

Tecniche per lo studio molecolare dei geni e dell'espressione genica

- Separazioni molecolari: elettroforesi su gels
- Cromatografia
- Ibridazione di acidi nucleici
- Le tecniche di amplificazione: PCR, LCR e NASBA
- Fingerprint
- EMSA e Footprinting
- Sequenziamento DNA

Metodi di marcatura degli acidi nucleici

Ibridazione del DNA: sonde genetiche

Le sonde genetiche possono essere marcate usando isotopi radioattivi come ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I e ^3H . Il rilevamento viene effettuato con autoradiografia (l'esposizione diretta di una pellicola alle particelle beta o ai raggi gamma) o contatori Geiger.

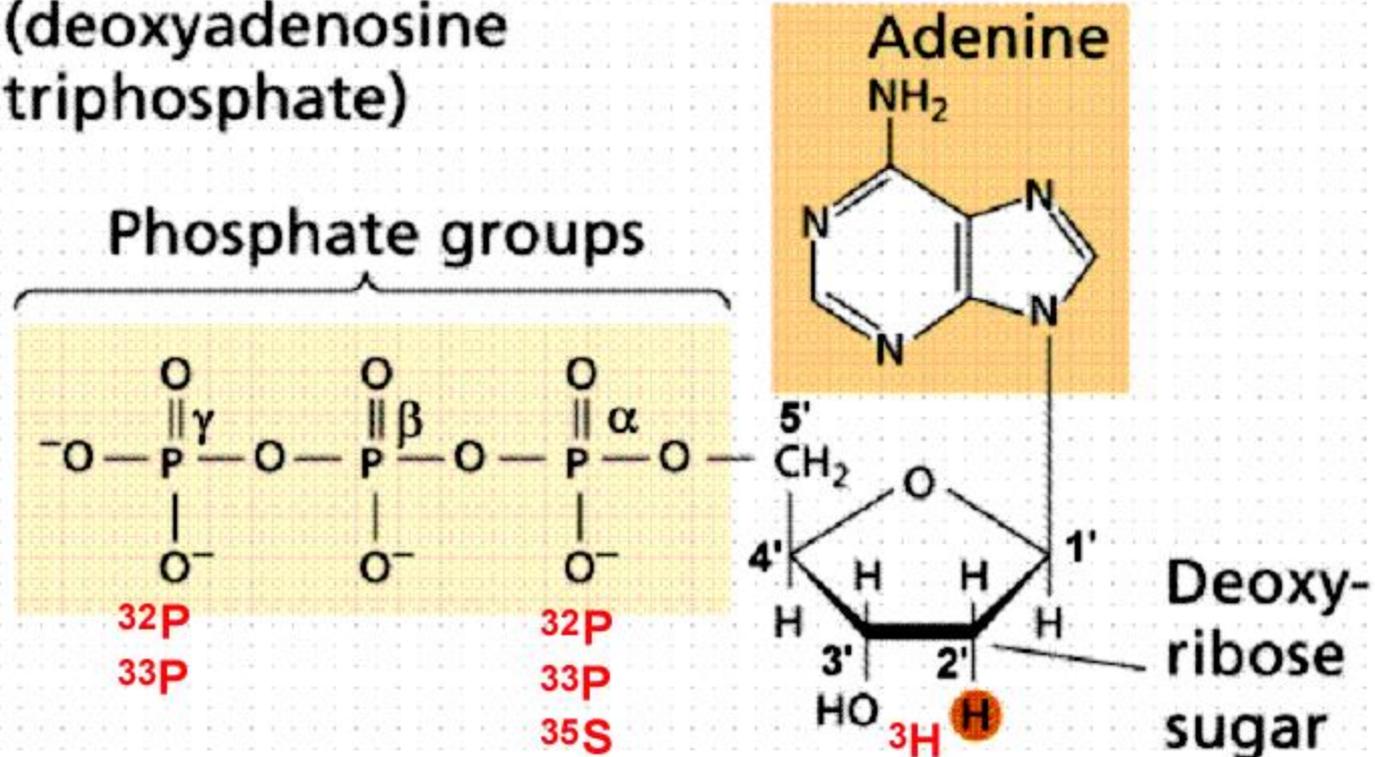
Le sonde radiomarcate sono i più comuni metodi di marcatura, anche se sono i meno popolari a causa della loro scarsa sicurezza. Il loro uso dipende dalla loro elevata sensibilità, ossia dalla capacità di rilevare anche minime concentrazioni del complesso sonda-target (una singola coppia di geni in 0.5 μg di DNA).

Le marcature non radioattive sono più sicure ma meno sensibili e non richiedono stanze dedicate particolari apparecchiature e personale specializzato, ma sono in genere molto meno sensibili.

Traccianti utilizzati

Nucleotidi marcati con isotopi radioattivi

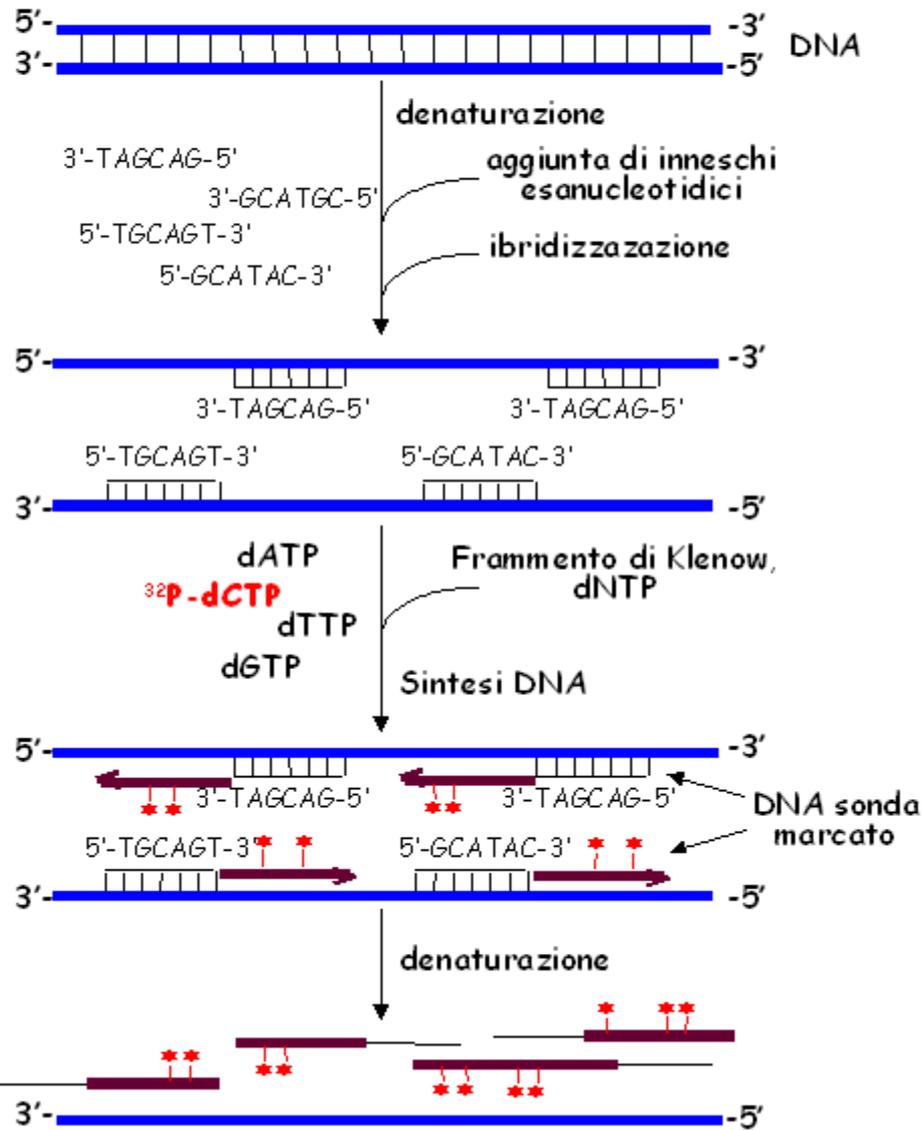
Deoxy-ATP
(deoxyadenosine triphosphate)



MARCATURA delle SONDE OLIGONUCLEOTIDICHE

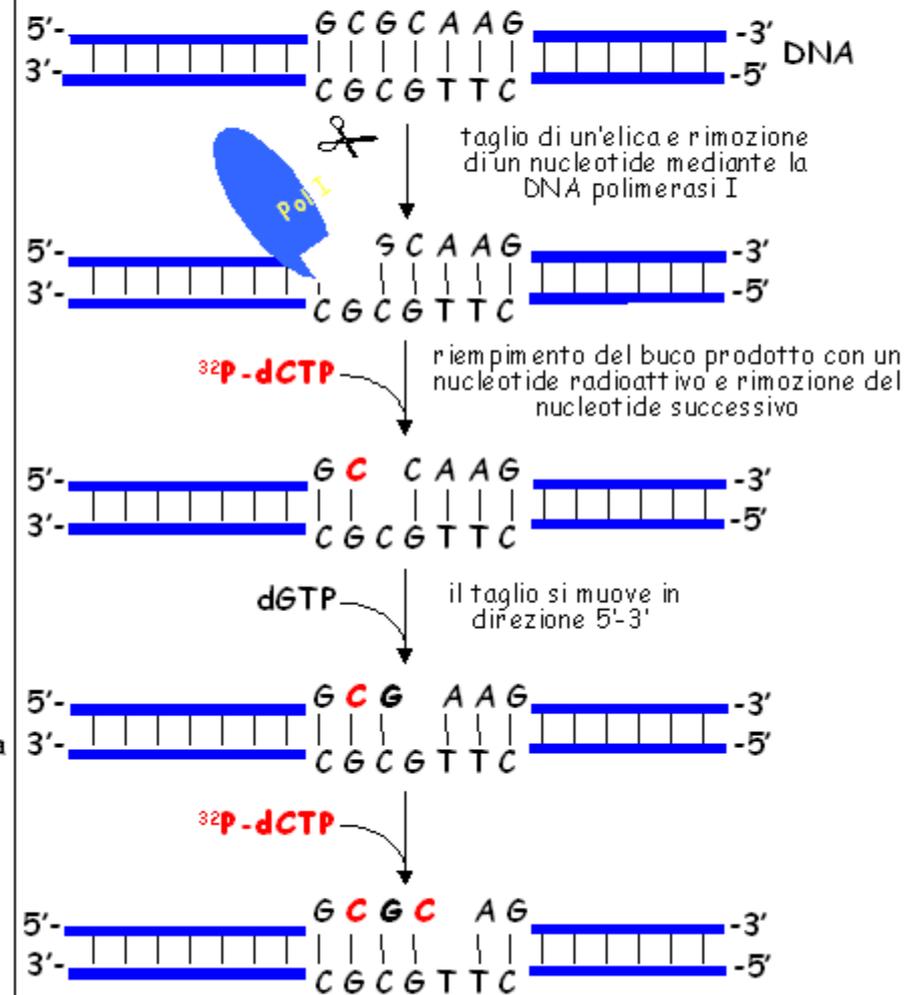
RANDOM PRIMING

Metodo dell'innescio casuale

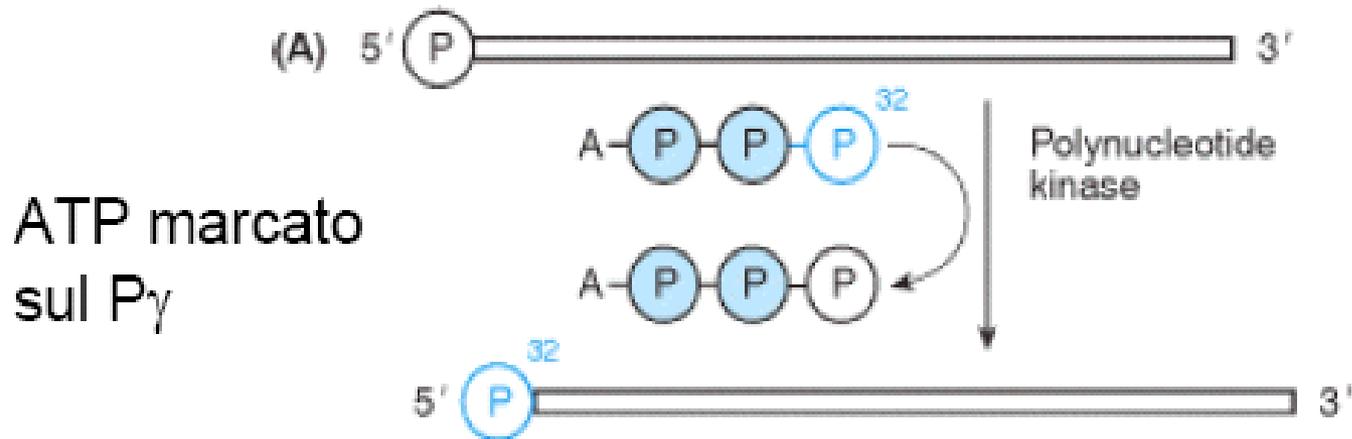


NICK TRANSLATION

Spostamento dell'incisione

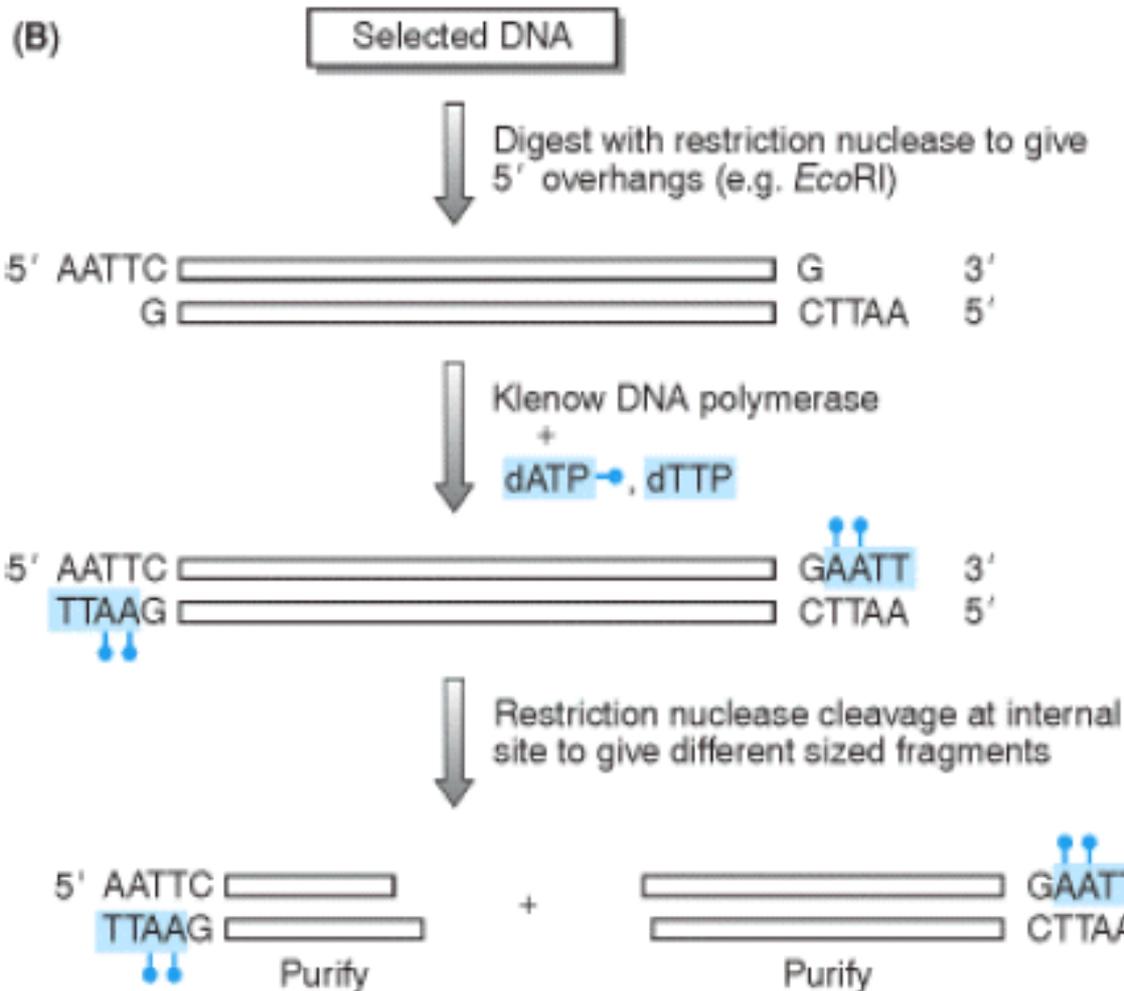


Marcatura sonda



Marcatura al 5' in presenza di nucleotidi marcati con sostanze radioattive (^{32}P) sul fosfato γ (tipico per sonde DB)

Marcatura sonda



Marcatura al 3' in presenza di nucleotidi marcati con sostanze radioattive (^{32}P) (tipico per sonde DB)

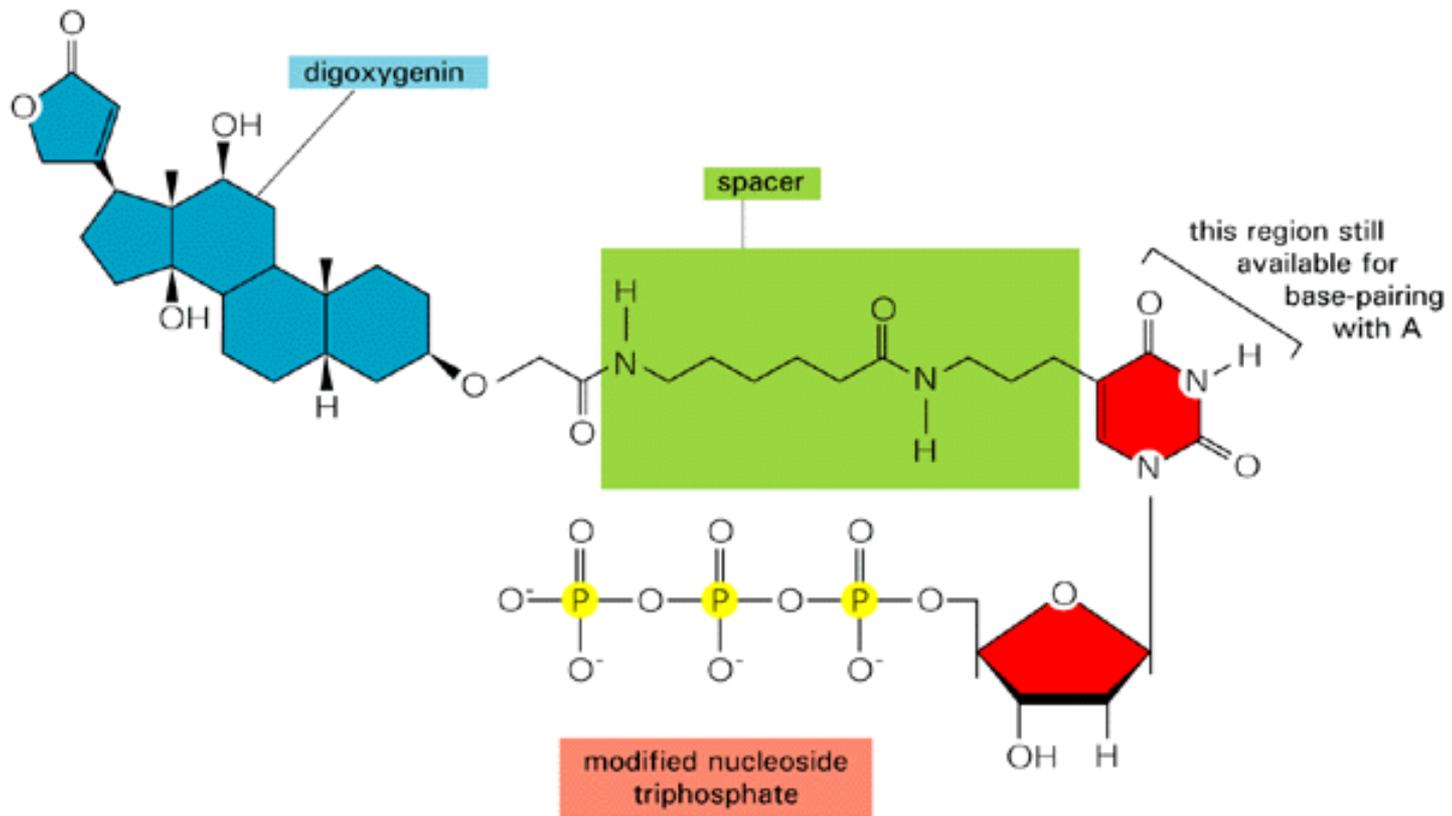
Ibridazione del DNA: sonde non radioattive

Alcuni esempi di sonde radioattive sono:

- **Biotina:** questa sostanza può essere evidenziata usando avidina o streptavidina che possiede una alta affinità per la biotina
- **Enzimi:** l'enzima viene legato alla sonda e la sua presenza viene rilevata da una reazione con un substrato che cambia colore. Esempi di enzimi sono la fosfatasi alcalina e le perossidasi
- **Chemiluminescenza:** In questo metodo si ancorano alla sonda molecole chemiluminescenti che si rilevano dalla loro emissione di luce usando un luminometro
- **Fluorescenza:** vengono ancorate alla sonda molecole che danno fluorescenza alla luce UV. Questo tipo di marcatura è specialmente utile per l'esame diretto di reperti microbiologici o citologici al microscopio; tale metodica è nota come ibridazione per fluorescenza in situ.
- **Anticorpi:** un antigene è accoppiato alla sonda e la sua presenza è rilevata da uno specifico anticorpo. Particolarmente utile per rilevare complessi DNA-RNA.

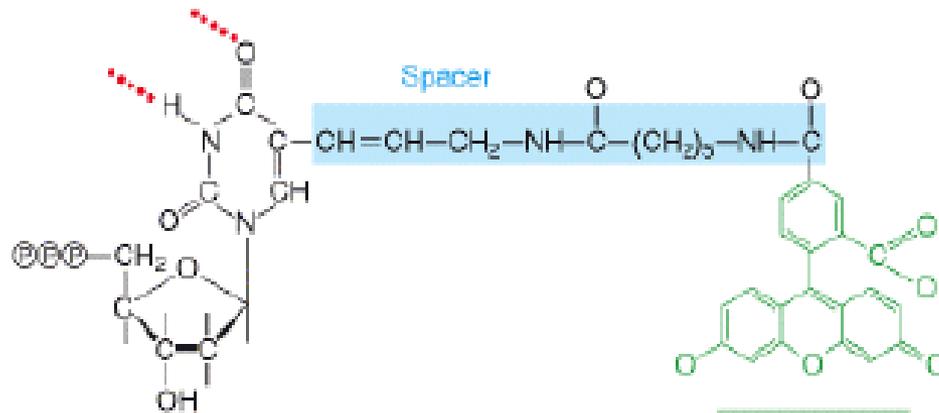
Traccianti utilizzati

Nucleotidi marcati con sostanze non radioattive

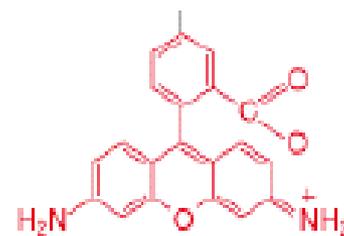


FLUOROFORI

(A)

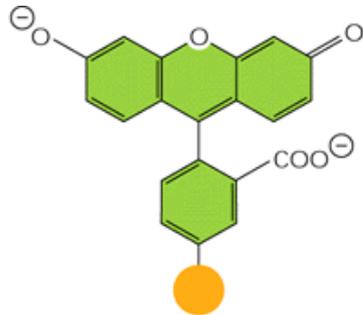


Fluorescein

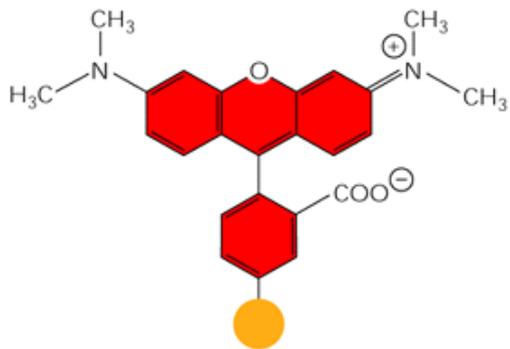


Rhodamine

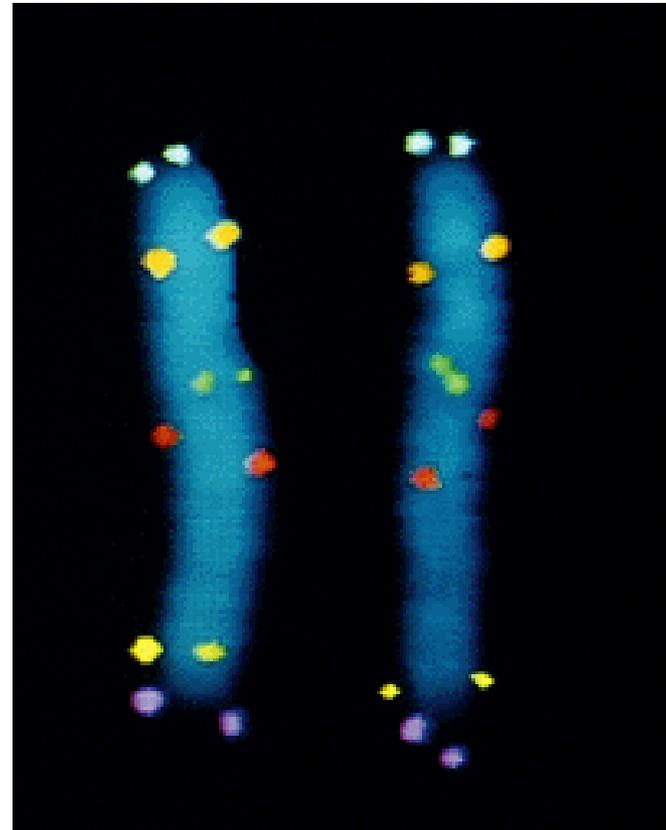
Traccianti utilizzati



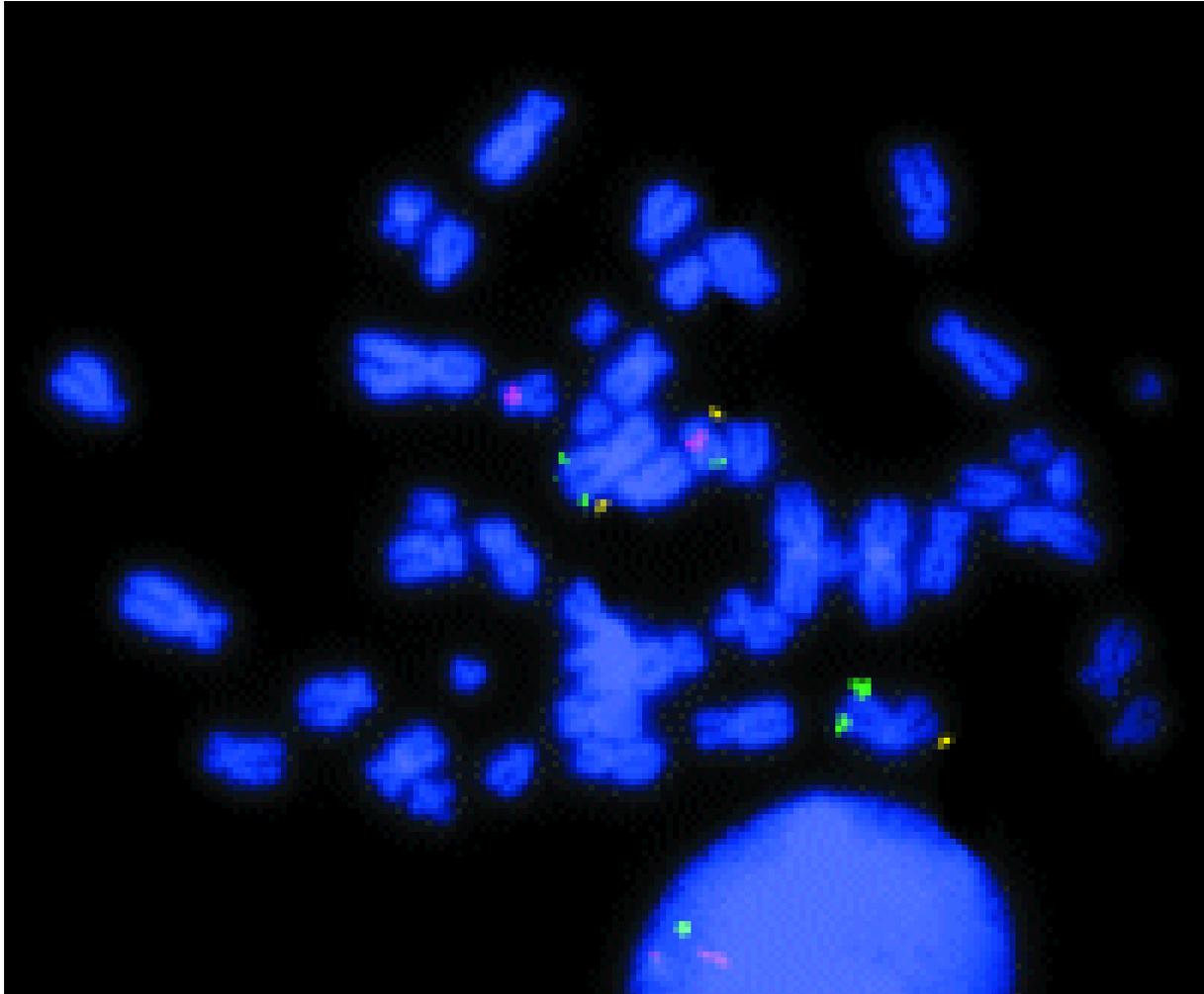
fluorescein (green)



tetramethylrhodamine (red)



Esempio di ibridazione: FISH (fluorescent in situ hybridization)



CONFRONTO SISTEMI DI MARCATURA RADIOATTIVI/ NON RADIOATTIVI

I sistemi radioattivi hanno maggior sensibilità

Richiedono luoghi dedicati per la preparazione ed uso

Richiedono un appropriato smaltimento

Richiedono un permesso specifico per il loro uso ed un addestramento appropriato dell'operatore

Potenzialmente dannosi per l'operatore

SAGGI DI IBRIDAZIONE STANDARD E SAGGI INVERSI

- STANDARD **bersaglio** non marcato legato a supporto solido, **sonda** marcata in soluzione

DOT-BLOT

SOUTHERN BLOT

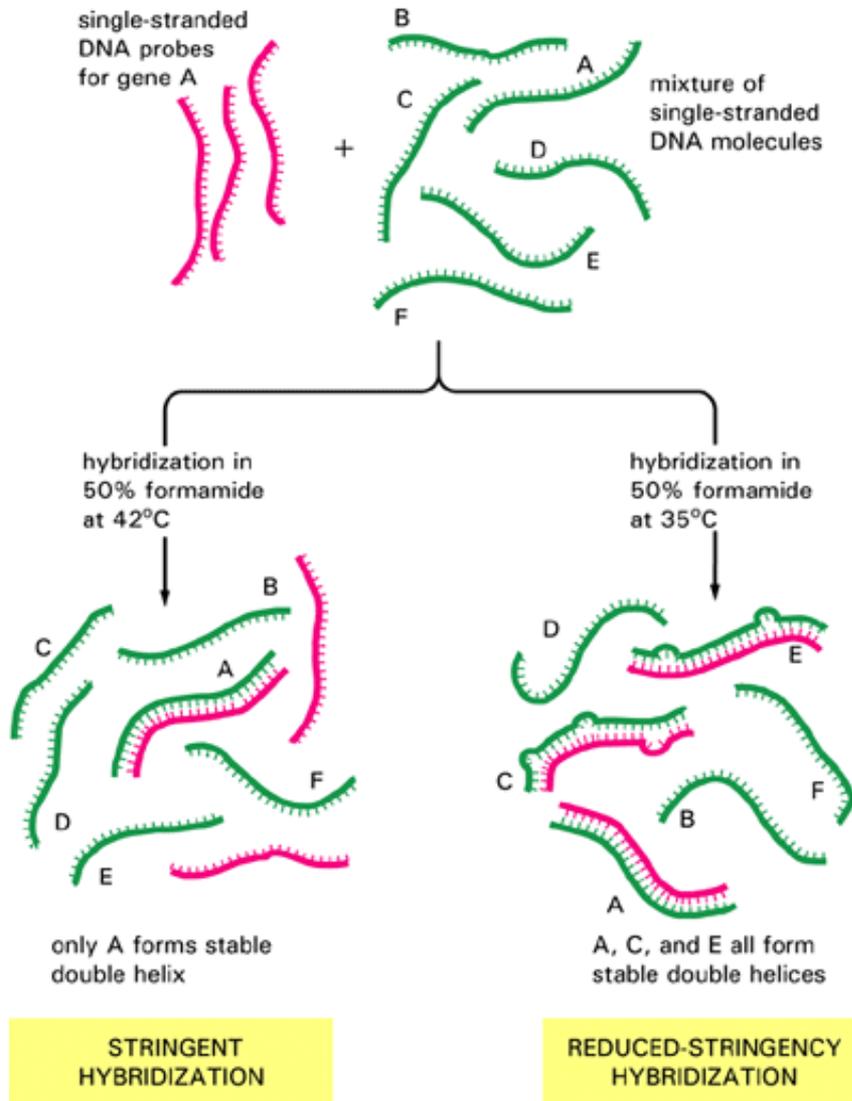
NORTHERN BLOT

IBRIDAZIONE IN SITU SU TESSUTO
O CROMOSOMI

- INVERSI (MARCATURA DEL TARGET) **sonda** non marcata legata a supporto solido, **bersaglio** marcato in soluzione

MICROARRAY

Le Tecniche di ibridazione



In condizioni opportune di temperatura e forza ionica (stringenza) si possono ottenere anche delle eliche in cui sono tollerati degli appaiamenti non perfetti

Ibridazione : mescolare target e sonda

Southern & Northern blotting

Dopo frazionamento degli acidi nucleici per elettroforesi, questi vengono trasferiti su una membrana a cui viene aggiunto la sonda. La presenza del target è rilevata dalla presenza della sonda sulla membrana (ad esempio per autoradiografia) e si può risalire alla posizione del target ibridizzato nel gel originale

Il Northern blotting si usa per l'analisi dell'RNA

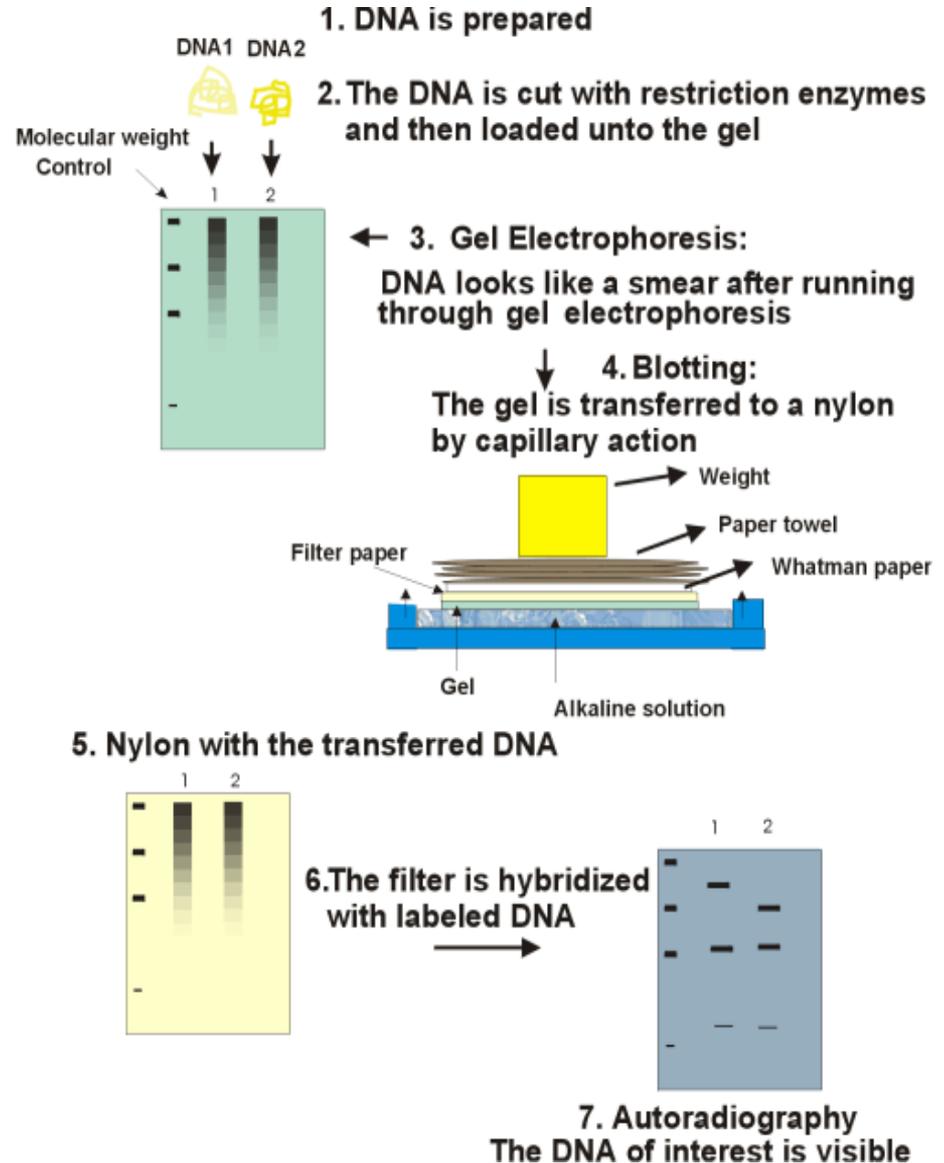
Il Southern blotting si usa per l'analisi del DNA

Trasferimento di acidi nucleici (Blotting)

- **Southern**
- **Northern**

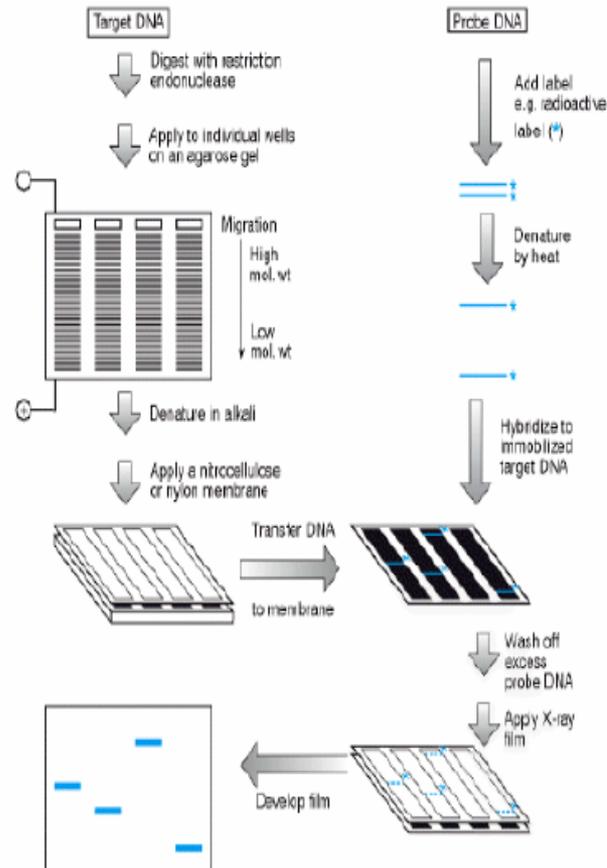
il Southern Blotting

- Il DNA genomico è frammentato con opportuni enzimi di restrizione.
- I frammenti di restrizione di diversa lunghezza sono separati su gel di agarosio.
- I frammenti sono denaturati in filamenti singoli e trasferiti per capillarità su una membrana (blot), un supporto solido.
- I frammenti di DNA legati alla membrana sono incubati con una sonda marcata.
- La sonda ibridizza con specifici frammenti di DNA di sequenza ad essa complementare.
- L'ibrido molecolare viene riconosciuto tramite le proprietà di marcatura della sonda (es. tramite esposizione autoradiografica)



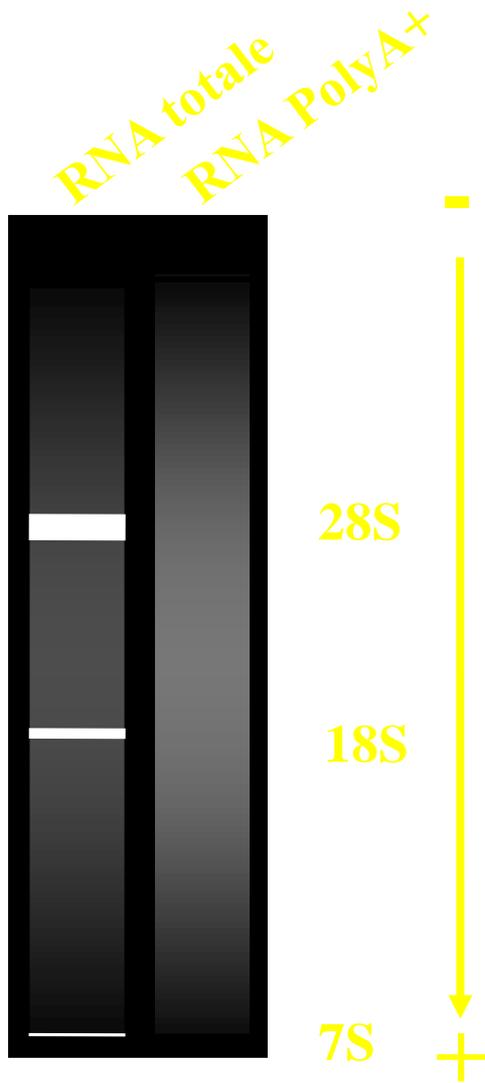
SOUTHERN BLOT

-DNA BERSAGLIO DIGERITO CON ENDONUCLEASI DI
RESTRIZIONE



Come si fa a vedere se un gene è espresso?

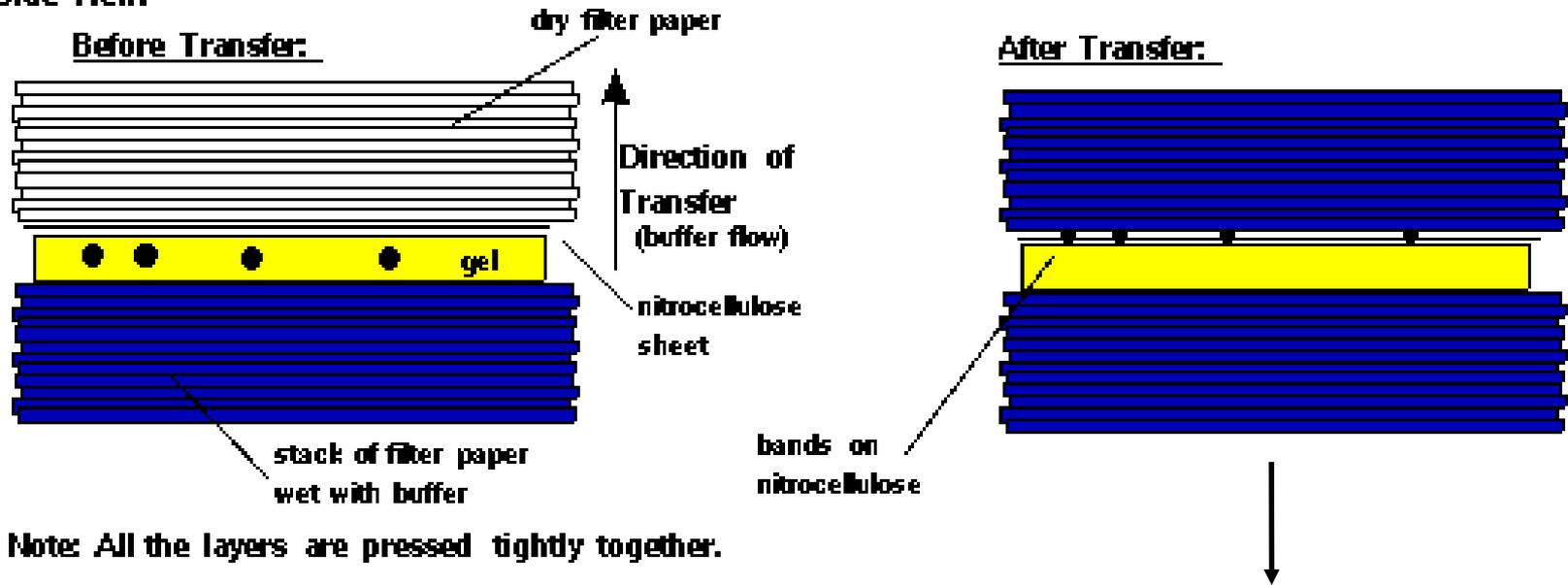
Northern Blotting



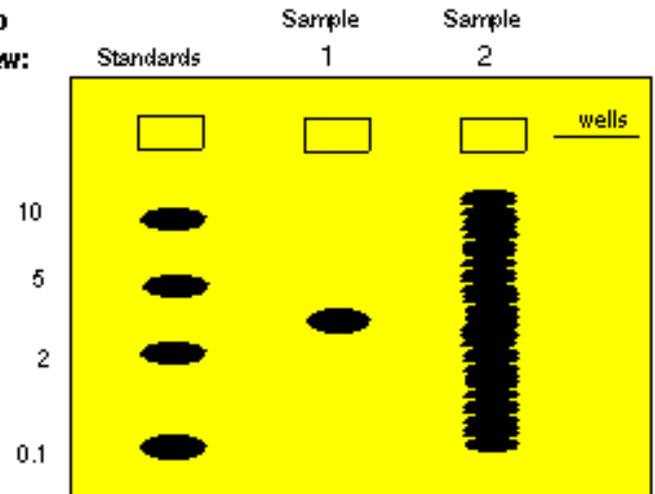
- L'RNA (totale o poly-A+) viene frazionato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio deneturante (il gel contiene formaldeide, e prima della corsa i campioni vengono denaturati in formamide). Questo è necessario per far sì che le molecole di RNA si separino in base al loro peso molecolare, e non in base alla forma. Dopo la corsa si procede come per il Southern blot.

Northern Blotting

Side View:

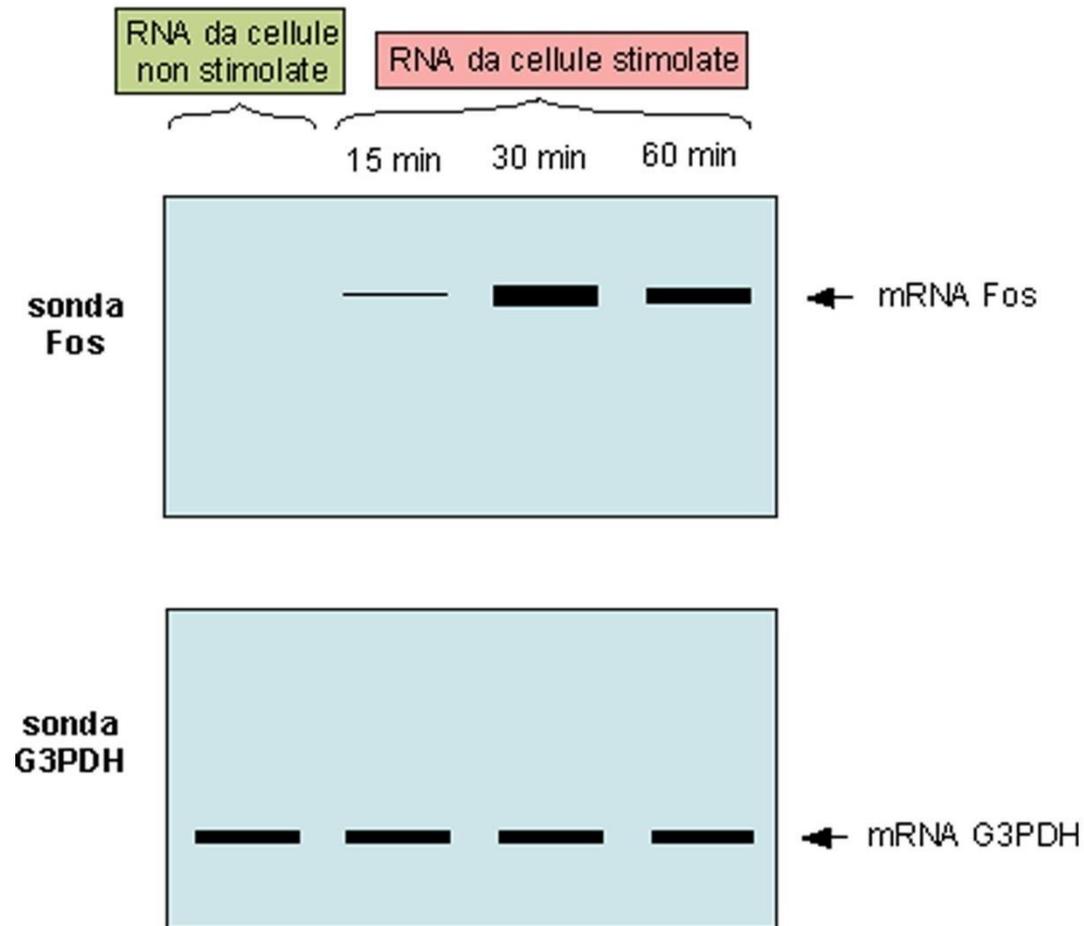


Top View:



Analisi di espressione con Northern blot

Schema esperimento di analisi di espressione mediante Northern blot



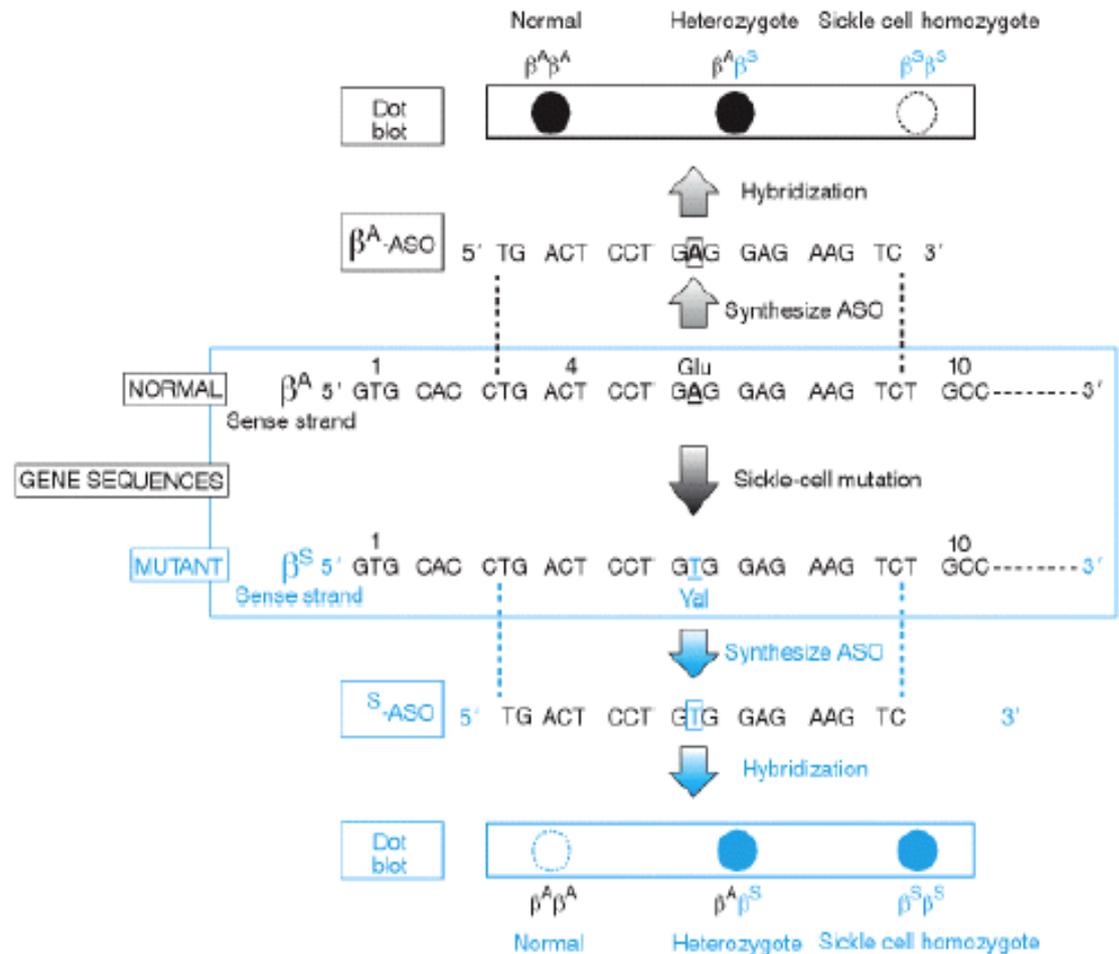
Caratteristiche del Northern Blotting

- **Tecnica non particolarmente sensibile. La sensibilità può essere aumentata notevolmente se invece dell'RNA totale si usa l'RNA poly-A. Infatti il quantitativo di RNA che si può caricare su un gel di agarosio è 50 µg. Se invece di caricare RNA totale carico un uguale quantitativo di poly-A, posso avere un segnale fino a 50 volte maggiore.**
- **L'uso di mRNA purificato elimina anche la possibilità di ibridazione non-specifica con l'rRNA.**
- **Può essere applicata alla misurazione dell'espressione di un singolo gene**
- **Oltre a misurare i livelli di espressione permette di valutare il peso molecolare dei trascritti, e consente di caratterizzare eventuali isoforme alternative .**
- **Questa tecnica richiede che l'RNA sia il più integro possibile. Anche solo una rottura per molecola di mRNA determina una forte riduzione del segnale specifico.**

DOT-BLOT

- GOCCIA DI DNA CROMOSOMICO SU FILTRO DI NYLON O NITROCELLULOSA->SONDA MARCATA
- SI POSSONO DISCRIMINARE VARIANTI ALLELICHE (ASO) e patologiche-> anemia falciforme
- oligosonda

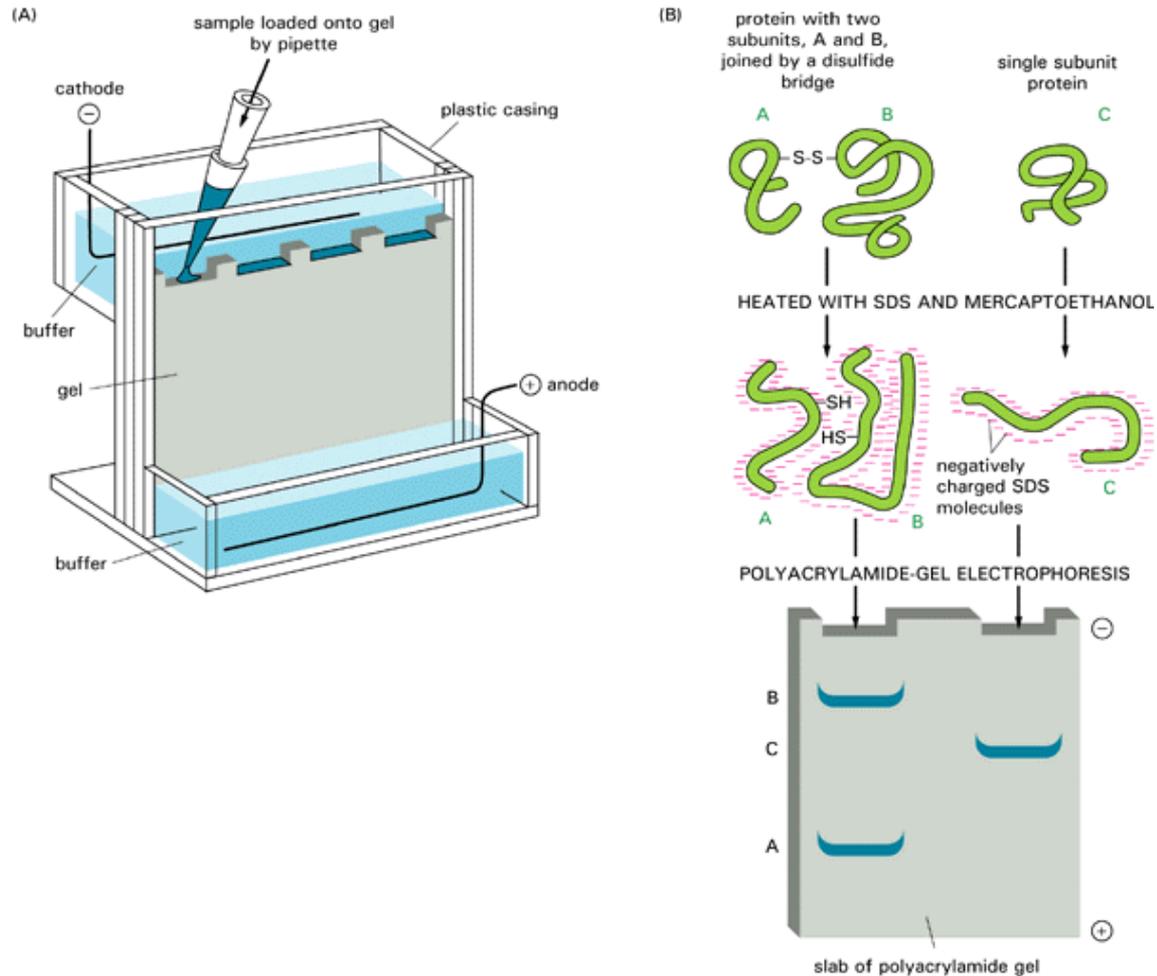
Basate su appaiamento perfetto



Misurazione espressione a livello della proteina

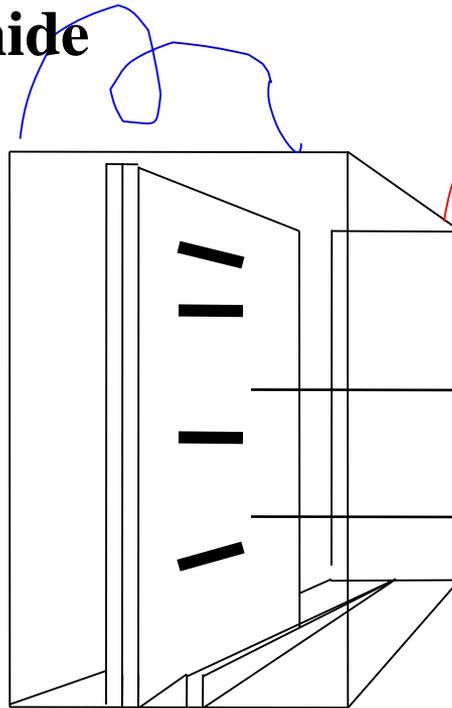
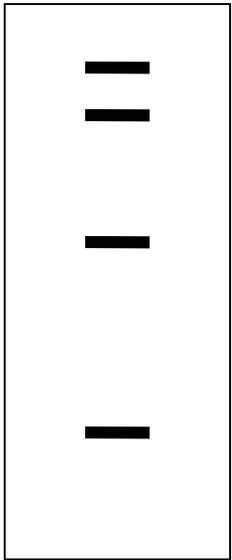
Western Blotting

SDS-PAGE

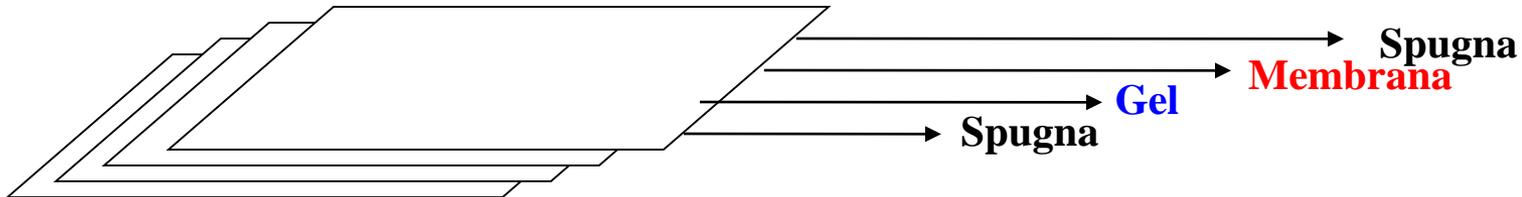
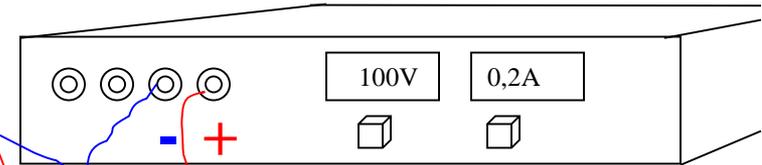


Western blotting

1. Gel di poliacrilamide in SDS



3. Elettroblotting

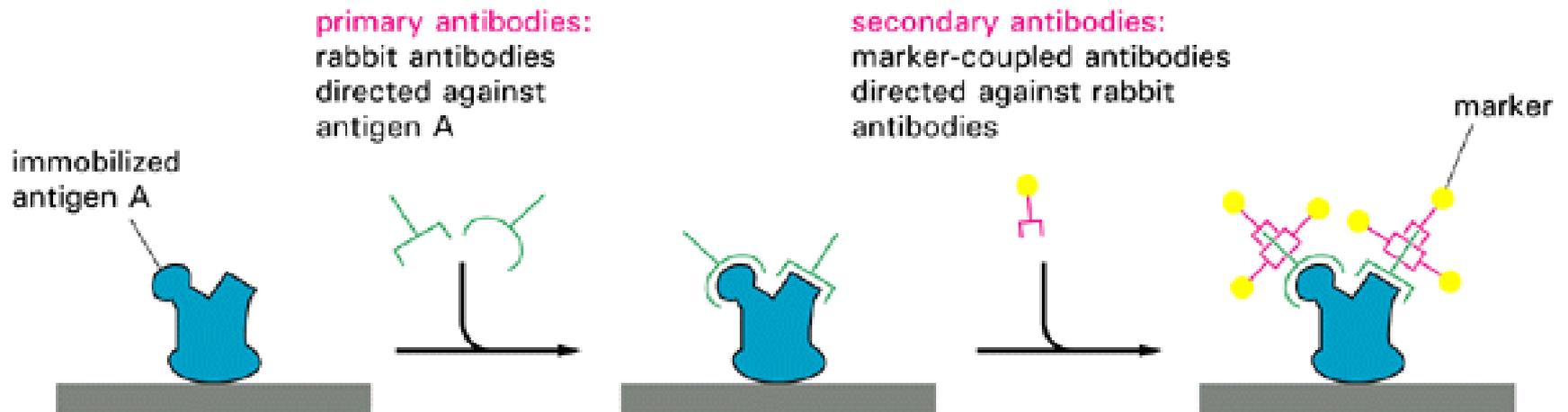


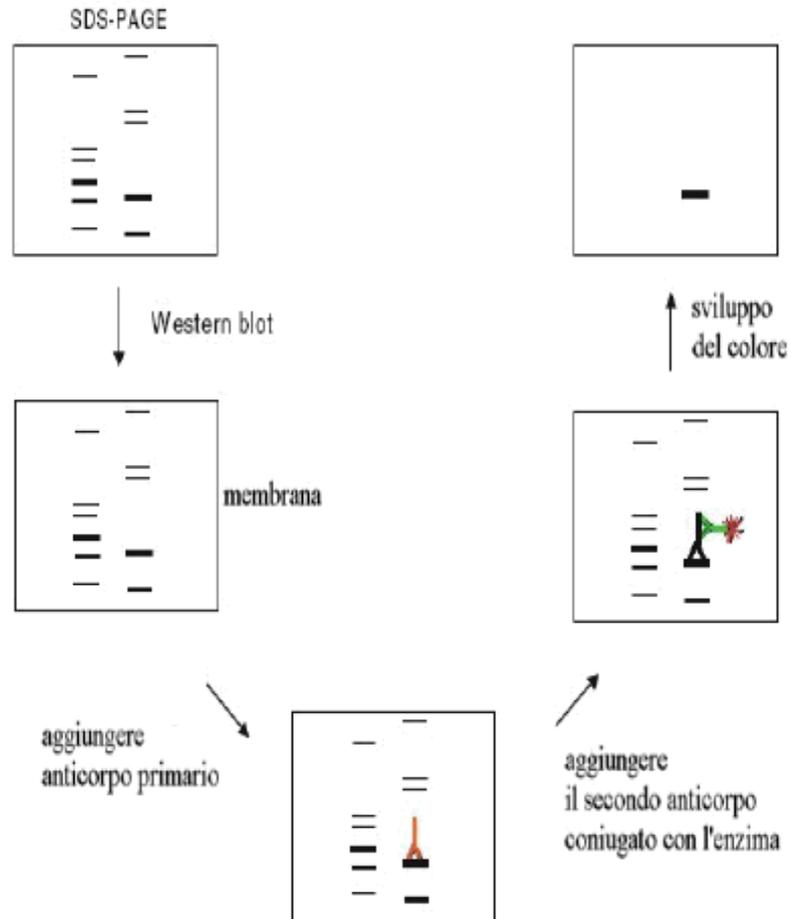
2. Preparazione del "sandwich"

Misurazione espressione a livello della proteina

Western Blotting

Immunodetection

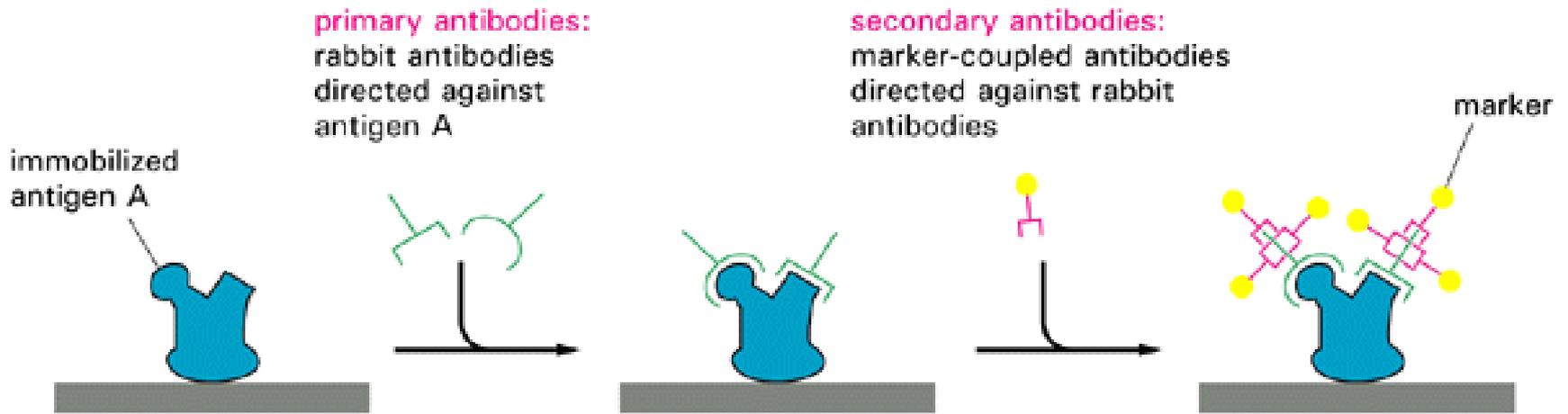




Misurazione espressione a livello della proteina

Western Blotting

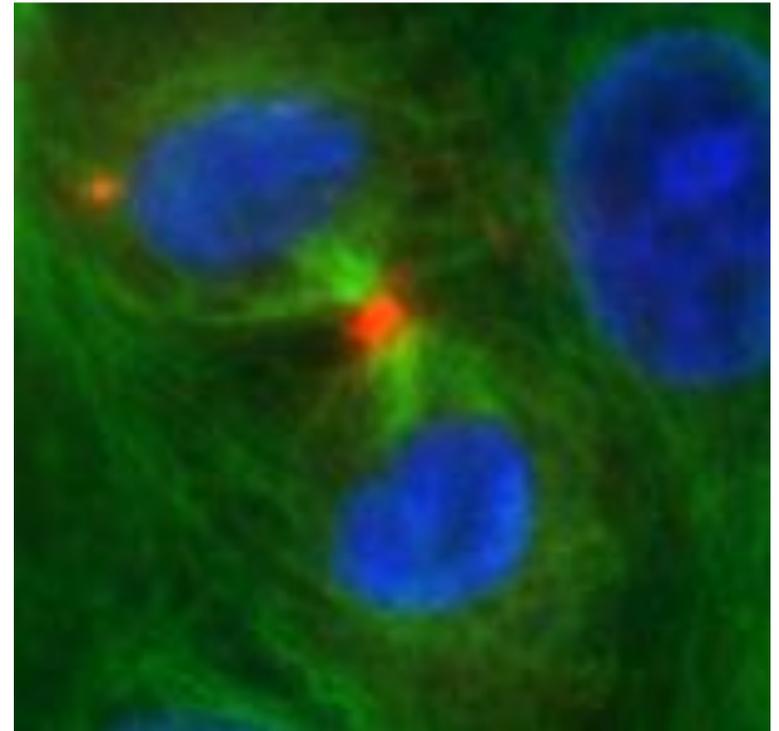
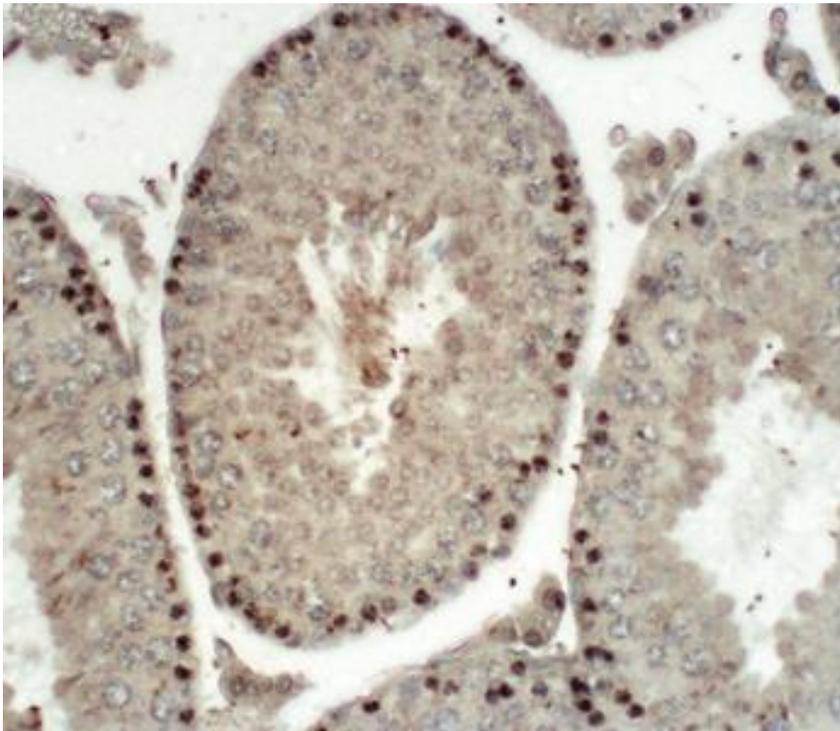
Immunodetection



Misurazione espressione a livello della proteina

Immunofluorescenza ed immunoistochimica

Permettono di valutare in quali cellule e in quali strutture subcellulari sono localizzate le proteine

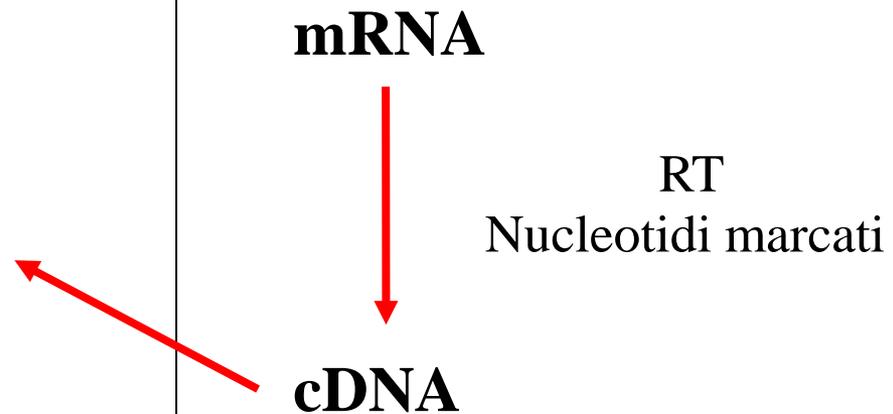
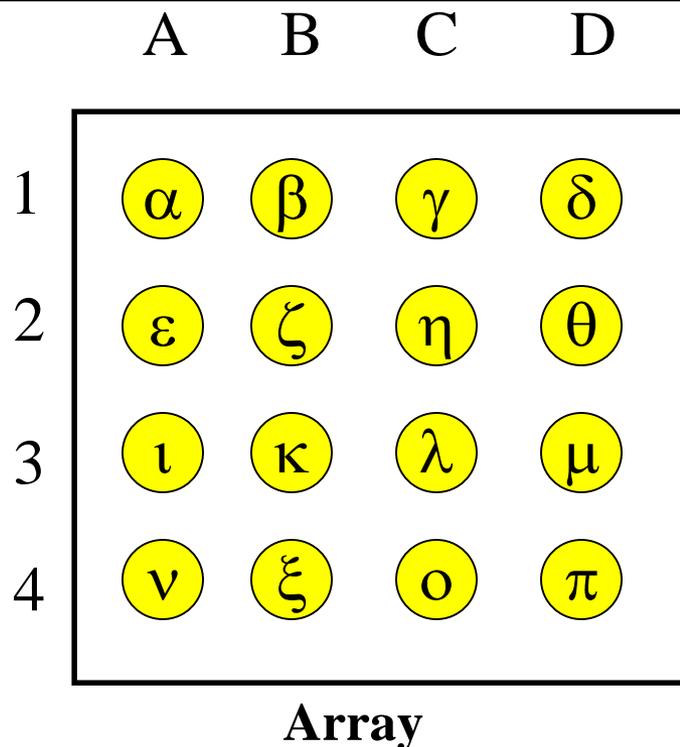


Saggi di ibridazione inversa

Sia i macroarrays che i microarrays sono stati sviluppati per soddisfare l'esigenza di misurare contemporaneamente l'espressione di più geni. Entambe le tecnologie si basano sullo stesso principio:

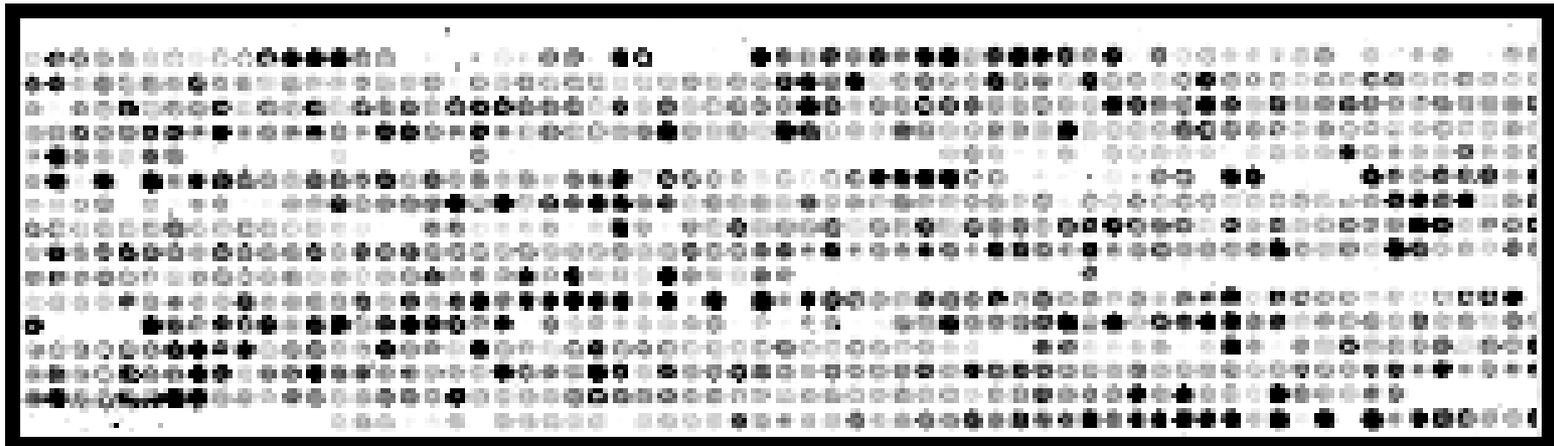
1. Come sonda si usano oligonucleotidi o molecole di cDNA non marcati, immobilizzati in posizioni precise di un supporto solido

2. L'array viene ibridizzato con una miscela complessa di molecole marcate rappresentative dell'mRNA espresso dalle cellule in esame



Macrorray

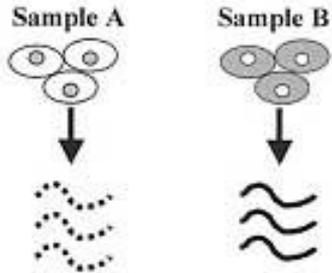
- Le molecole sonda vengono legate a membrane di nylon
- Come tracciante viene utilizzata la radioattività
- Analisi di qualche decina o poche centinaia di geni



Microrray di cDNA (o di oligonucleotidi lunghi)

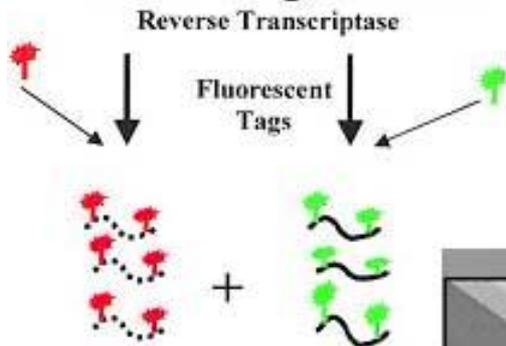
- **Le molecole sonda sono cDNA o oligonucleotidi lunghi 70-80 paia di basi, sintetizzati tradizionalmente e legati ad un vetrino da microscopio per mezzo di un processo di stampa a getto.**
- **Su ogni vetrino trovano posto fino a 10000 geni.**
- **Metodica che si usa per comparare le differenze di espressione genica tra due campioni.**

A. RNA Isolation

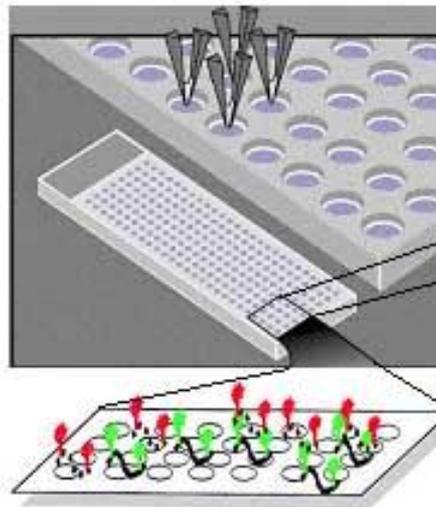


B. cDNA Generation

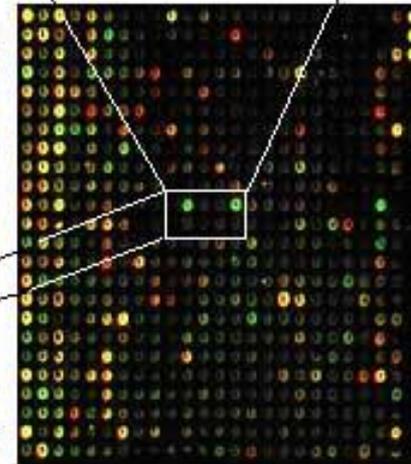
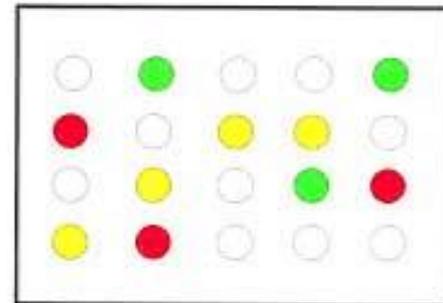
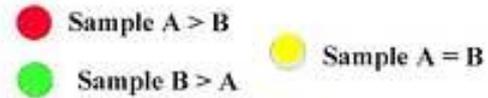
C. Labeling of Probe



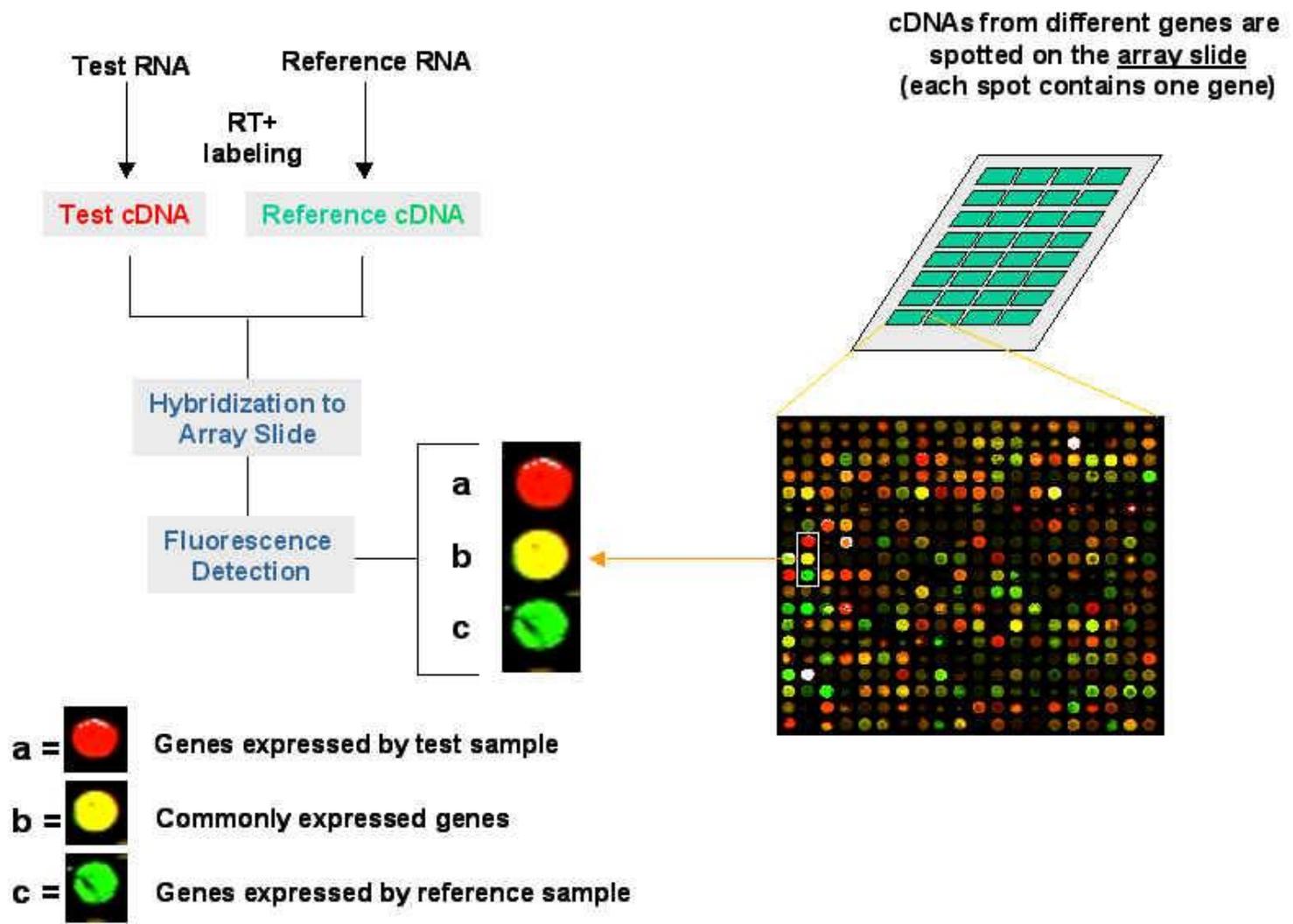
D. Hybridization to Array



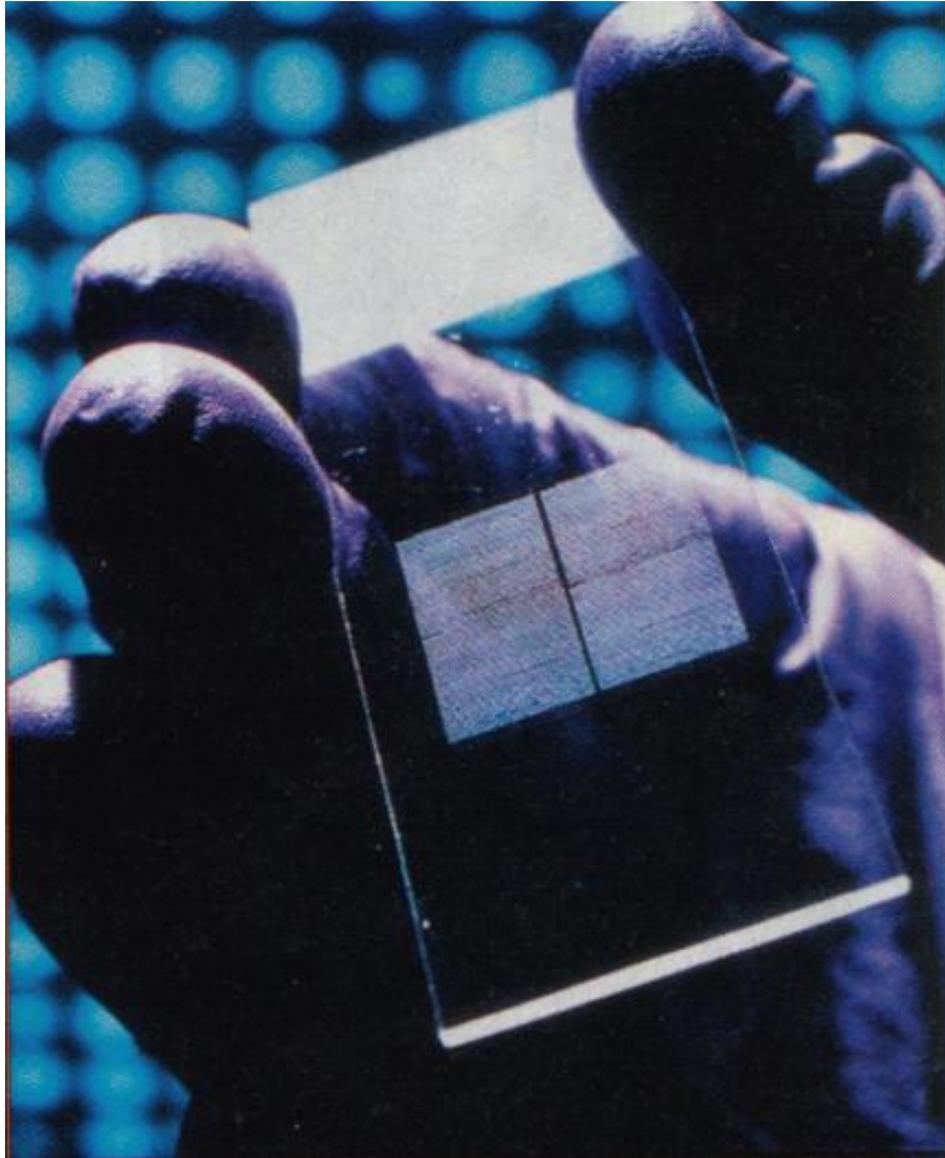
E. Imaging



Principle of cDNA-based arrays

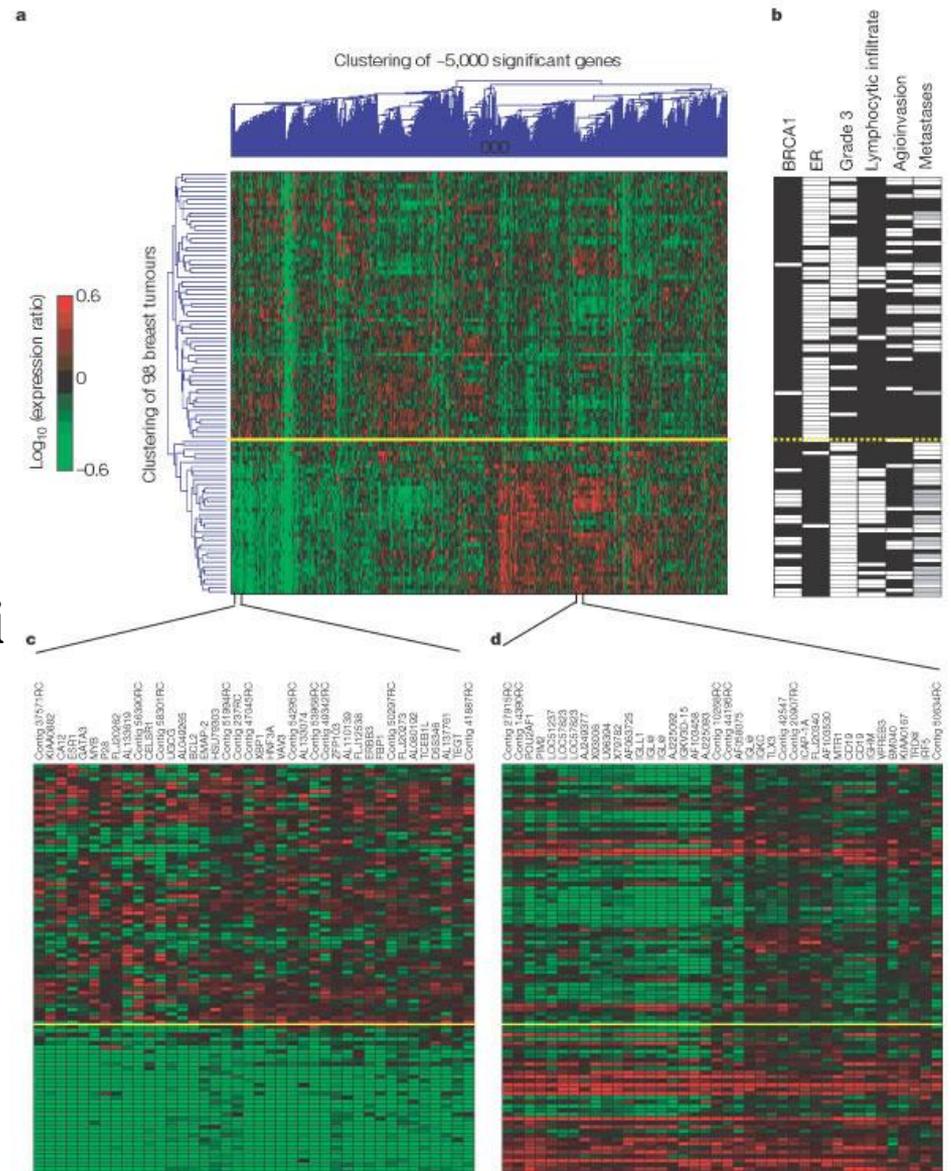


cDNA Microarray



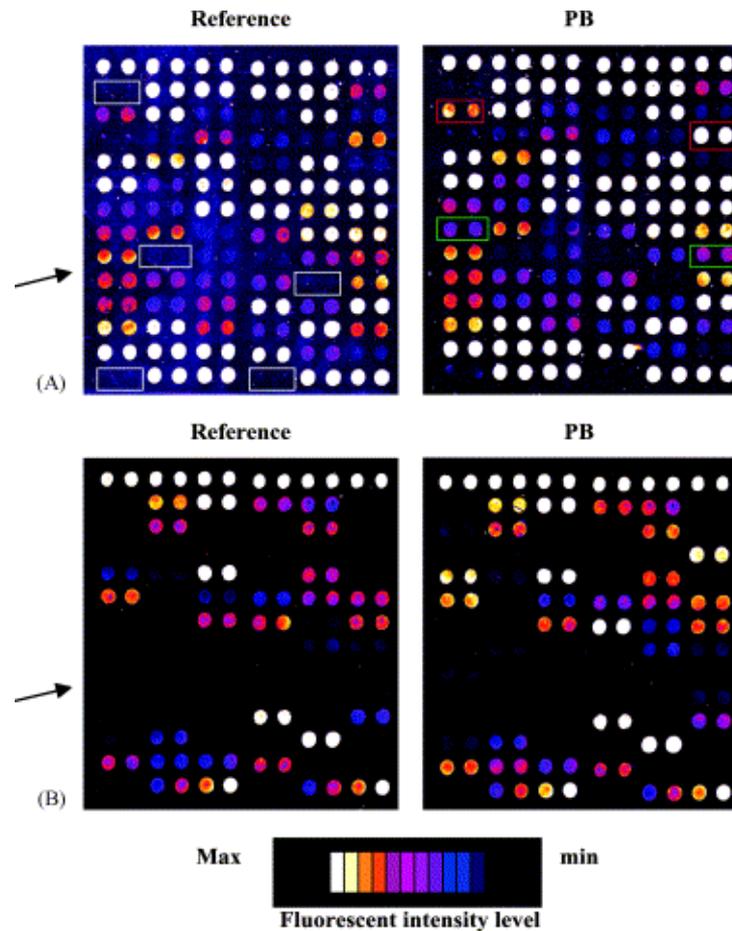
Applicazioni

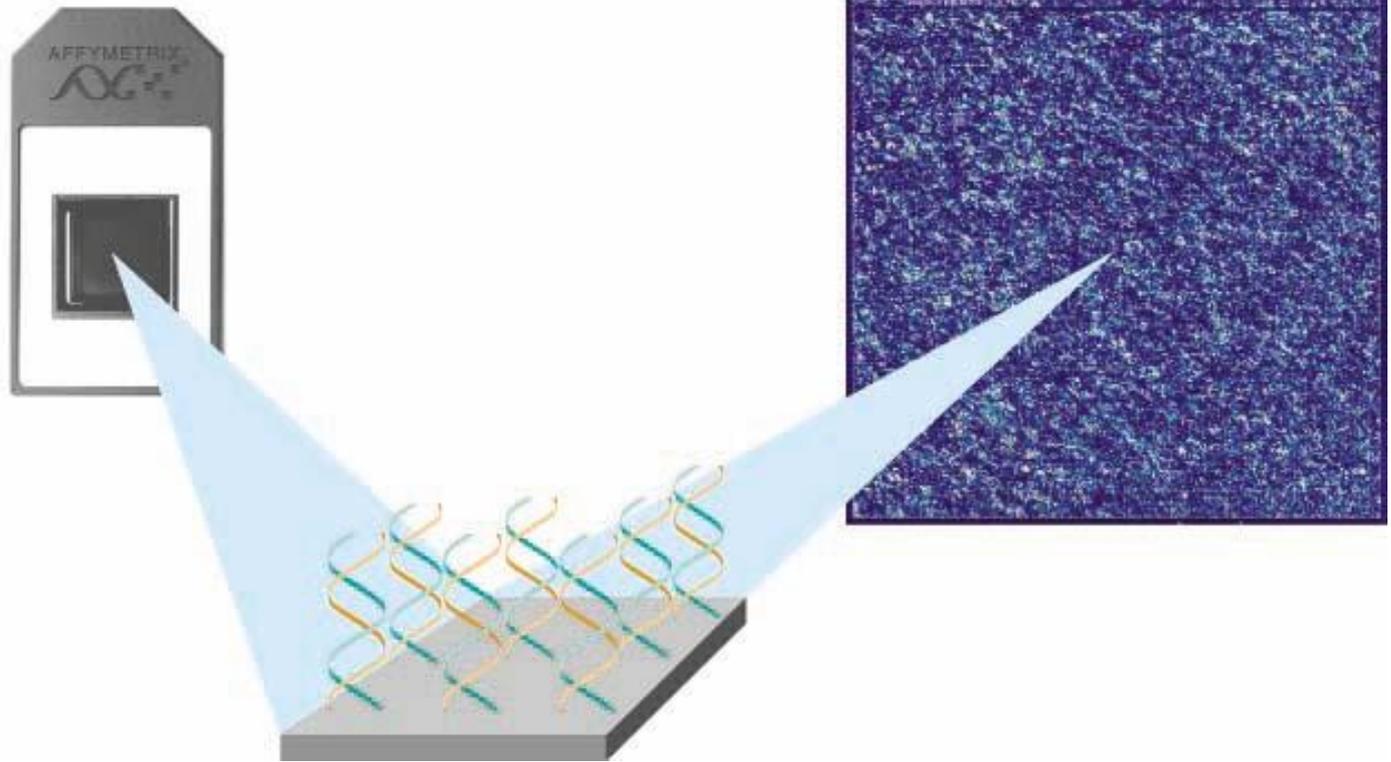
Definizione delle basi molecolari e identificazione di nuovi markers prognostici per neoplasie e altre patologie



Applicazioni

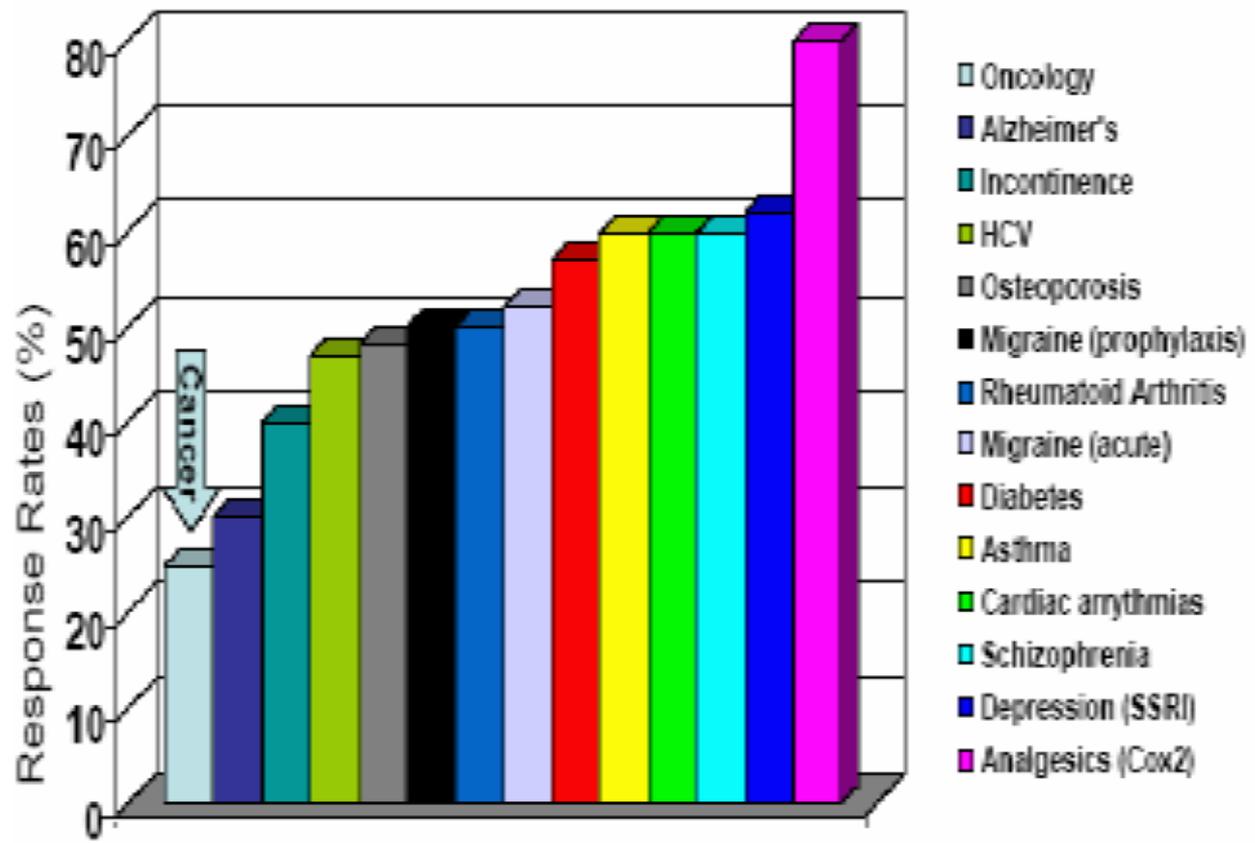
Farmacogenomica e tossicogenomica





From Affymetrix.com





Fattori patologici
(malattie renali, epatiche)

Fattori ambientali
(interazioni tra farmaci o altri
composti chimici)

Fattori fisiologici
(età, sesso, etnia)

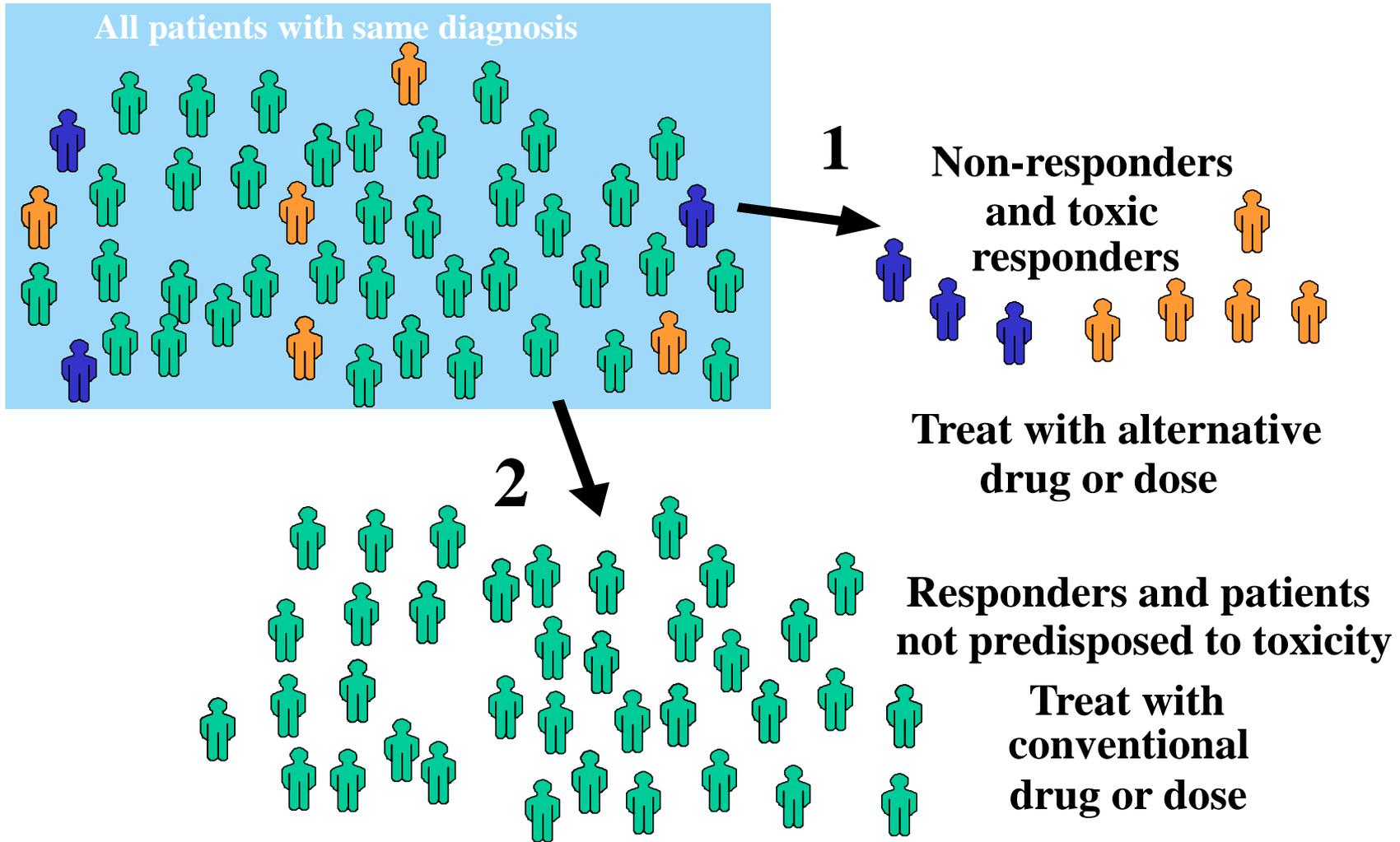
Fattori genetici
(deficit genetici, polimorfismi)

Capacità di metabolizzare i farmaci

Risposta individuale alla stessa dose di farmaco
(differenze interindividuali e interetniche)

Il potenziale della farmacogenomica

Medicina predittiva e terapia personalizzata



“Il farmaco giusto alla dose giusta per il paziente giusto”

Effetti farmacologici in pazienti con polimorfismi di CYP2D6

	Metabolismo lento	Metabolismo ultra-rapido
• Antidepressivi triciclici	cardiotossicità tachicardia costipazione debolezza	inefficace
• Antiarritmici	parestesie disturbi visivi vertigine nausea vomito aritmie	inefficace
• Codeina costipazione,	inefficace	sedazione eccessiva, nausea

Distribuzione etnica dei fenotipi polimorfici di CYP2D6

- **Metabolismo lento**
 - Europei 5-10 %
 - Africani 2-5 %
 - Asiatici <1 %

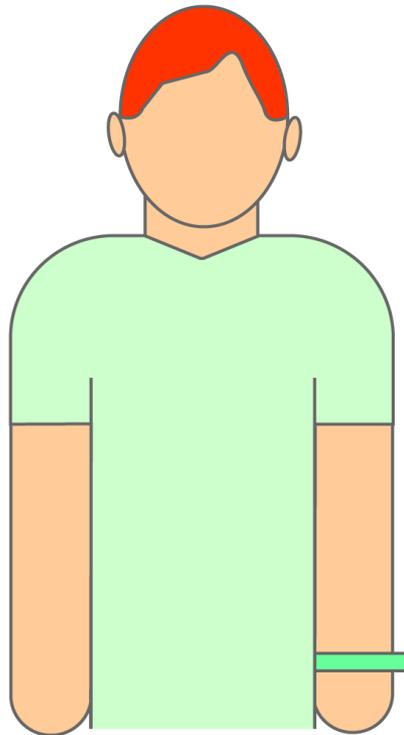
- **Metabolismo ultra-rapido**
 - Scandinavi 1.5 %
 - Spagnoli 7 %
 - Etiopi 20 %

Il metabolismo di molti farmaci avviene ad opera del citocromo P450 (CYP450) che fa parte di un gruppo di enzimi ossidativi/dealchilanti localizzati nei microsomi di molti tessuti, compreso fegato e intestino. Uno degli enzimi CYP450 è il, CYP2C9, che è in grado di metabolizzare una grande quantità di farmaci dalla warfarina agli anti-infiammatori non steroidei e ai farmaci ipoglicemizzanti.

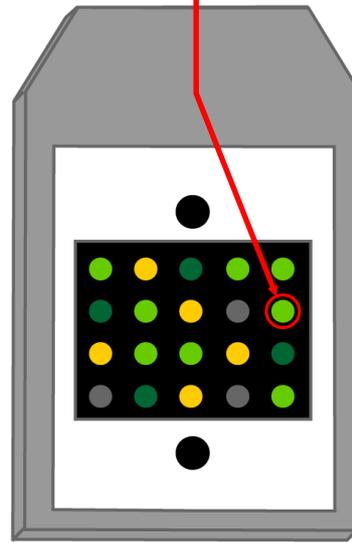
Alcuni individui hanno il gene *CYP2C9* con mutazioni che determinano una diminuita capacità catalitica e quindi sono dei "Poor Metabolizers". Rischiano molto di più dei normali di avere effetti collaterali anche gravi. A number of specific polymorphisms have been found in the *CYP2C9* gene that results in enzymatic deficiencies.

CYP2C9 Allele	Nucleotide Change	Effect on Enzyme Metabolism
*1	None (wild type)	Extensive metabolizer (normal)
*2	430C->T	Reduced activity
*3	1075A->C	Minimal activity
*4	1076T->C	Reduced activity
*5	1080C->G	Reduced activity
*6	818delA	No activity

I polimorfismi genici per valutare la velocità di metabolizzazione dei farmaci



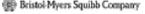
Check
P450 CYP2C9 gene



SNP-o-chip



16 Agosto 2007: Nuovo foglio informativo per varfarina approvato dalla Federal Drug Administration (USA) con il dosaggio basato sul genotipo del paziente

 Bristol Myers Squibb Company

Rx only

Anticoagulant

COUMADIN® TABLETS
(Warfarin Sodium Tablets, USP) Crystalline

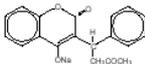
COUMADIN® FOR INJECTION
(Warfarin Sodium for Injection, USP)

WARNING: BLEEDING RISK

Warfarin sodium can cause major or fatal bleeding. Bleeding is more likely to occur during the starting period and with a higher dose (resulting in a higher INR). Risk factors for bleeding include high intensity of anticoagulation (INR >4.0), age ≥65, highly variable INRs, history of gastrointestinal bleeding, hypertension, cerebrovascular disease, serious heart disease, anemia, malignancy, trauma, renal insufficiency, concomitant drugs (see **PRECAUTIONS**) and long duration of warfarin therapy. Regular monitoring of INR should be performed on all treated patients. Those at high risk of bleeding may benefit from more frequent INR monitoring, careful dose adjustment to desired INR, and a shorter duration of therapy. Patients should be instructed about prevention measures to minimize risk of bleeding and to report immediately to physicians signs and symptoms of bleeding (see **PRECAUTIONS: Information for Patients**).

DESCRIPTION

COUMADIN (crystalline warfarin sodium) is an anticoagulant which acts by inhibiting vitamin K-dependent coagulation factors. Chemically, it is 3-(*o*-acetylphenyl)-4-hydroxycoumarin and is a racemic mixture of the *R*- and *S*-enantiomers. Crystalline warfarin sodium is an isopropanol clathrate. The crystallization of warfarin sodium virtually eliminates trace impurities present in amorphous warfarin. Its empirical formula is C₁₉H₁₅NaO₄, and its structural formula may be represented by the following:



Crystalline warfarin sodium occurs as a white, odorless, crystalline powder, is discolored by light and is very soluble in water; freely soluble in alcohol; very slightly soluble in chloroform and in ether.

COUMADIN Tablets for oral use also contain:

All strengths: Lactose, starch and magnesium stearate

- Dosaggio raccomandato per varfarina
- 17% di meno in pazienti con almeno 1 copia del allele CYP2C9*2
- 37% di meno in pazienti con almeno 1 copia del allele CYP2C9*3



AMPLI@HIP



AmpliChip CYP450 Test

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

AmpliChip CYP450 Test

CYP450

24 Tests

P/N: 04591402 190



- **Primo test farmacogenetico approvato dal FDA (US Federal Drug Administration) per uso diagnostico**
- **Microarray per identificare polimorfismi nei geni di metabolismo di 29 principali polimorfismi noti (inclusi duplicazione e delezione) del gene 2D6 ed i due principali del gene 2C19 del citocromo p450, implicati nel metabolismo di numerosi farmaci da prescrizione di uso comune.**
- **Predire il metabolismo del farmaco, aggiustare la dose secondo il genotipo, diminuire reazioni avverse**

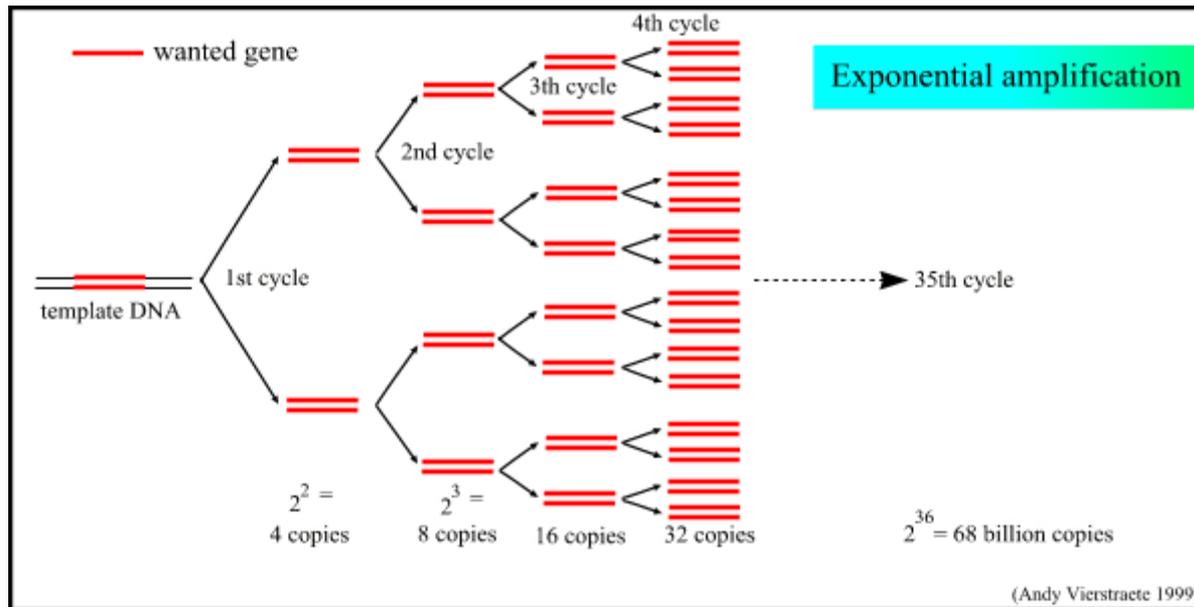
Le principali categorie farmaceutiche metabolizzate dal citocromo p450 sono:

- gene CYP2D6: antidepressivi, antiemetici, antipsicotici, antiaritmici, beta-bloccanti e oppiacei

- gene CYP2C19: anticoagulanti, anticonvulsivi, anti-malarici, benzodiazepine, inibitori della pompa protonica

Le Tecniche di amplificazione

Le tecniche di amplificazione: La polymerase chain reaction

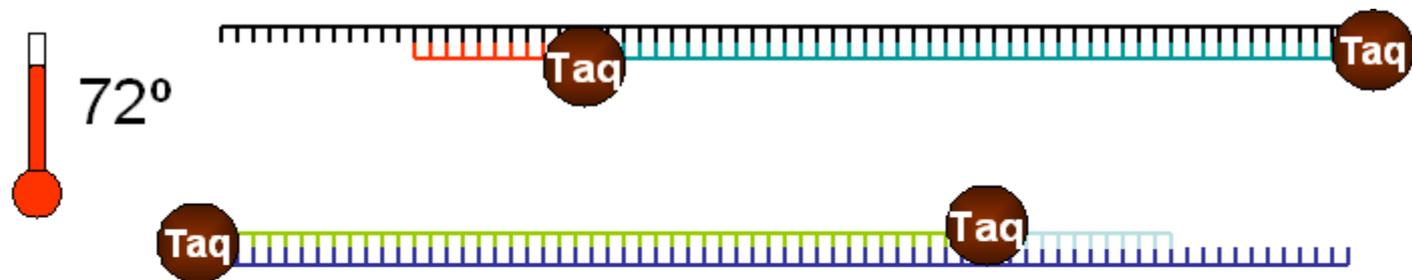


Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

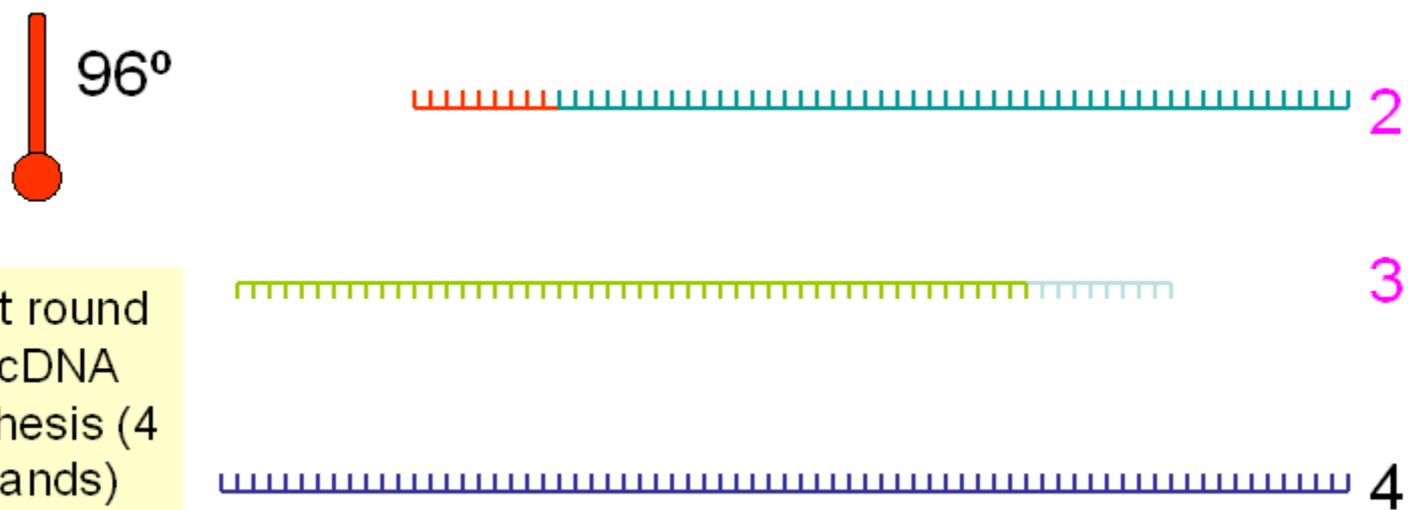
Numero di cicli	Numero di molecole di amplificati
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824

$$Y = N2^n$$

Y= numero molecole di DNA
amplificato
N= numero molecole di DNA
di partenza
n= numero dei cicli di PCR

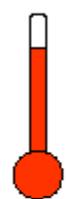


E. Copy strands

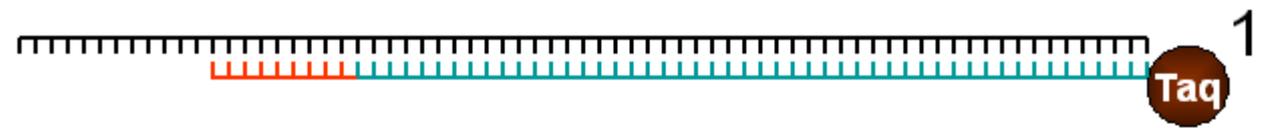


F. Denature

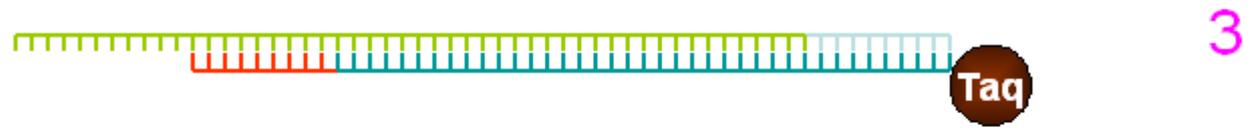
First round
of cDNA
synthesis (4
strands)



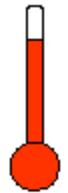
72°



I. Copy strands



Second round of cDNA synthesis (8 strands)



72°



1



2



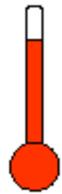
3



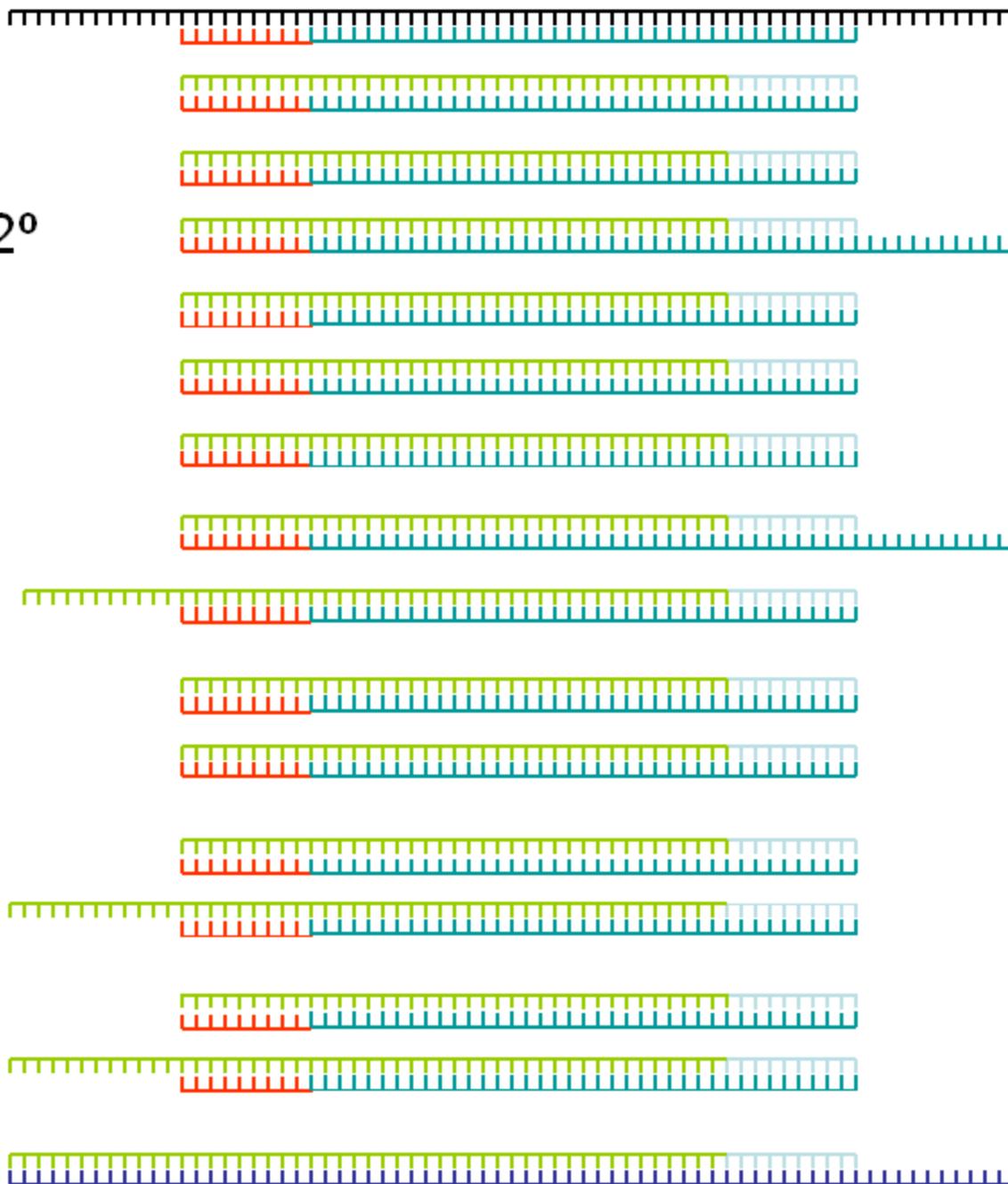
4

K. Bind polymerase (not shown) and copy strands

Third round of cDNA synthesis (16 strands)



72°



1

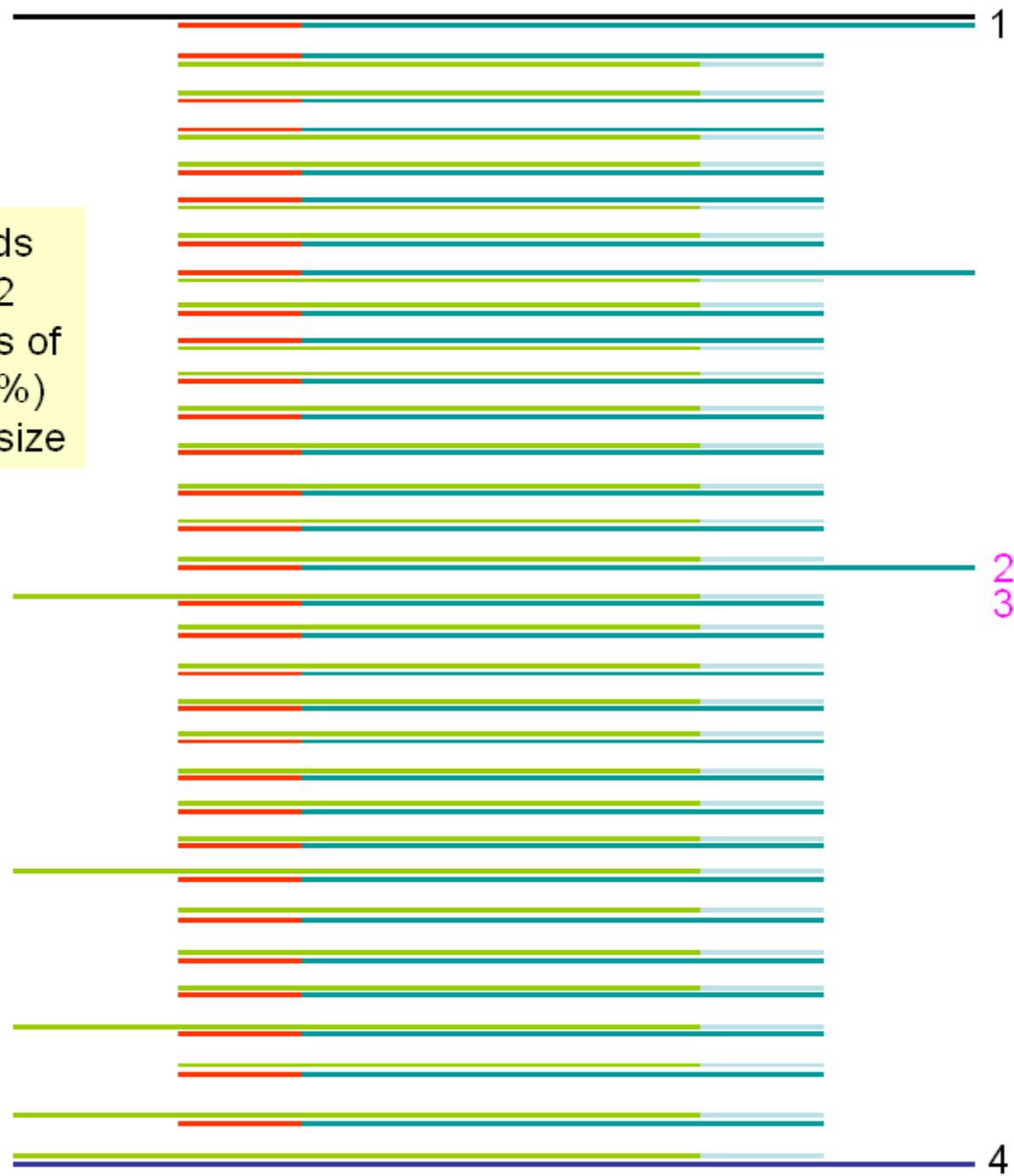
M.
Copy strands at
72°

2
3

4

Fourth
round of
cDNA
synthesis
(32
strands)

After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are same size



LA FORMULA DELLA PCR

$$Y = N (1+E)^n$$

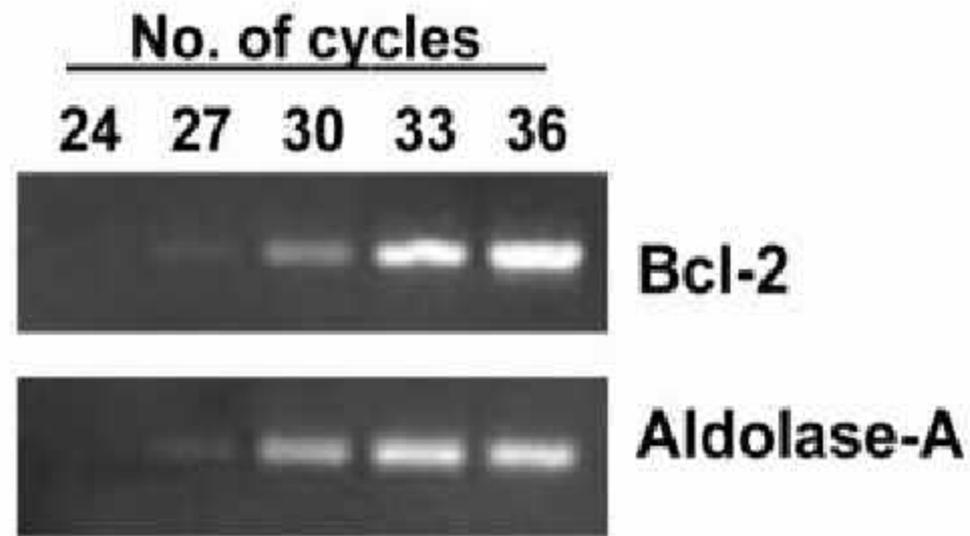
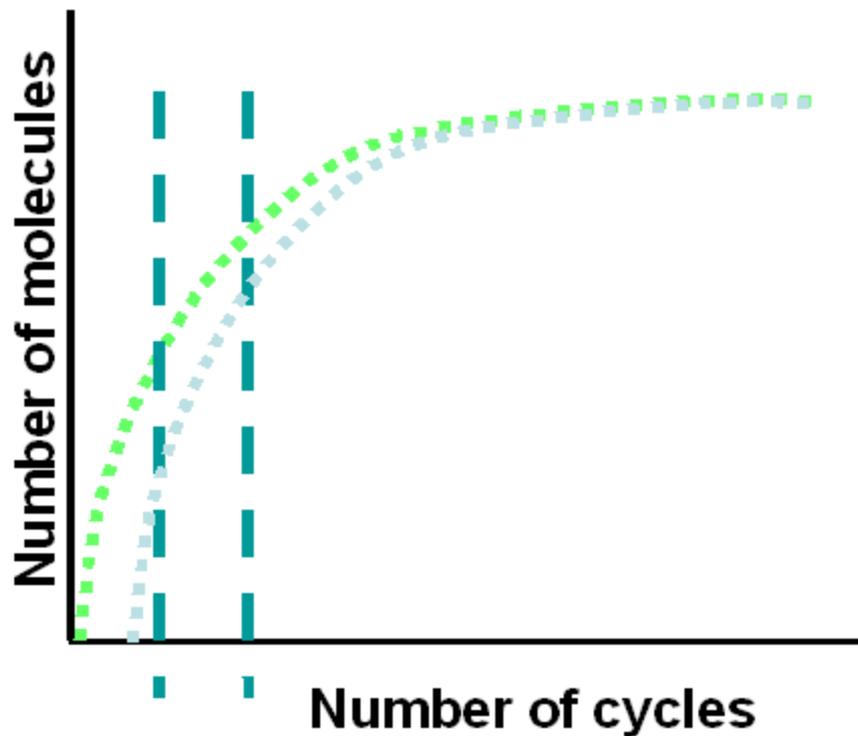
Y = resa di amplificazione

N = numero di molecole di DNA di partenza

E = efficienza di reazione

n = numero di cicli di amplificazione

La PCR non e' una tecnica quantitativa



Recupero di DNA da diversi tessuti e fonti

Fonte di DNA	Quantità del tessuto	Recupero di DNA
DNA genomico purificato	10-500ng	10-500ug
Sangue intero	30µl	0.5-1µg
Macchia di sangue	Metà di una macchia di 5mm	1-3µg
Sospensione cellulare	5 x 10 ⁵ cells	2.0-5µg
Cellule della bocca	Lavaggio della bocca	0.1-1µg
Biopsia di villi corionici	Piccoli pezzi	1-3µg
Liquido seminale	30µl	5-10µg
capelli	Singolo capello	10-200ng
Biopsia o pezzi tessuto	50mg	0-10µg

PCR

VANTAGGI:

- Sensibilità
- Rapidità
- Si presta all'analisi simultanea di molti campioni (high throughput)
- Si presta all'analisi simultanea di diverse sequenze sullo stesso campione
- Si presta all'analisi di DNA degradato o incluso in mezzi strani, o fissato

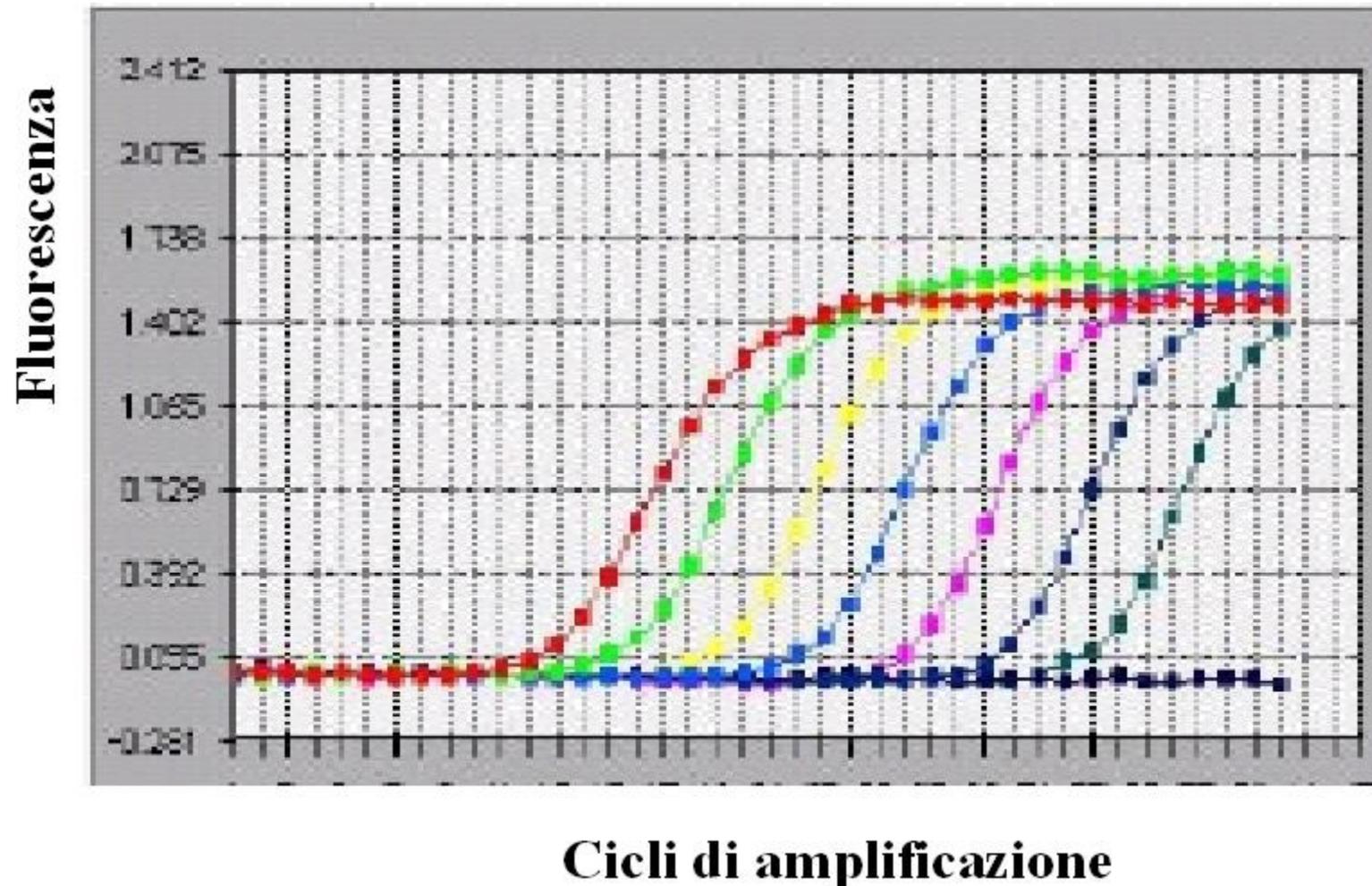
SVANTAGGI:

- Sensibilità (rischio di contaminazioni-falsi positivi)
- Variabile efficienza di amplificazione a seconda della sequenza
- Richiede conoscenza di base delle sequenze da amplificare e messa a punto per coppie di oligonucleotidi di innesco (primers)
- Può sintetizzare frammenti relativamente corti
- La sintesi è imprecisa e introduce errori nella sequenza (la Taq pol non possiede attività 3'→5' esonucleasica)

Real-Time PCR:

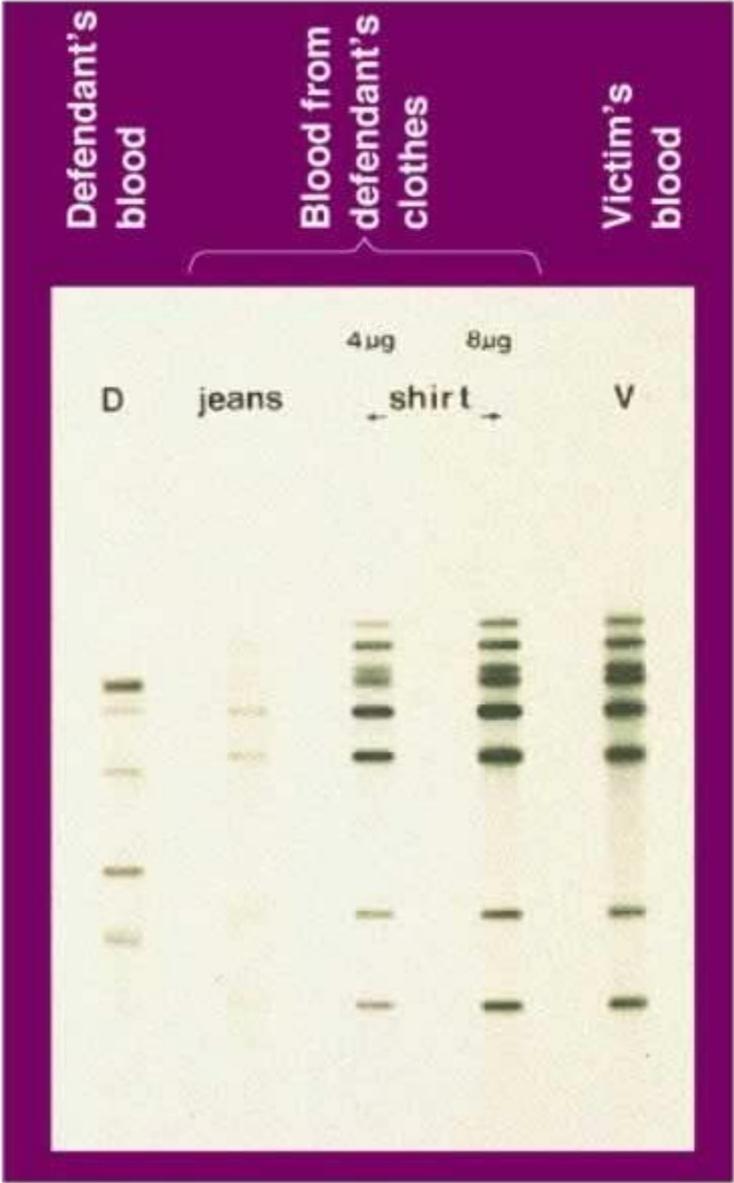
- **COMPONENTI DELLA REAZIONE:**
 - • DNA target
 - • DNA polimerasi
 - • Due oligonucleotidi
 - • dNTPs
 - • Probe fluorescente

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione
il
cui CT(=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale
alla quantità di DNA stampo iniziale



DNA fingerprinting

- La molecola del DNA possiede caratteristiche che consentono di differenziare i diversi individui in base a RFLP
- Queste differenze vengono utilizzate per studi che trovano sviluppo in diversi ambiti: forense, medico, evolutivo ecc.
- In campo forense la tecnica del DNA fingerprinting vede utilizzo immediato nelle indagini della polizia scientifica
- Si utilizza l'amplificazione mediante PCR di queste regioni RFLP.



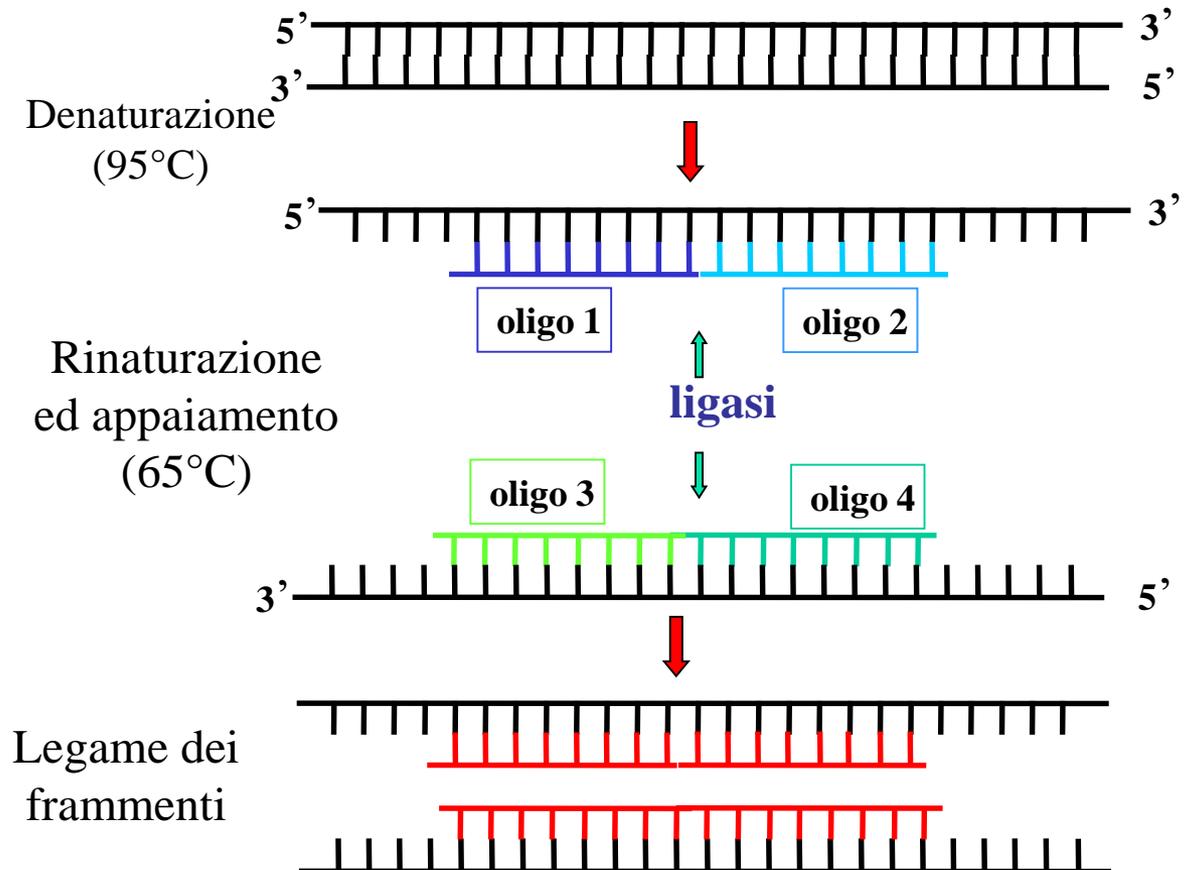
Ligase Chain Reaction

- Le sonde si ibridizzano adiacenti una all'altra sul bersaglio
- Le sonde vengono legate e diventano bersagli per altre sonde.

LCR (Ligase Chain Reaction)

Tecnica di amplificazione che permette il rivelamento di sequenze specifiche di DNA bersaglio tramite l'amplificazione di sonde complementari alla sequenza bersaglio che vengono unite da una **DNA ligasi termostabile**.

Una DNA ligasi termostabile unisce tra loro due coppie di oligo se questi si appaiano a regioni contigue. Durante i cicli successivi il DNA bersaglio è costituito dal DNA originale e dalle coppie di primers uniti dalla ligasi. Ad ogni ciclo l'acido nucleico bersaglio risulterà raddoppiato.

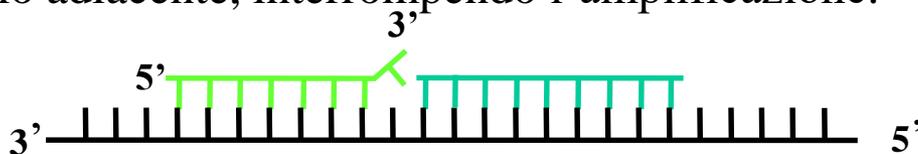


LCR Ligase Chain Reaction

LCR permette l'amplificazione specifica di bersagli di DNA con sensibilità e specificità simili alla PCR

Impieghi

Utilizzato sia per identificare geni bersaglio sia per l'analisi di mutazioni geniche. Infatti anche un solo nucleotide non perfettamente appaiato al DNA bersaglio presente sull'estremità 3' della sonda non permette alla ligasi di saldare l'oligonucleotide a quello adiacente, interrompendo l'amplificazione.

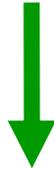


Limiti

Elevato rischio di contaminazione del campione (come tutte le tecniche di amplificazione).

Necessita per l'analisi di disporre di campioni di DNA di elevata purezza data la sensibilità delle ligasi alla composizione del mezzo.

Wild-Type Sequence

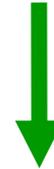


Annealing



No DNA Products

Mutant Sequence



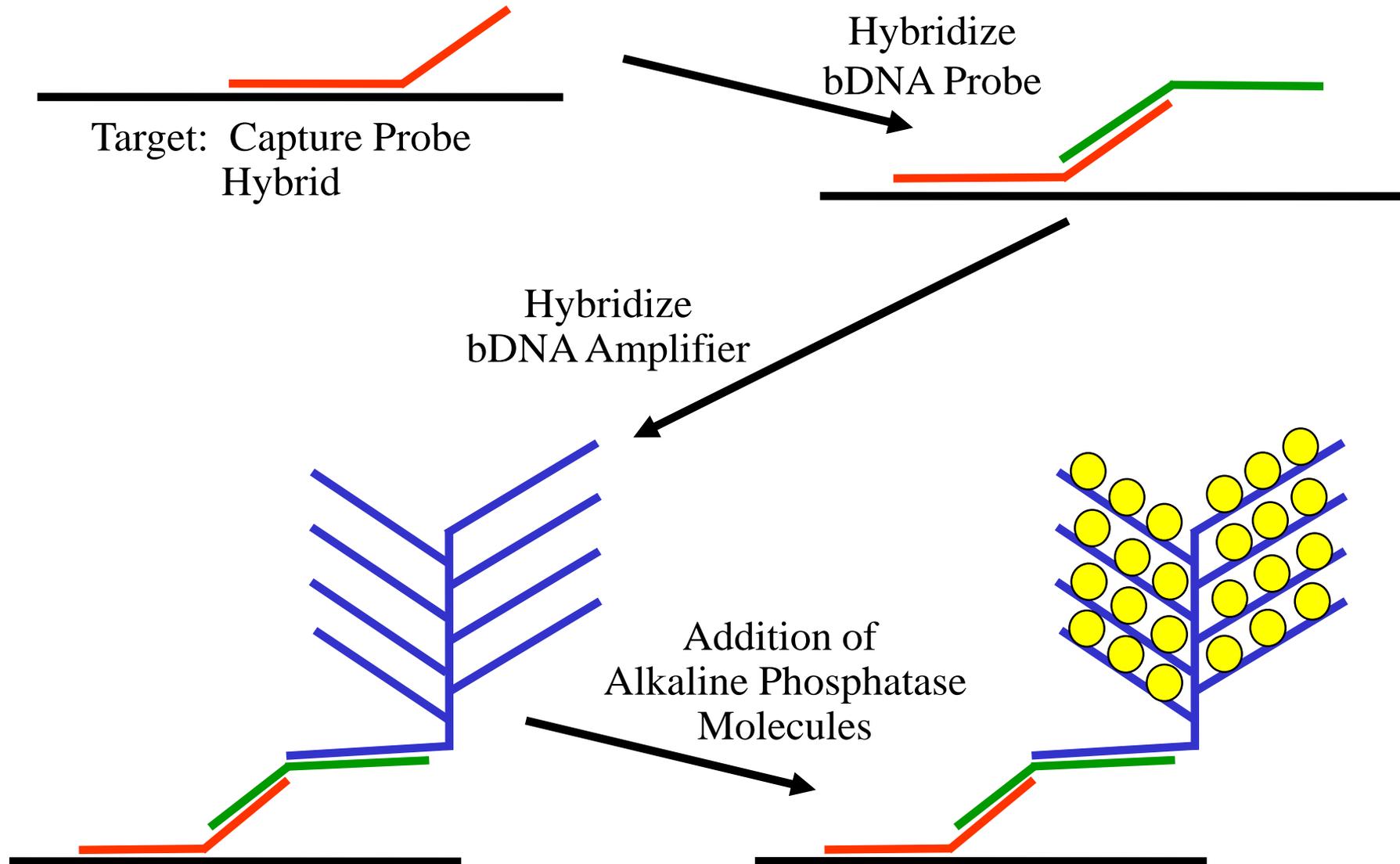
Ligation



DNA Product

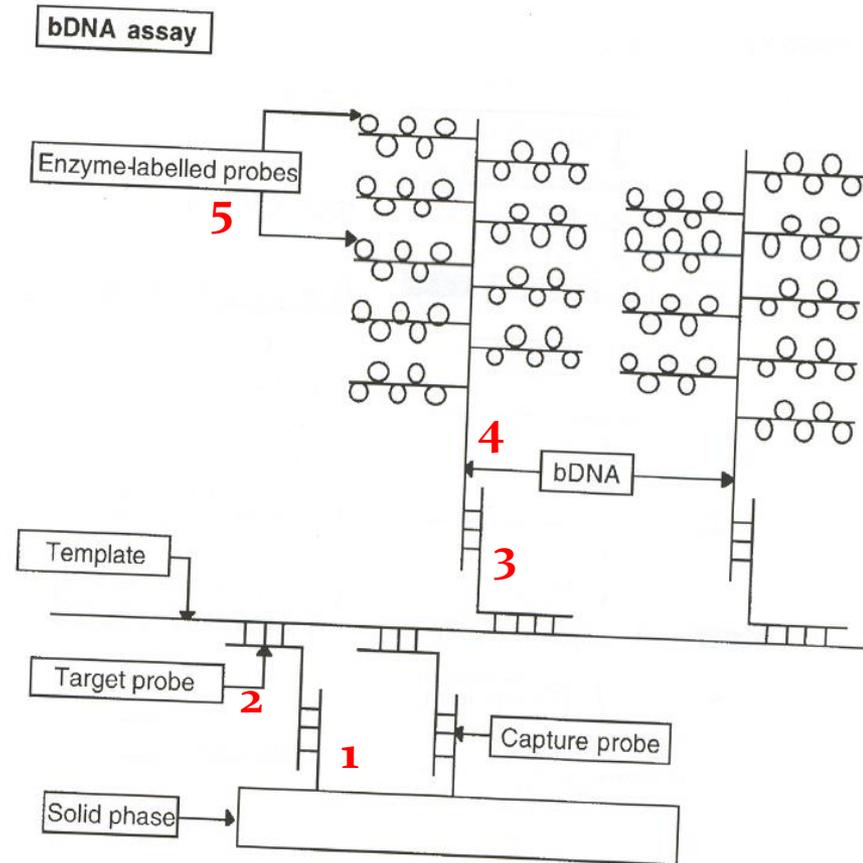


Branched DNA Detection



Le altre sonde sono aggiunte nell'ordine:

- a. sonda 2 "target probe" specifica per la sonda 1 e per il bersaglio. L'acido nucleico ibridizzato si lega ai pozzetti.
- b. sonda 3 (target probe II set) specifica per il bersaglio e per il bDNA.
- c. bDNA (sonda 4) che si lega al complesso.
- d. oligonucleotidi legati a enzima (sonda 5)
- e. sviluppo della reazione e rivelazione della chemiluminescenza.



NASBA Nucleic acid sequence based amplification

TMA transcription mediated amplification

Usate per l'amplificazione di RNA

L'RNA bersaglio è retrotrascritto in cDNA con un primer che contiene la sequenza per il promotore della T7 RNA pol, segue la sintesi di RNA con una RNA polimerasi

- Vantaggi:
 - L'amplificazione è **isotermica**, non richiede un termociclatore, non necessita di enzimi termostabili, avviene in un unico passaggio ed ha una grado di sensibilità pari alla RT-PCR
- Impieghi:
 - Utilizzato per amplificare vRNA, mRNA, rRNA. Es. identificare agenti infettivi che hanno genomi ad RNA (HCV, HIV) o bersagli di RNA (rRNA micobatteri)
- Limiti:
 - Richiede un ulteriore processamento per rivelare i prodotti dell'amplificazione.
 - I prodotti ad RNA sono maggiormente esposti all'idrolisi di quelli ad DNA

NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification).

Utilizzando 3 enzimi (RNA polimerasi T7, RT, RNasi H) e 2 primer specifici si consente l'amplificazione sia di RNA sia di DNA in maniera esponenziale.

Si basa sullo schema di trasferimento dell'informazione genica caratteristico del meccanismo di replicazione dei genomi dei retrovirus: da RNA a DNA e, di nuovo, RNA.

Si usa contemporaneamente la miscela di enzimi che funzioneranno a temperatura costante per ottenere la replicazione dell'acido nucleico.

NASBA Oligonucleotide Primer Design



Target RNA Sequence 5'  3'

Reverse Transcription



RNA:DNA Hybrid 

RNase H





Reverse Transcription

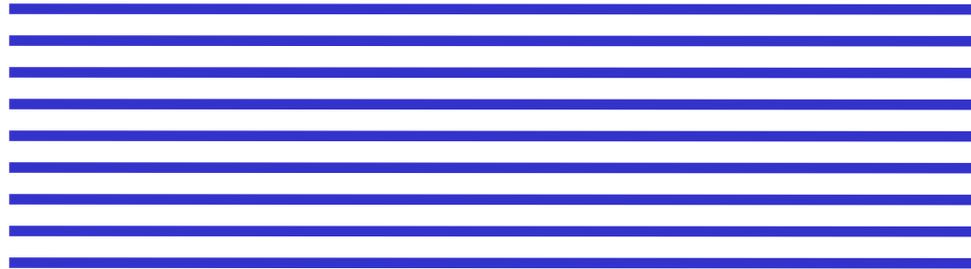


Double Strand DNA 

Double Strand
DNA



T7 RNA Polymerase



Many Copies of Target RNA Sequence



Additional Amplification Reactions

NASBA(AMV-RT+RNasi H)/TMA(MMLV-RT, RNasi H incorporata) iniziano con RNA

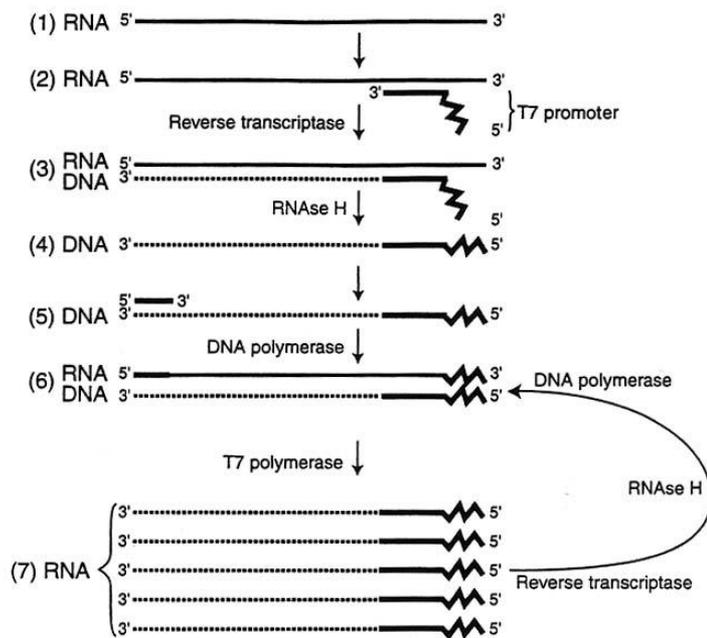


FIGURE 2 Transcription-based amplification.

Due oligo, uno (A) funziona come molecola ibrida con due distinti domini e funzioni: la prima è complementare alla sequenza target, mentre la seconda contiene un promotore per una RNA polimerasi.

Fasi:

- 1) L'enzima RT sintetizza DNA a partire dall'RNA. Ibrido RNA_DNA.
- 2) L'enzima RNasi-H degrada RNA e quindi il secondo oligo (B) si lega al DNA ed inizia la sintesi del cDNA.
- 3) L'enzima T7 RNA polimerasi (DNA dipendente) trascrive il doppio filamento di DNA partendo dal promotore presente sul primo "ibrido" primer.

Il prodotto della reazione NASBA è un RNA a singolo filamento, che rappresenta 10^6-10^9 volte la sequenza bersaglio (in meno di 2 ore)

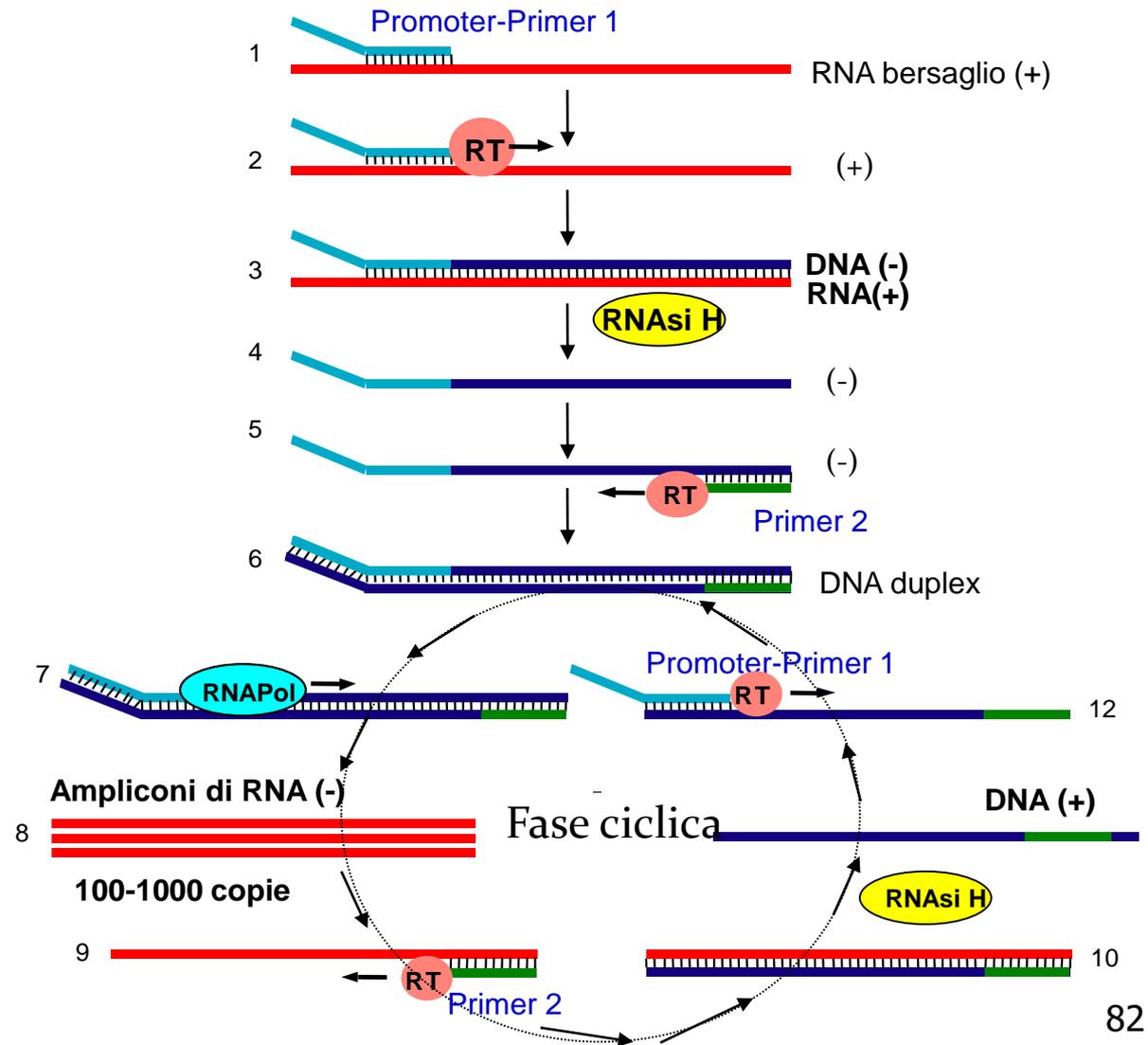
NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) e TMA (Transcription Mediated Amplification)

Metodi di **amplificazione isoterma** (41 °C). di RNA
Sono utilizzati cocktail di 3 enzimi (trascrittasi inversa, RNA polimerasi, RNAsi H) che agiscono in successione nella stessa miscela di reazione.

Fase di retrotrascrizione dell'RNA in DNA a doppio filamento utilizzando una RT, due inneschi e RNAsi H.

Fase ciclica: Il DNA viene trascritto dalla RNA pol. I in numerose copie di RNA(-) che vengono riconvertite in altro DNA.

LA fase ciclica si ripete.



Sequenziamento del DNA

Metodo di Maxam e Gilbert

Con questo metodo un frammento di DNA a singola elica viene sequenziato, utilizzando i seguenti passaggi:

- rimozione del 5' fosfato con la fosfatasi alcalina**
- marcatura del fosfato terminale utilizzando ^{32}P -ATP e polinucleotide chinasi**
- divisione del prodotto ottenuto in 4 aliquote:**

Aliquota 1 è trattata con dimetilsolfato che metila i residui guaninici

Aliquota 2 è trattata con acido formico che metila i residui guaninici e adeninici

Aliquota 3 è trattata con idrazina che ammina i residui timinici e citosinici

Aliquota 4 è trattata con idrazina e NaCl che ammina i residui citosinici

- Incubazione in piperidina, che taglia la catena nucleotidica in corrispondenza alla base modificata

La reazione è svolta in modo che avvenga in modo limitato in modo che si formino catene che hanno lo stesso 5' marcato ma con diverse lunghezze

- I frammenti ottenuti vengono separati per elettroforesi ed esaminati per autoradiografia

DNA marcato ad una estremità

Rottura G
(DMS + calore)

Rottura A
(DMS + acido)

Rottura C
(idrazina + sale)

Rottura C + T
(idrazina)

Elettroforesi per identificare i frammenti marcati terminalmente

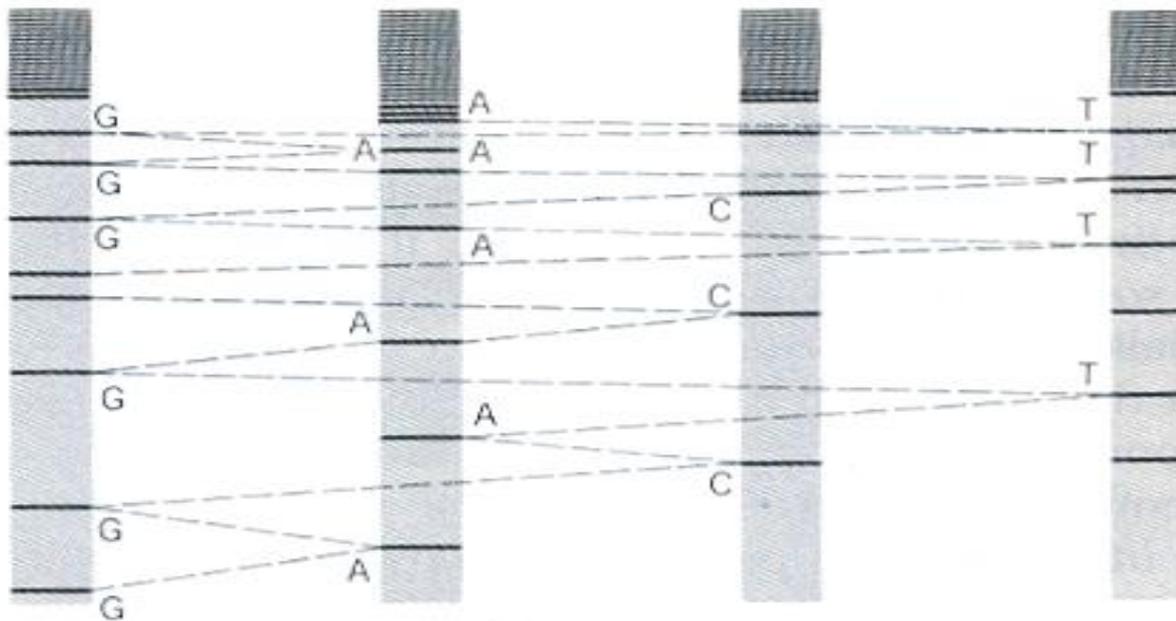
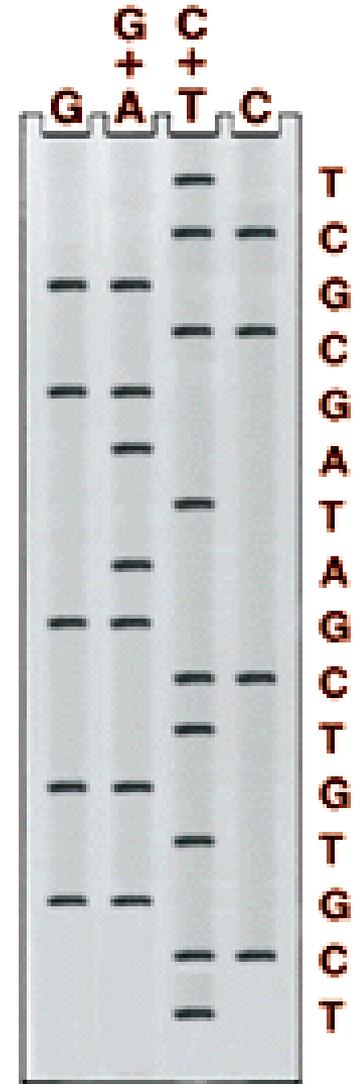
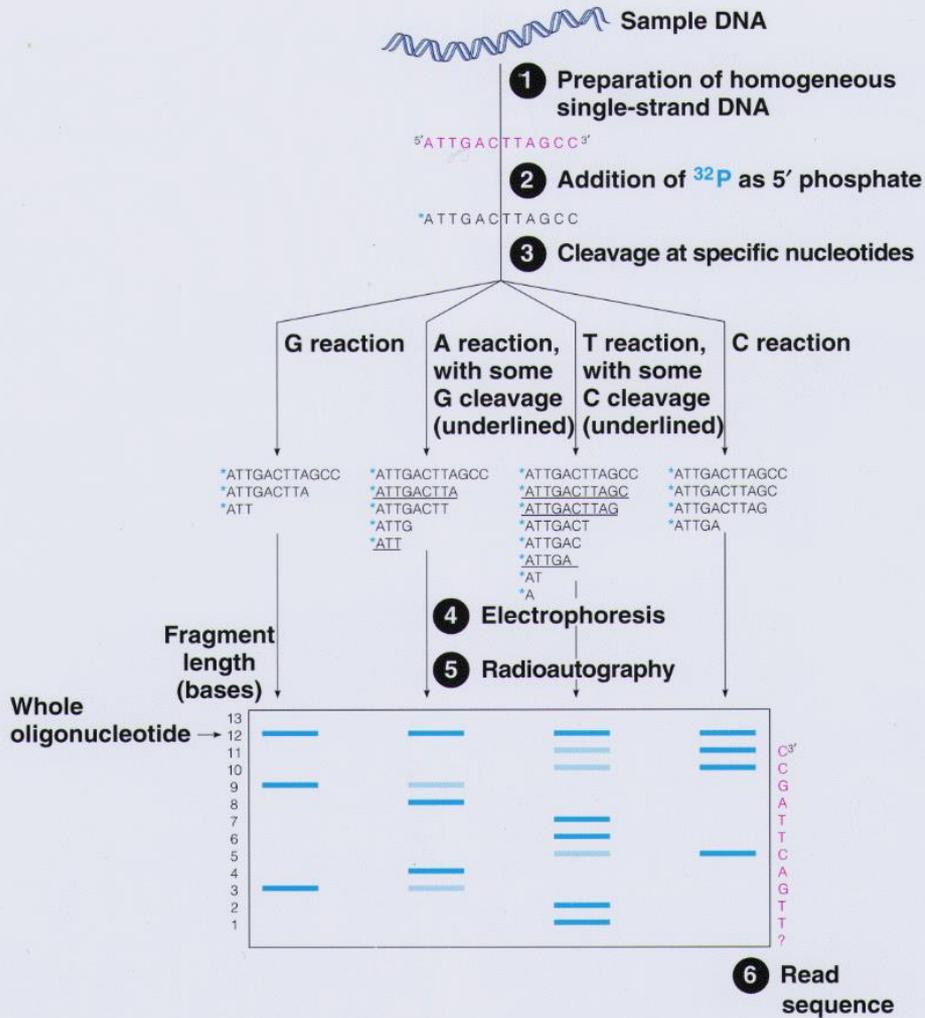


Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



Sequenziamento del DNA

Metodo enzimatico (Sanger)

Si utilizza una reazione polimerasica con un oligonucleotide di innesco (primer)

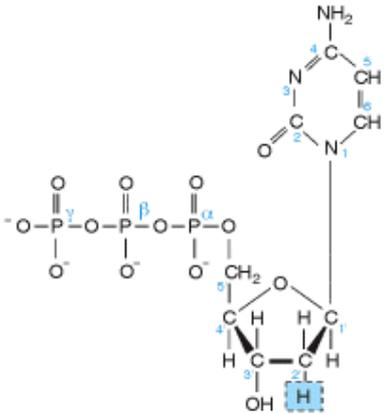
Si basa sull'uso di didesossi-nucleotidi, che possono essere incorporati nella catena nascente ma la bloccano.

Tale metodo si basa sulla ricostruzione dell'elica complementare a quella che si vuole sequenziare, utilizzando il frammento di Klenow ed un opportuno primer.

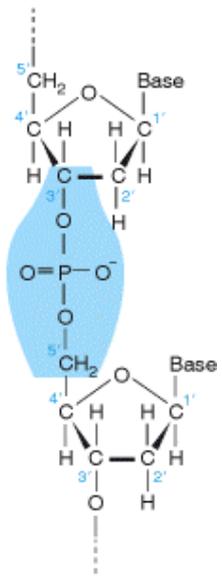
La reazione viene realizzata in presenza di deossiribonucleotidi marcati ed in 4 provette ciascuna delle quali contiene un tipo di dideossiribonucleotide che viene incorporato durante la sintesi del DNA, bloccandone la prosecuzione della stessa.

Ciascuna provetta conterrà frammenti di varia lunghezza terminanti con lo stesso nucleotide. I frammenti così ottenuti vengono separati con elettroforesi e autoradiografia in modo del tutto analogo al precedente e l'elaborazione dei risultati avviene in modo del tutto identico.

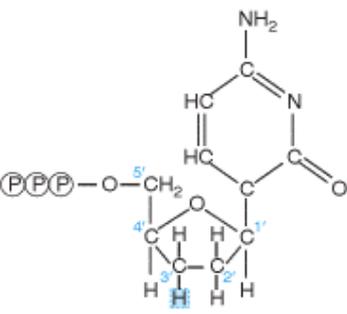
L'inserimento di un didesossi-nucleotide nella catena nascente blocca la sintesi



2' desossi-CTP 5' trifosfato



Legame fosfodiesterico

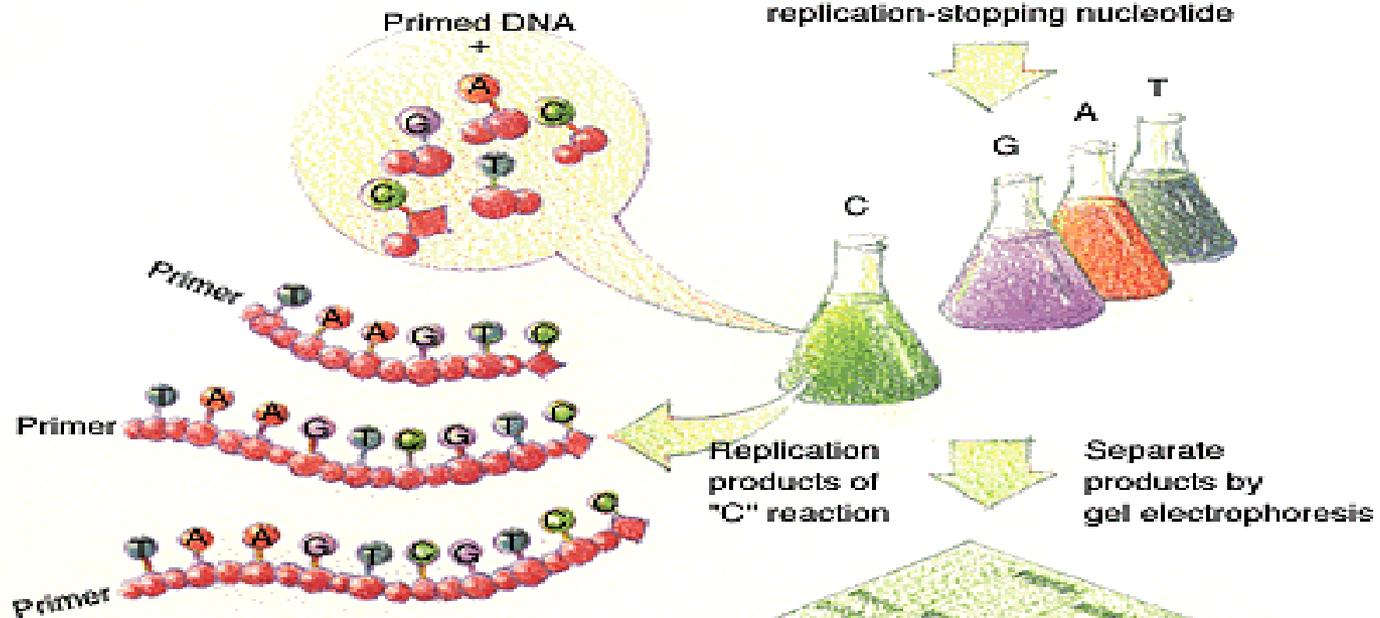


Key:
 (P) Phosphate group

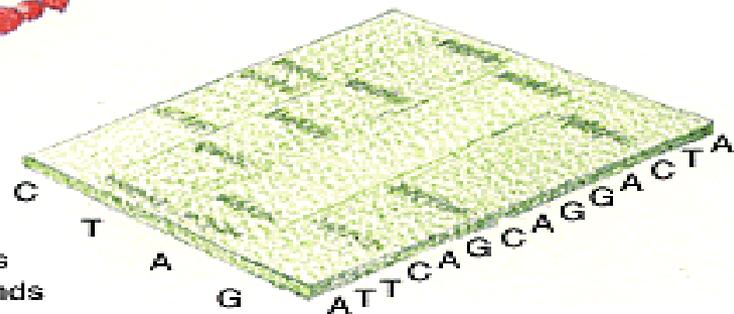
2', 3' didesossi-CTP 5' trifosfato

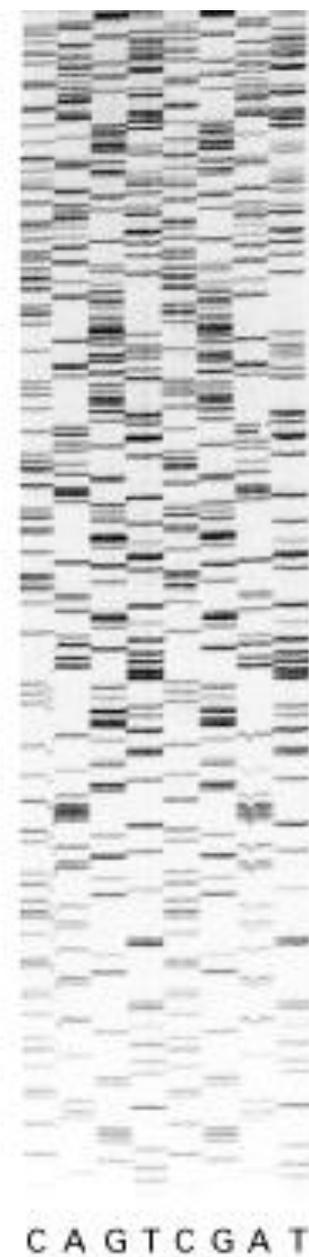
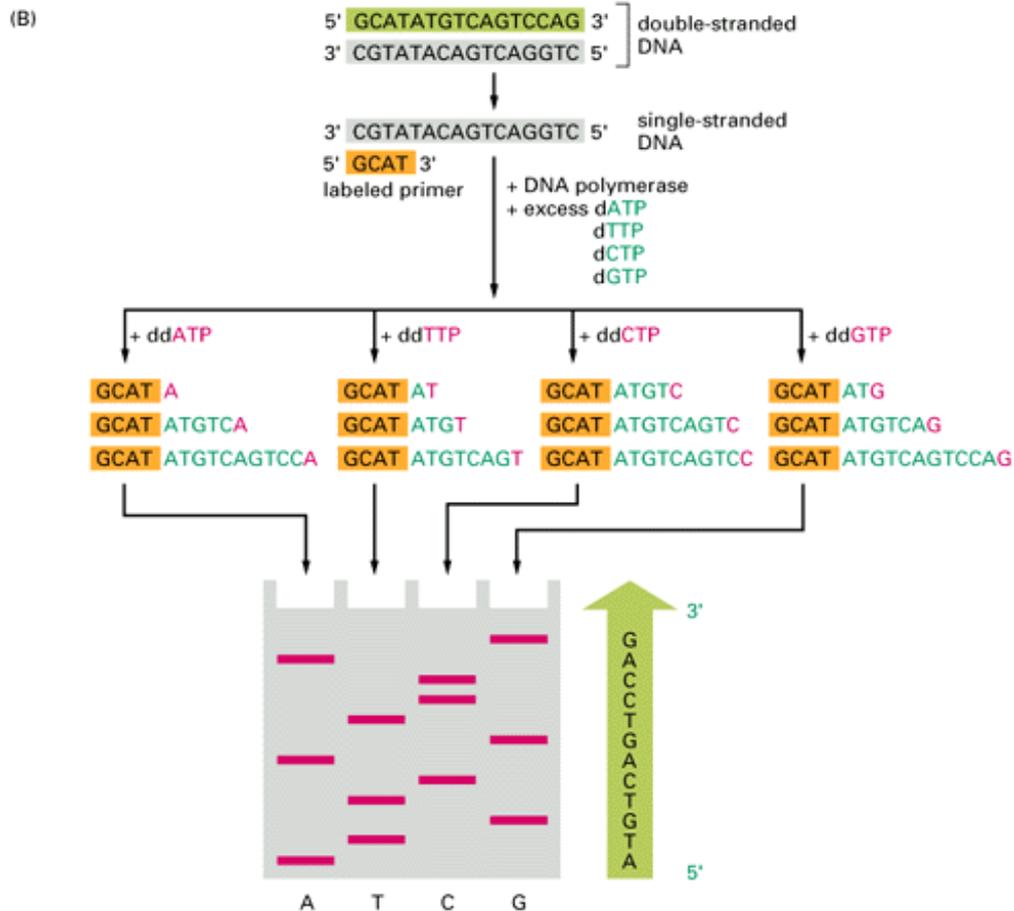
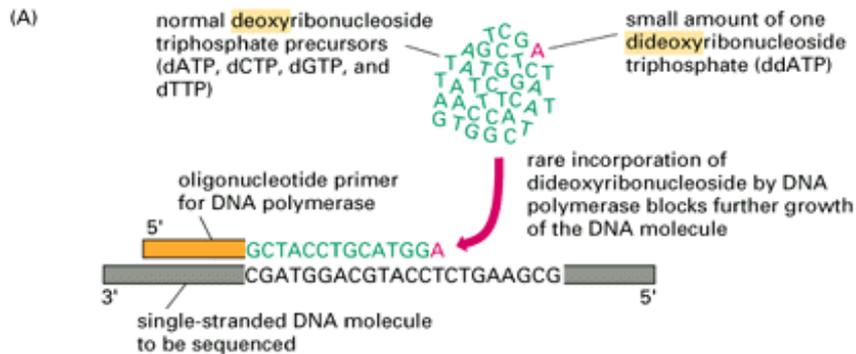


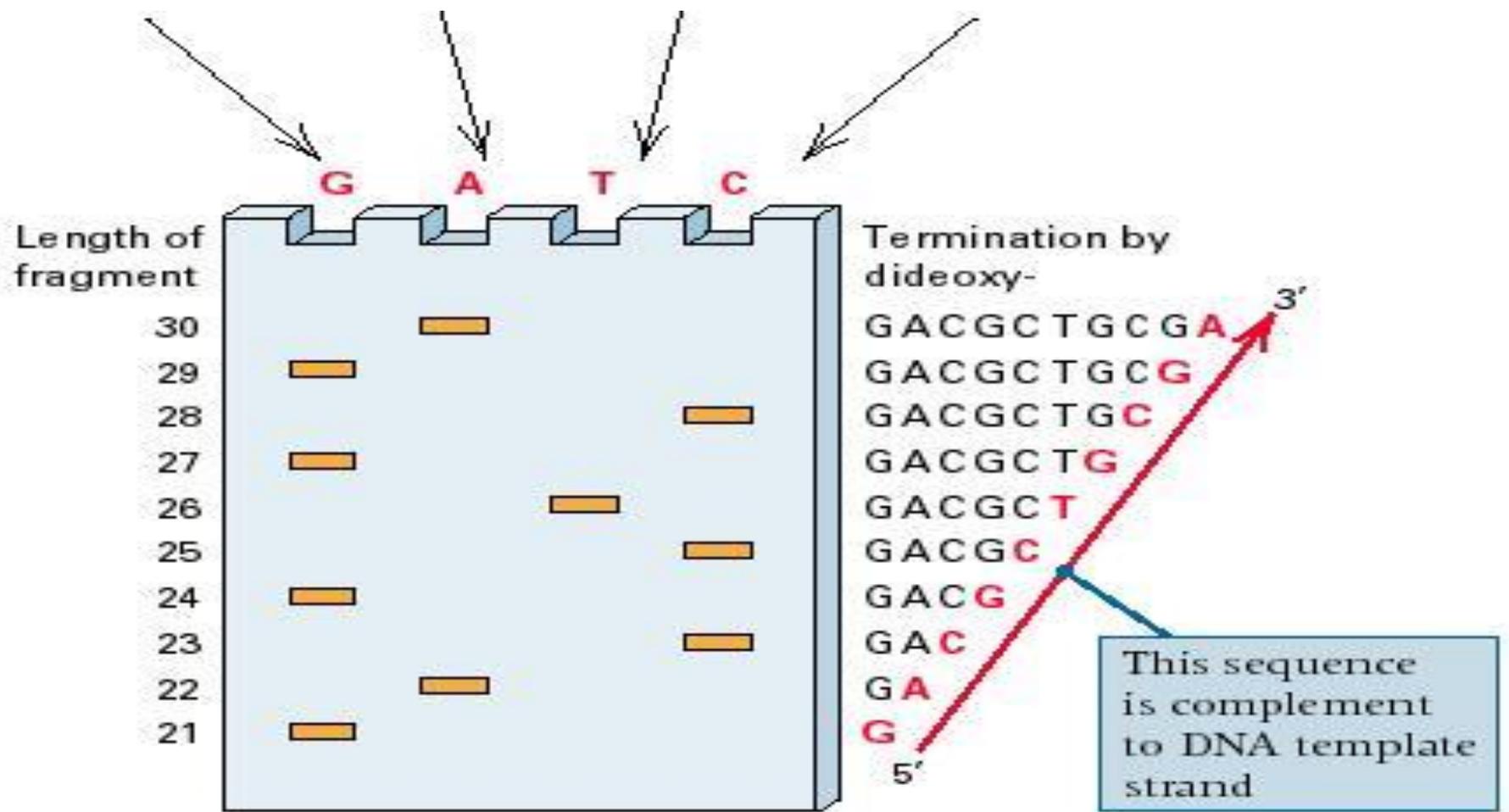
Prepare four reaction mixtures; include in each a different replication-stopping nucleotide



Read sequence as complement of bands containing labeled strands







Sequenziamento con Taq polimerasi

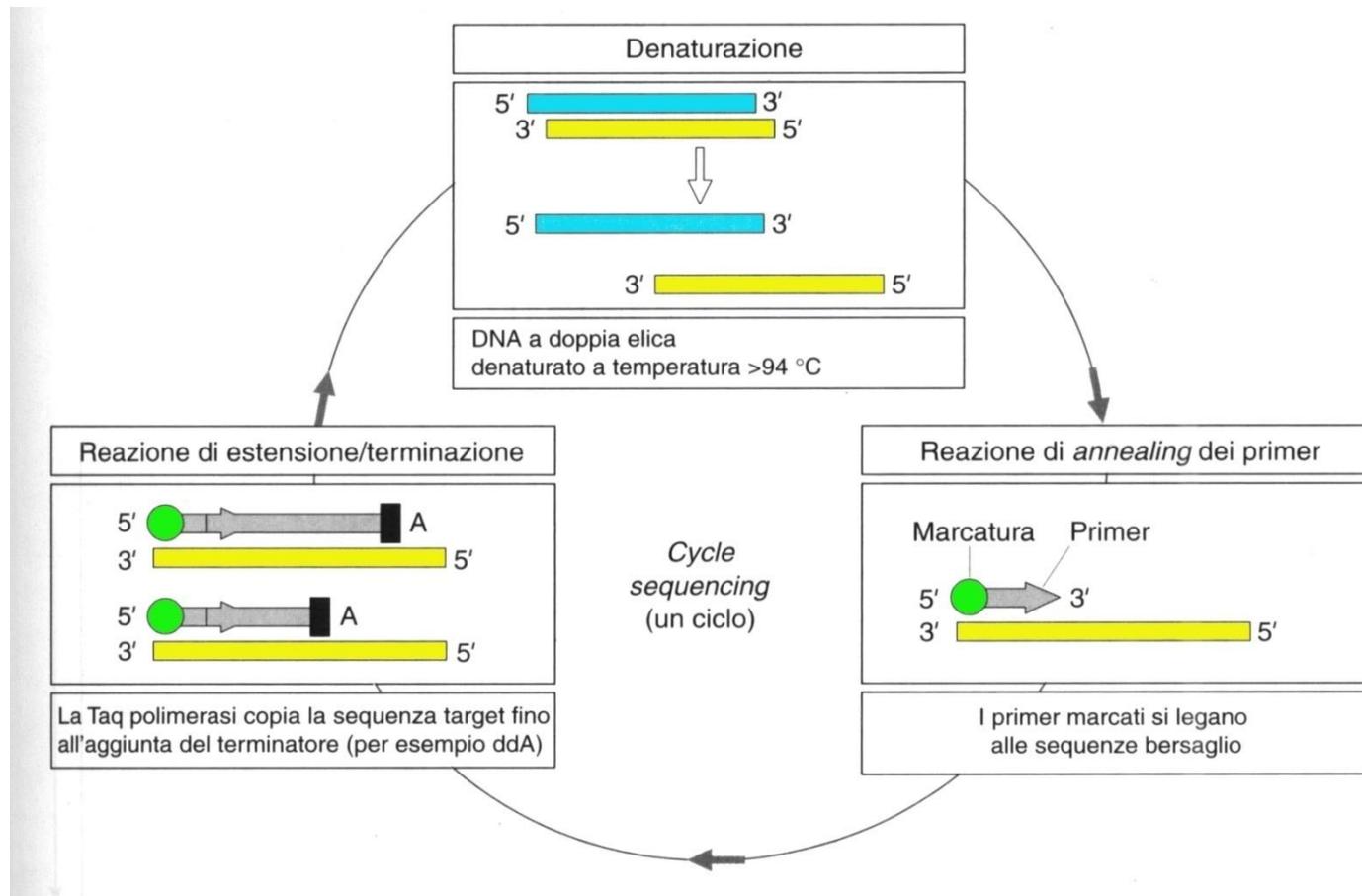


Figura 2.38 Schema semplificato del *cycle sequencing*. I primer marcati consentono l'amplificazione lineare. Durante le reazioni di estensione e terminazione, si incorporano nella sequenza crescente i didesossiribonucleotidi, terminatori della catena. Questo avviene in quattro reazioni separate (A, C, G e T). Si separano poi i prodotti su gel di poliaccrilammide e si analizza la sequenza. Il diagramma indica solo gli eventi che avvengono nella reazione A.

TTACGTAACGTCAG**G** **14**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**A** **15**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AA** **16**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AAAC** **17**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AAACG** **18**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AAACGT** **19**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

TTACGTAACGTCAG**AAACGTC** **20**
AATGCATTGCAGTCTTGCAGGCCTTGCATCCCCAGCGCGCAA

Sequenziamento automatico con Dye-Terminator:

1. Il sequenziamento manuale richiede molto tempo, si usa materiale radioattivo, si ottengono pochi dati (~300 bp per corsa).
1. Il sequenziamento automatico usa la stessa procedura ma usa ddNTPs labeled coniugati con marker fluorescenti.
1. Le quattro reazioni sono riunite in una e risolte attraverso un capillare contenente poli-acrilamide.
1. I coloranti coniugati ad ogni frammento di DNA sono individuati e letti.
1. I dati sono poi riportati come picchi colorati corrispondenti ad ogni ddNTPs.
6. Si possono leggere fino 1,200 bp per reazione e 96 reazioni si possono analizzare ogni 3 hours usando un capillare per la separazione.

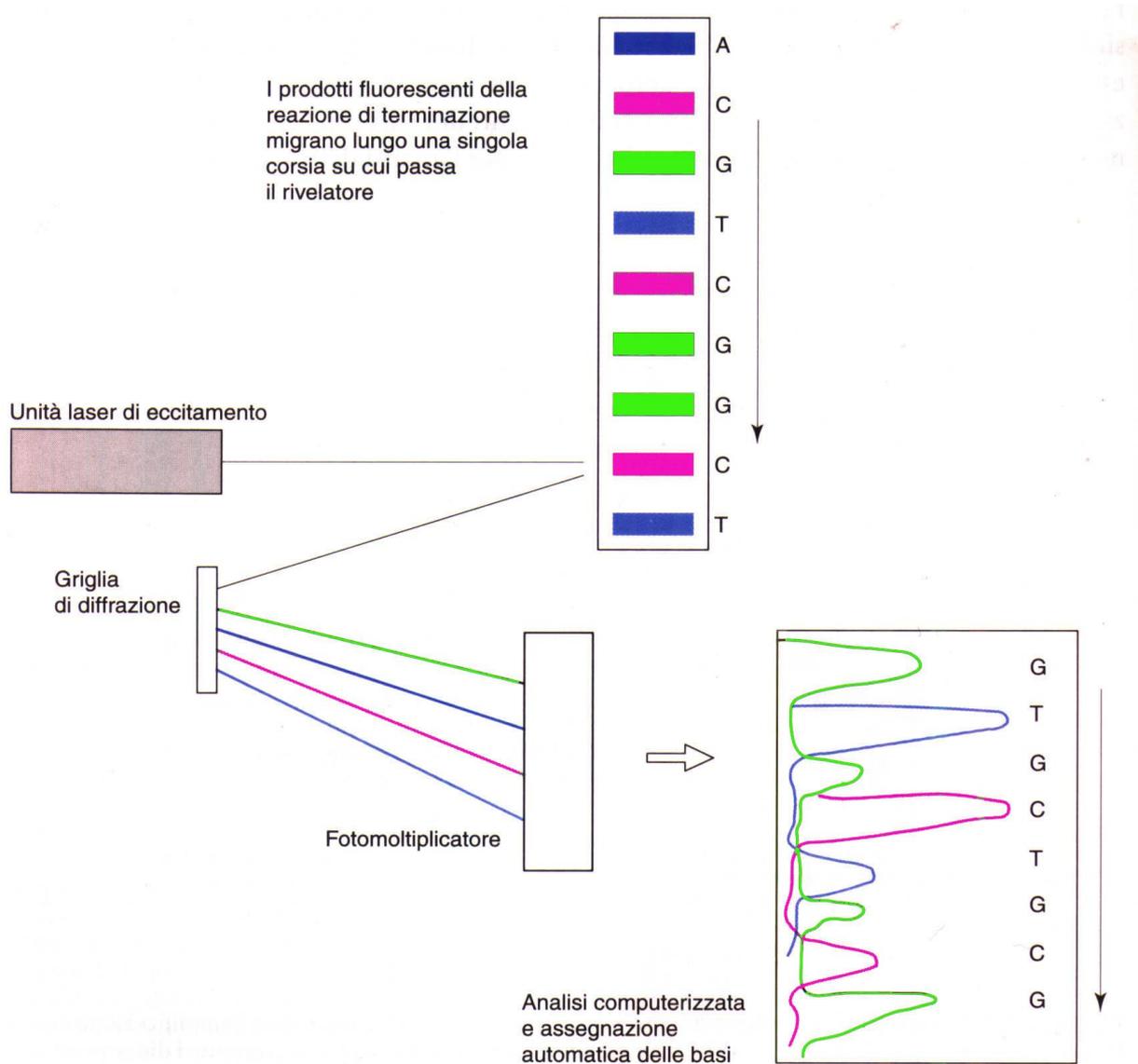
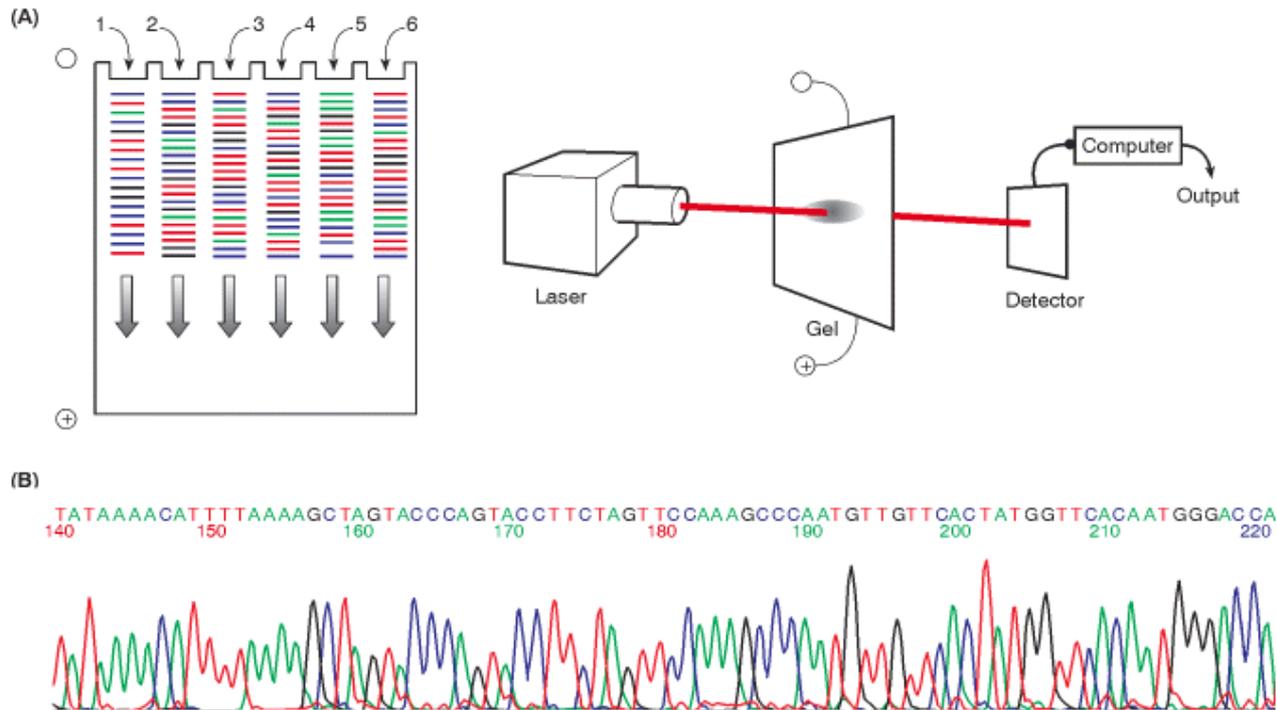
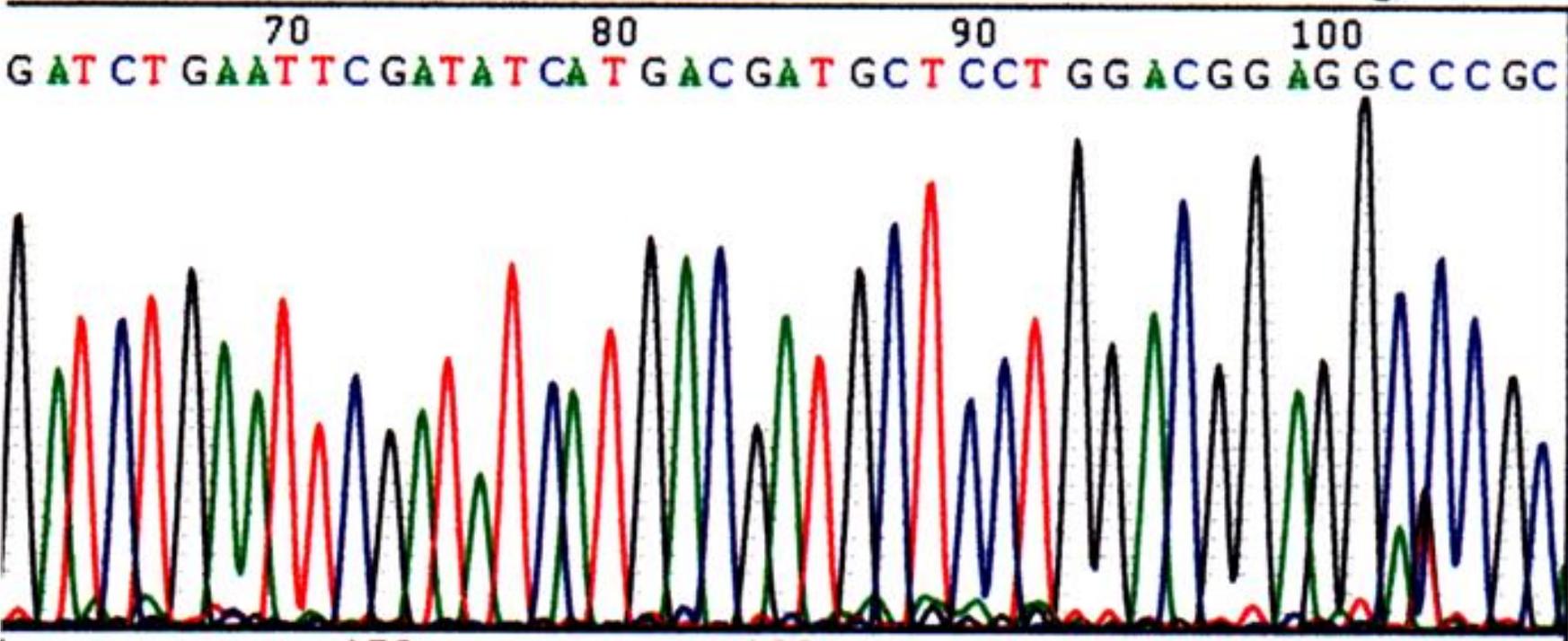


Figura 2.39 Rivelazione automatizzata della fluorescenza di sequenza, utilizzando una singola corsia di un gel e un fotomoltiplicatore.

Sequenziamento automatizzato con uso di didesossinucleotidi fluorescenti



Elettroferogramma



Confronto metodi di sequenziamento

Sanger

- ☑ rapida e semplice attuazione
- ☑ disponibilità di kit
- ☑ necessità di primer
- ☑ sensibile a strutture secondarie

Maxam e Gilbert

- ☑ lunga preparazione del DNA
- ☑ reazioni da mettere a punto
- ☑ relativamente economico
- ☑ strutture non influenti
- ☑ utilizzabile per oligonucleotidi

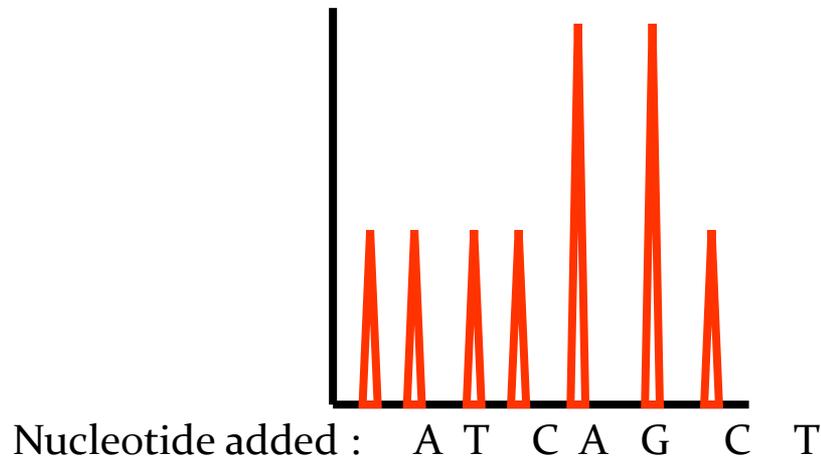
Metodo alternativo di sequenziamento: Pyro-sequencing

- ▶ Pyro-sequencing si basa sulla generazione di un segnale luminoso attraverso il rilascio di pirofosfato (PPi) dal nucleotide addizionato.
 - $\text{DNA}_n + \text{dNTP} \rightarrow \text{DNA}_{n+1} + \text{PPi}$
- ▶ PPi è usato per generare ATP da adenosina fosfosolfato (APS) con una ATP sulfurilasi.
 - $\text{APS} + \text{PPi} \rightarrow \text{ATP}$
- ▶ ATP e luciferasi generano luce convertendo luciferina a ossiluciferina.

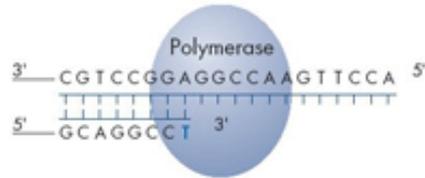
Pyro-sequencing

- ▶ Ogni nucleotide è aggiunto di volta in volta.
- ▶ Solo uno dei quattro nucleotidi genererà un segnale luminoso.
- ▶ I nucleotidi rimanenti sono rimossi enzimaticamente.
- ▶ Il segnale luminoso è raccolto su un pirogramma.

DNA sequence: A T C A GG CC T

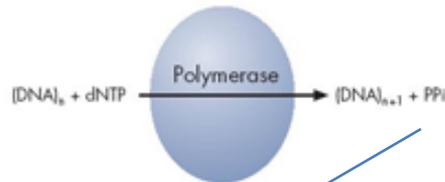


Pirosequenziamento



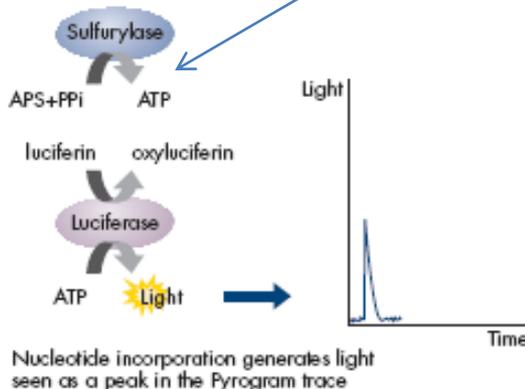
Step 1

Il bersaglio è un singolo filamento ottenuto da amplificazione con PCR. Un primer per sequenziamento viene ibridizzato al bersaglio e incubato con DNA polimerasi, ATP sulfurilasi, luciferasi, e apirasi in presenza dei substrati, adenosine 5' fosfosolfato (APS) e luciferina.



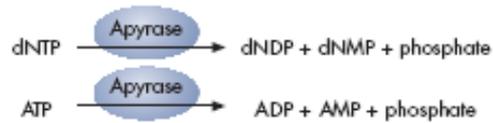
Step 2

Il primo dei quattro dNTP è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'incorporazione del dNTP se esso è complementare allo stampo. Ogni evento di incorporazione è accompagnato dal rilascio di PPi in quantità equimolare all'ammontare dei dNTP incorporati.



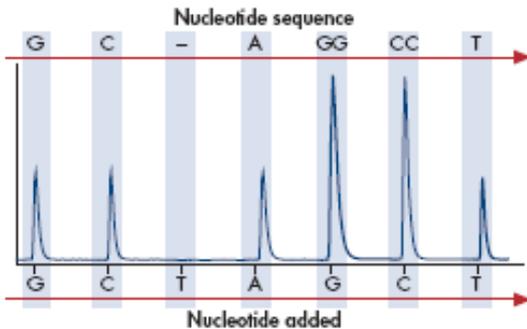
Step 3

ATP sulfurilasi converte PPi in ATP in presenza di adenosina 5' fosfosolfato (APS). L' ATP supporta energeticamente la conversione della luciferina in ossiluciferina ad opera della luciferasi. Si genera così un segnale luminoso che è proporzionale alla quantità di ATP generato. La luce prodotta è catturata da un charge coupled device (CCD) chip e tradotta in un picco (Pirogramma). L'altezza di ogni picco (intensità del segnale luminoso) è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.



Step 4

l'Apirasi, un enzima che degrada i nucleotidi, degrada continuamente i nucleotidi non incorporati e l'ATP. Quando la degradazione è completa un altro nucleotide viene aggiunto.



Step 5

L'aggiunta di dNTPs avviene sequenzialmente. Si noti che deossadenosina alfa-tio trifosfato (dATP·S) è usata come sostituto al naturale dATP poichè può essere usato come dNTP dalla DNA polimerasi, ma non è riconosciuto dalla luciferasi. Come il processo continua, il filamento complementare viene sintetizzato e il segnale dato dalle basi aggiunte va a costituire il tracciato del pirogramma.



Metodi alternativi di sequenziamento: Bisulfite Sequencing

- ▶ Bisulfite sequencing è usato per determinare la metilazione del DNA.
- ▶ Bisulfito deamina la citosina trasformandola così in uracile.
- ▶ Citosine metilate non sono cambiate dal trattamento con bisulfito.
- ▶ Lo stampo trattato con bisulfito è poi sequenziato.

Bisulfite Sequencing

- ▶ Le sequenze dello stampo trattato e non trattato con bisulfite vengono paragonate.

Methylated sequence: GTC^{Me}GGC^{Me}GATCTATC^{Me}GTGCA...

Treated sequence: GTC^{Me}GGC^{Me}GATUTATC^{Me}GTGUA...

DNA Sequence:

(Untreated) reference: ...GTCTGGCGATCTATCGTGCA...

Treated sequence: ...GTCTGGCGATUTATCGTGUA...

This sequence indicates that these Cs are methylated.

