

Task: come trasformo un buffer di digestione in un altro?

1X NEBuffer 1:
10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.0 @ 25°C

1X NEBuffer 3:
100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 2:
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 4:
20 mM Tris-acetate
50 mM potassium acetate
10 mM Magnesium Acetate
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 2:

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 3:

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

Imposto una digestione con l'enzima HindIII che taglia nel buffer 2

| | |
|----------------|-------|
| DNA | 20 ul |
| Buffer 2 10x | 5 ul |
| BSA 10x | 5 ul |
| HindIII 20u/ul | 1 ul |
| Water | 21 ul |
| <hr/> | |
| Tot | 50 ul |

Verifico che l'enzima abbia tagliato, correndo 5 ul su gel

Digerisco i 45 μ l rimasti con l'enzima PstI che taglia nel buffer 3.
 Non precipito il DNA, né lo carico su colonna, ma aumento il volume della reazione ed aggiungo altro buffer, NaCl e Tris in modo da trasformare il buffer 2 in buffer 3. Devo aggiungere altro buffer? Buffer 2 o buffer 3? Quanto?

| | | conc. finale |
|--------------------------|-------------|--------------|
| DNA digerito in buffer 2 | 45 μ l | |
| Buffer ? 10x | μ l | |
| NaCl 1M | μ l | |
| Tris HCl 1M | μ l | |
| Acqua | μ l | |
| BSA 10x | μ l | |
| Enzima PstI 20u/ μ l | μ l | |
| <hr/> | | |
| Tot | 100 μ l | |

1X NEBuffer 2:

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 3:

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

Buffer 3

Buffer 2

Cosa manca?

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl

-

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

=

1X NEBuffer 2:

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

1X NEBuffer 3:

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

Buffer 3

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl

-

Buffer 2

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl

=

Cosa manca?

50 mM NaCl
40 mM Tris-HCl

Soluzione A:

1-aggiungo altro buffer 2 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 100 ul totali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | ul | conc finale |
|--------------------------|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | 45 ul | |

Soluzione A:

1-aggiungo altro buffer 2 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 100 ul totali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|-----|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 2 | 10x | 5,5 ul | 1x |

Soluzione A:

1-aggiungo altro buffer 2 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 100 ul totali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|--------|--------|-------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 2 | 10x | 5,5 ul | 1x |
| NaCl | 1M | | 50 mM |
| Tris HCl | 1M | | 40 mM |
| Acqua q.b. a 100ul | | | |
| BSA | 10x | | 1x |
| Enzima PstI | 20u/ul | | 20 u |
| ----- | | | |
| Tot | | 100 ul | |

- $1000\text{mM}:50\text{mM} = 20 =$ fattore di diluizione
- $1000\text{mM}:40\text{mM} = 25 =$ fattore di diluizione

Soluzione A:

1-aggiungo altro buffer 2 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 100 ul totali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|--------|--------|-------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 2 | 10x | 5,5 ul | 1x |
| NaCl | 1M | 5 ul | 50 mM |
| Tris HCl | 1M | 4 ul | 40 mM |
| Acqua q.b. a 100ul | | 34 ul | |
| BSA | 10x | 5,5 ul | 1x |
| Enzima PstI | 20u/ul | 1 ul | 20 u |
| ----- | | | |
| Tot | | 100 ul | |

* NaCl - $1000\text{mM}:50\text{mM} = 20 = \text{fattore di diluizione}$ $100\text{ul}:20=5 \text{ ul}$

* Tris HCl - $1000\text{mM}:40\text{mM} = 25 = \text{fattore di diluizione}$ $100\text{ul}:25=4 \text{ ul}$

Soluzione B:

1-aggiungo buffer 3 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 45 ul iniziali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | ul | conc finale |
|--------------------------|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | 45 ul | |

Soluzione B:

1-aggiungo buffer 3 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 45 ul iniziali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|-----|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 3 | 10x | 5,5 ul | 1x |

Soluzione B:

1-aggiungo buffer 3 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 45 ul iniziali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|--------|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 3 | 10x | 5,5 ul | 1x |
| NaCl | 1M | | 50 mM |
| Tris HCL | 1M | | 40 mM |
| Acqua q.b. a 100ul | | | |
| BSA | 10x | | 1x |
| Enzima PstI | 20u/ul | | 20 u |
| ----- | | | |
| Tot | | 100 ul | |

*1000mM:50mM=20 = fattore di diluizione

*1000mM:40mM=25 = fattore di diluizione

Soluzione B:

1-aggiungo buffer 3 nei restanti 55 ul che devo aggiungere

2-trasformo i 45 ul iniziali (che sono in buffer 2) in buffer 3*

| Stock | | ul | conc finale |
|--------------------------|--------|-----------|--------------------|
| DNA digerito in buffer 2 | | 45 ul | |
| Buffer 3 | 10x | 5,5 ul | 1x |
| NaCl | 1M | 2,25 ul | 50 mM |
| Tris HCl | 1M | 1,8 ul | 40 mM |
| Acqua q.b. a 100ul | | 38,95 ul | |
| BSA | 10x | 5,5 ul | 1x |
| Enzima PstI | 20u/ul | 1 ul | 20 u |
| ----- | | | |
| Tot | | 100 ul | |

*NaCl - $1000\text{mM}:50\text{mM}=20$ (fattore di diluizione) $45\text{ul}:20=2,25$ ul

*Tris HCl - $1000\text{mM}:40\text{mM}=25$ (fattore di diluizione) $45\text{ul}:25=1,8\text{ul}$