano più velocemente di frammenti lunghi. La relazione tra velocità di migrazione e peso molecolare non è lineare: la velocità è inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare, cioè della lunghezza). In questo modo è possibile separare frammenti di DNA a diverso peso molecolare presenti in una miscela.

Un gel di agarosio si prepara sciogliendo una certa quantità di agarosio in una soluzione tampone tramite ebollizione. La miscela, ancora calda si versa in un supporto provvisto di un pettine allo scopo di creare dei pozzetti, all'interno dei quali verrà caricato il DNA. Una volta solidificato si rimuove il pettine e si immerge il gel in una vasca elettroforetica riempita con la medesima soluzione tampone di cui è costituito il gel.

I campioni di DNA da caricare sono preparati unendo al DNA una soluzione di saccarosio e colorante "orange" per rendere più denso il campione e facilitare il successivo caricamento.

Dopo il caricamento dei campioni nei pozzetti agli estremi della vasca viene applicata una differenza di potenziale. Il gel di agarosio è colorato con un colorante fluorescente che, durante l'elettroforesi, si lega in modo stechiometrico (proporzionale alla quantità) al DNA, intercalandosi nella doppia elica. Più DNA viene caricato su gel, più colorante si legherà.

Al termine della corsa elettroforetica il DNA sarà visualizzabile illuminando il gel ai raggi UV, posizionandolo su un transilluminatore. La radiazione ultravioletta eccita il colorante che emette, per fluorescenza, radiazione luminosa fornendo una luce rossastra di intensità proporzionale alla quantità di DNA cui si è legato.

-Per valutare la **quantità** di un campione di DNA tramite l'elettroforesi è sufficiente un semplice saggio colorimetrico poiché il DNA nel gel di una elettroforesi si colora in modo proporzionale alla sua quantità. Con l'utilizzo di uno standard a concentrazione nota, caricato in quantità scalari su differenti pozzetti (es. 50, 100, 200 ng) semplicemente comparando l'intensità della colorazione del campione da valutare con quella degli standard si può risalire, in modo approssimativo, alla sua concentrazione.

-Con l'elettroforesi è anche possibile valutare l'**integrità** di un campione di DNA genomico isolato da un tessuto. Se il DNA è di buona qualità ovvero è integro, al termine della corsa elettroforetica, apparirà una banda vicino al pozzetto in cui era stato caricato, cioè il campione risulterà costituito da frammenti di lunghezza omogenea che avranno migrato poco perché costituiti da molecole di DNA ad altissimo peso molecolare. Viceversa se il DNA ottenuto dall'estrazione non è di buona qualità ovvero contiene DNA assai frammentato, al termine della corsa si presenterà come una lunga strisciata perché i frammenti di DNA di diversa lunghezza saranno migrati diversamente: in basso frammenti a basso peso molecolare che saranno migrati più velocemente, in alto, vicino al pozzetto, frammenti ad alto peso molecolare che saranno migrati più lentamente.

-E' una tecnica che permette di stimare il **peso molecolare** di un frammento di DNA, come ad esempio quello che deriva da una PCR. In un pozzetto viene caricato il frammento di DNA di cui si vuole misurare il peso molecolare, e in un pozzetto vicino viene caricato un marker di pesi molecolari ovvero una miscela di numerosi frammenti di DNA a peso molecolare noto. Al termine dell'elettroforesi, tramite un confronto con frammenti di DNA a peso molecolare conosciuto, è possibile stimare in modo approssimativo il peso molecolare del frammento di DNA da valutare.

**In pratica:**

Preparazione di un gel da 50 ml all'1% di agarosio

Agarosio: 0.5 g

Acqua: 45 ml

Si fa bollire al microonde

Si aggiungono 5 ml TAE 10 X (tris-acido acetico-edta)

Si aggiungono 2 µl di GEL RED

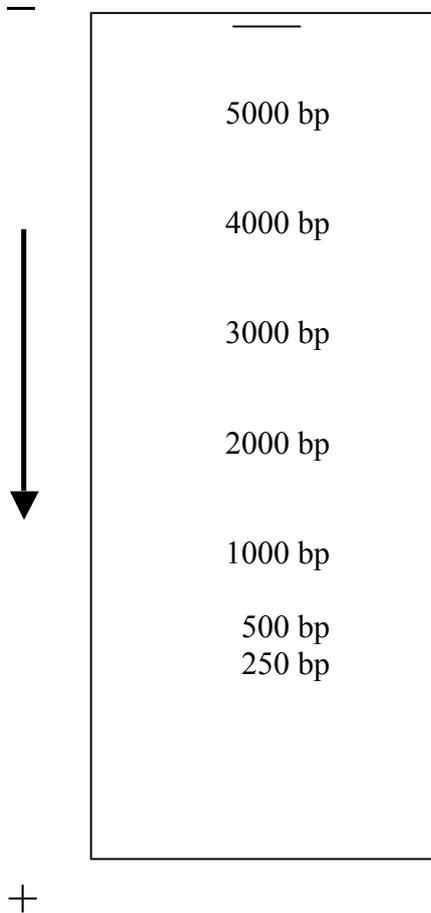
Si versa nel supporto provvisto di pettine.

Corsa elettroforetica a 50 volt (70 mA) per 30 minuti circa.

# COME MIGRA IL DNA DURANTE UNA ELETTROFORESI?

IN MODO INVERSAMENTE PROPORZIONALE AL  $\text{LOG}_{10}$  DEL PESO MOLECOLARE.

INVERSAMENTE  
PROPORZIONALE AL  
PESO MOLECOLARE



INVERSAMENTE  
PROPORZIONALE AL  
 $\text{LOG}_{10}$  DEL PESO  
MOLECOLARE

