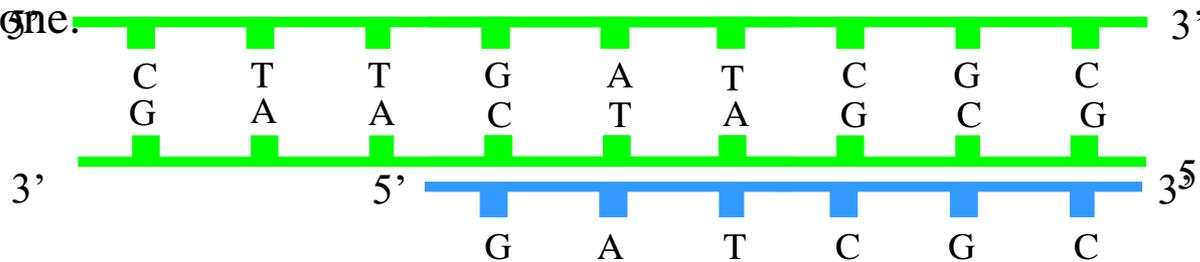


Tecniche per lo studio molecolare dei geni e dell'espressione genica

- Separazioni molecolari: elettroforesi su gels
- Cromatografia
- Traccianti marcati: sonde e ibridazione di acidi nucleici
- Blotting
- Ibridazione diretta ed inversa
- Amplificazione di bersagli, sonde e segnali
- Fingerprint
- EMSA e Footprinting
- Sequenziamento DNA

Ibridizzazione degli acidi nucleici

Il DNA a doppio filamento ha la proprietà di **dissociarsi**, in seguito a riscaldamento, nei singoli filamenti che lo compongono e di **rinaturare** in seguito all'abbassamento della temperatura, ovvero di riassociare le due sequenze nucleotidiche complementari di partenza (duplex) che erano state separate dalla denaturazione.



Questa proprietà può essere utilizzata anche per riassociare due filamenti di acido nucleico complementari di **diversa origine** a formare duplex stabili. In questo caso la reazione prende il nome di **ibridizzazione (ibridazione)**. Il filamento utilizzato per l'ibridizzazione di un DNA bersaglio può essere un **oligonucleotide** o un polinucleotide che prende il nome di **sonda** (probe) ed in genere è marcato in modo da essere evidenziato. Oppure può essere un **innesco** (primer) necessario per iniziare una reazione enzimatica di polimerizzazione (amplificazione).

Metodi di marcatura degli acidi nucleici

Ibridazione del DNA: sonde genetiche

- le sonde genetiche sono filamenti a singola elica di DNA o di RNA
- le sonde genetiche ibridizzano (si uniscono) un filamento bersaglio di DNA o di RNA
- la sonda ed il bersaglio devono essere complementari, ma a seconda delle condizioni la loro complementarità può non essere assoluta (cioè $< 100\%$)
- le sonde genetiche devono essere marcate altrimenti l'ibridizzazione non può essere rilevata
- le sonde genetiche possono essere utilizzate in vari esperimenti di *blotting* ed in tecniche *in situ* per identificare particolari sequenze nucleotidiche. Ad esempio in medicina possono aiutare l'identificazione di microrganismi o la diagnosi di particolari patologie

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.

Ibridazione del DNA: sonde non radioattive

Alcuni esempi di sonde radioattive sono:

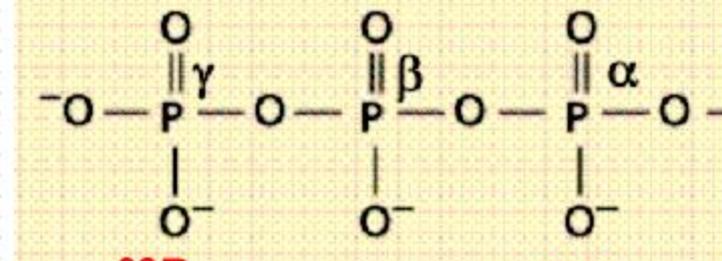
- **Biotina:** questa sostanza può essere evidenziata usando avidina o streptavidina che possiede una alta affinità per la biotina
- **Enzimi:** l'enzima viene legato alla sonda e la sua presenza viene rilevata da una reazione con un substrato che cambia colore. Esempi di enzimi sono la fosfatasi alcalina 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 isotopi radioattivi

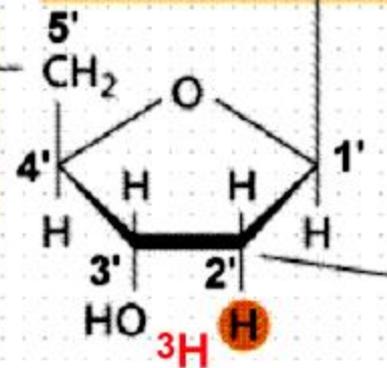
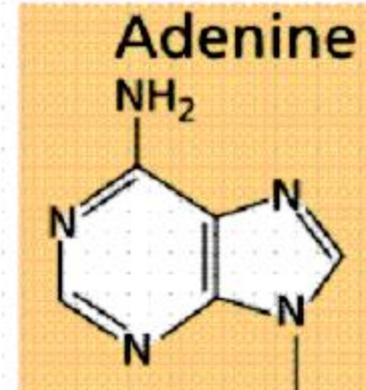
Deoxy-ATP
(deoxyadenosine triphosphate)

Phosphate groups



^{32}P
 ^{33}P

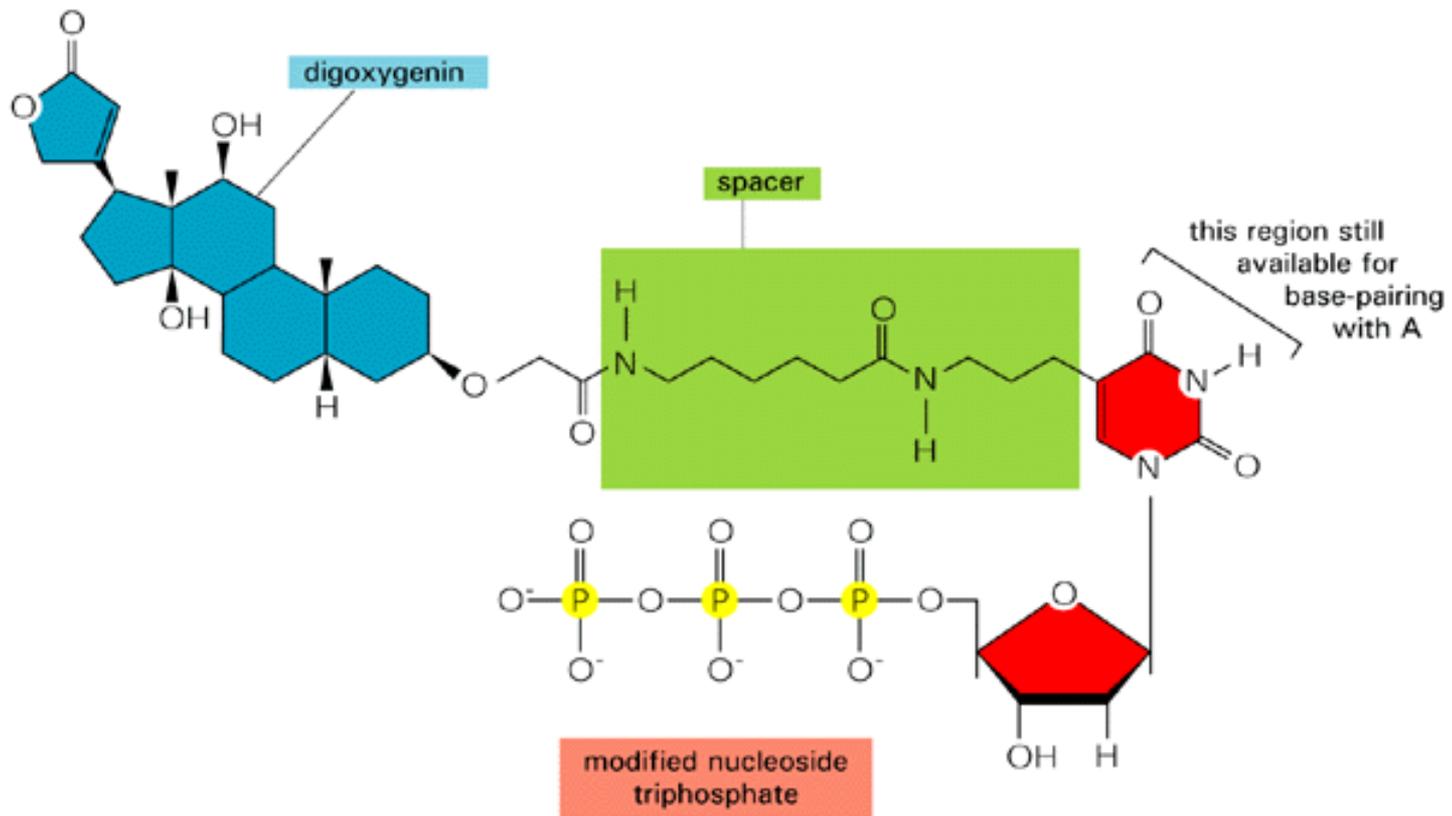
^{32}P
 ^{33}P
 ^{35}S



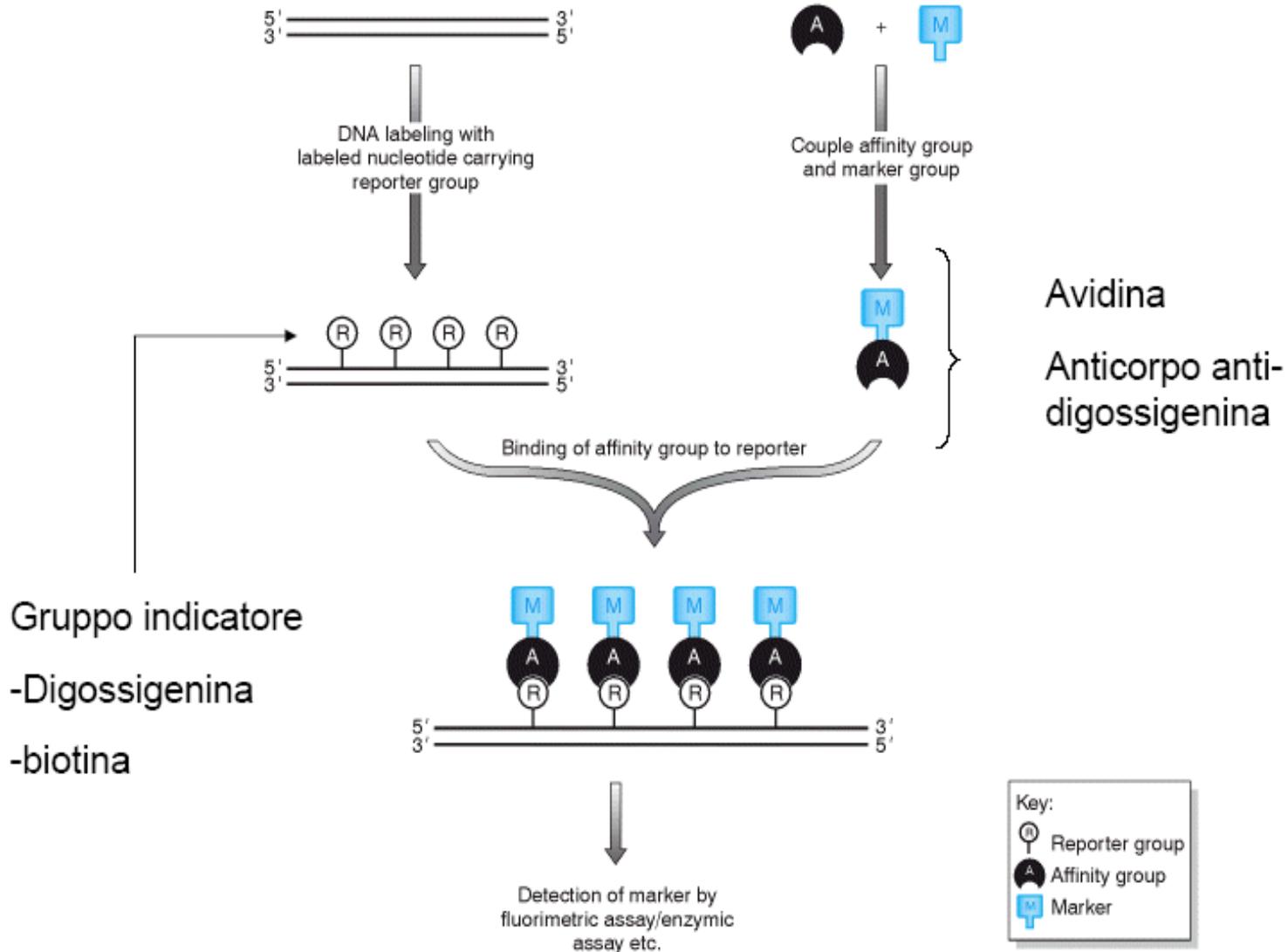
Deoxy-
ribose
sugar

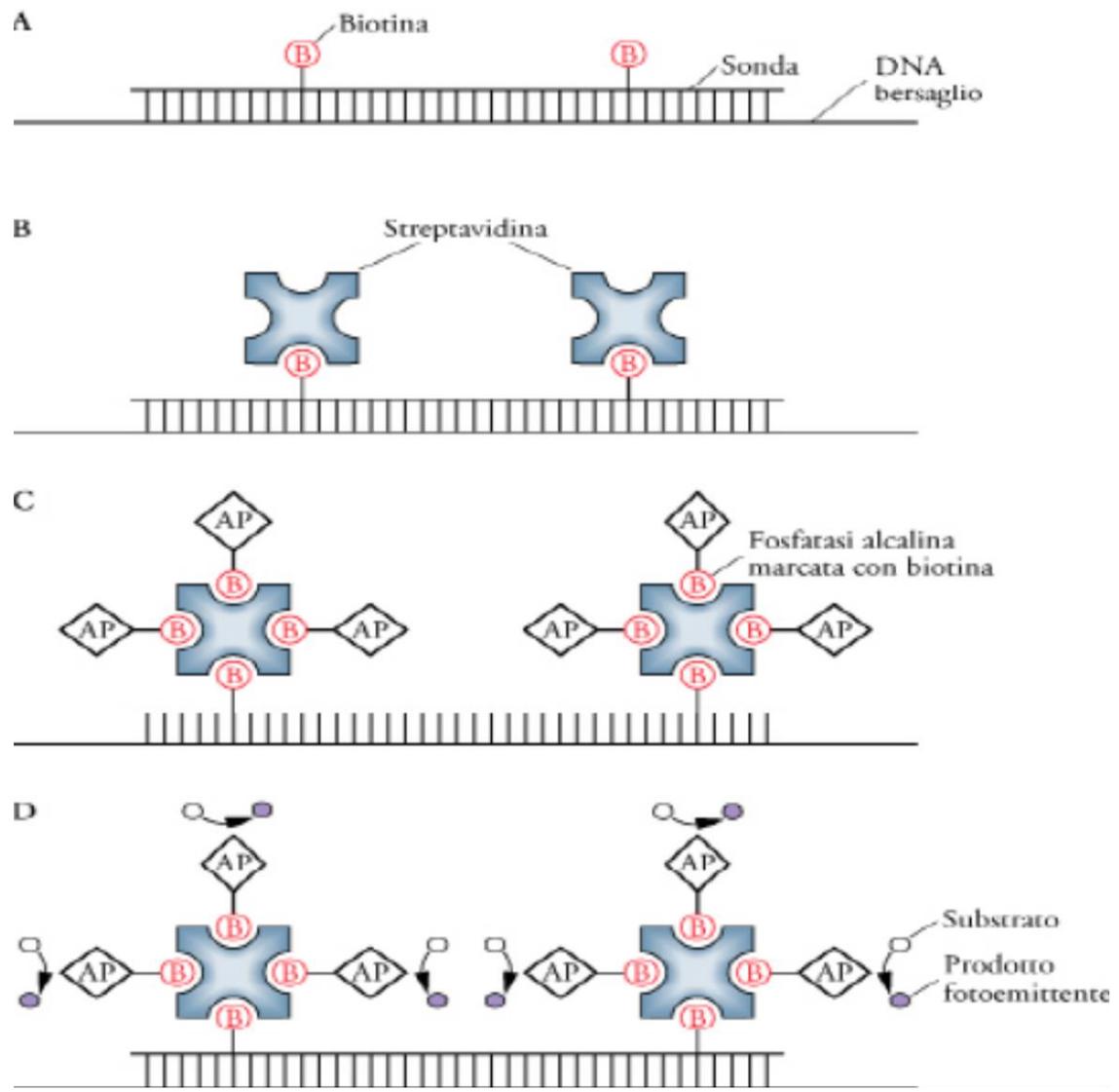
Traccianti utilizzati

Nucleotidi marcati con sostanze non radioattive



BIOTINA-DIGOSSIGENINA





Traccianti utilizzati

Nucleotidi marcati con sostanze non radioattive

- *Fluorocromi (marcatura diretta)*
- *Enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina)*
- *Digossigenina (riconosciuta da anticorpi specifici marcati con fluorocromi o enzimi)*
- *Biotina (riconosciuta da avidina marcata con fluorocromi o enzimi)*

Chemiluminescenza

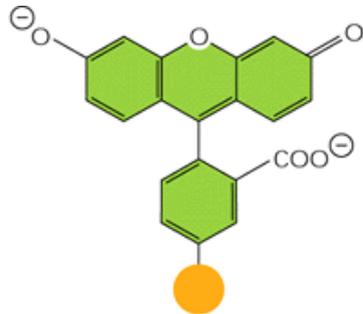
*** Sistema rapido e sensibile**

*** La luce è prodotta rapidamente dopo pochi minuti ma non è stabile. Il rilevamento va fatto subito.**

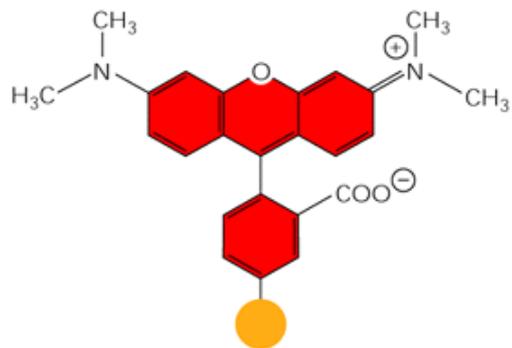
*** 1 pg di DNA può essere visionato dopo 1 ora di esposizione su pellicola per autoradiografia.**

E' spesso usato l'enzima perossidasi di rafano (HRP) accoppiato al luminol (5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione): se ossidato in presenza di perossido, il luminol dà origine ad una molecola che emette luce a 425 nm durante la sua decomposizione allo stato fondamentale.

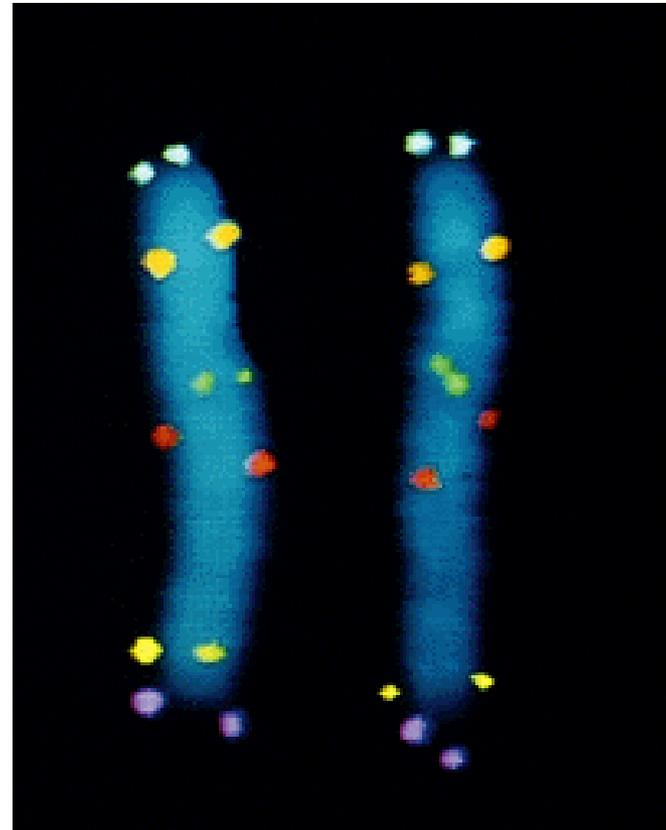
Traccianti utilizzati



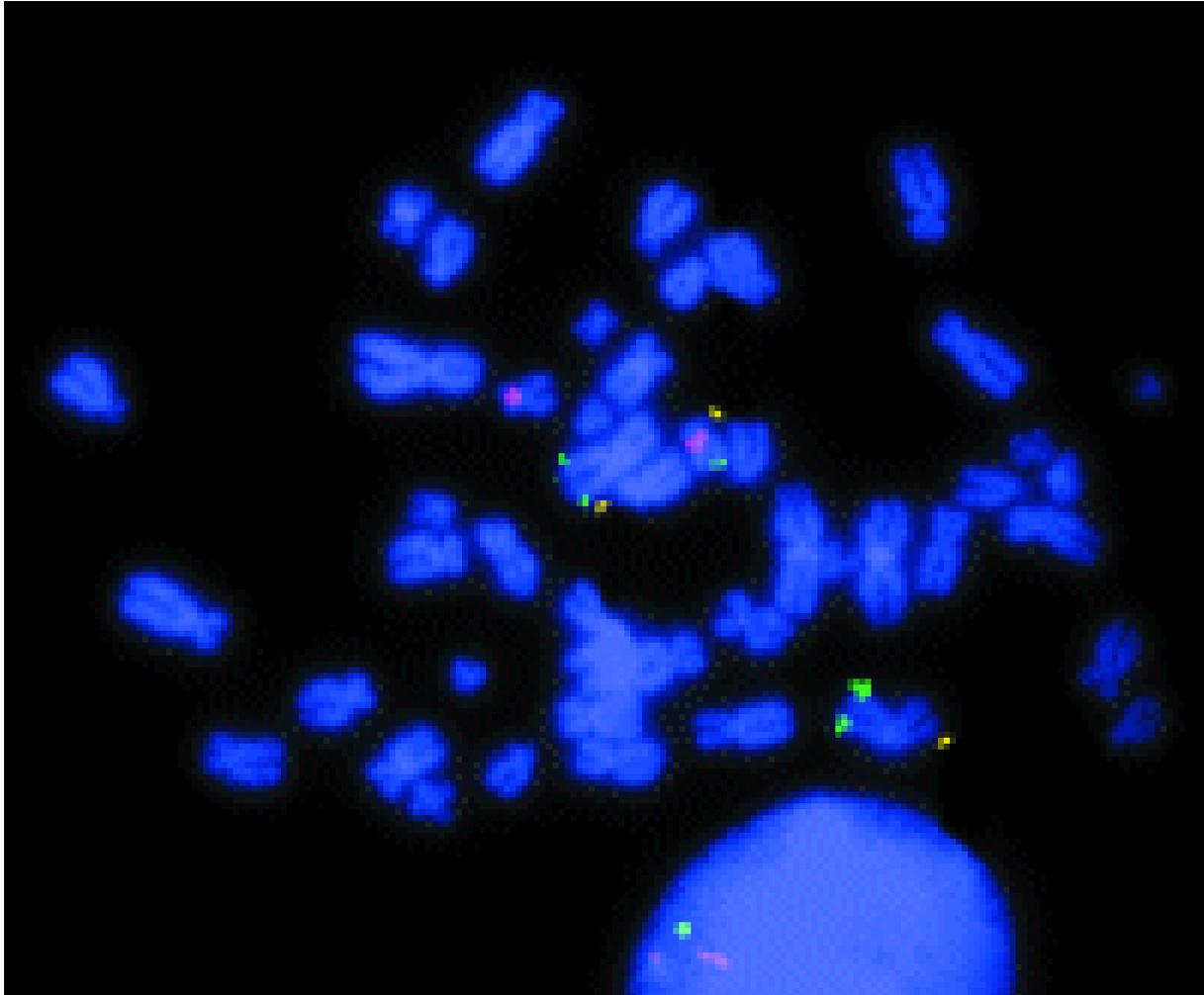
fluorescein (green)



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

Ibridazione del DNA: metodi di marcatura

Nick translation

E' il metodo più comune per marcare il DNA anche se il termine translation può generare qualche confusione: non c'entra nulla con la "traduzione" dell'RNA messaggero nella catena polipeptidica.

Tale metodo consta dei seguenti passaggi:

1. sono introdotte delle rotture della doppia elica di DNA utilizzando l'enzima DNAasi I che produce frammentazioni casuali nelle eliche
2. Questo danno viene quindi riparato sfruttando l'enzima DNA polimerasi I in presenza di nucleotidi liberi marcati
3. Tali nucleotidi sono incorporati nel DNA che risulta così marcato

Il numero di nucleotidi marcati incorporati è proporzionale al tempo nel quale la reazione viene proseguita.

Ibridazione del DNA: metodi di marcatura

Primer extension

Tale metodo contempla i seguenti steps:

1. Il DNA di interesse è denaturato a dare filamenti a singola elica
2. Sono aggiunte sequenze primer o sequenze complementari ad una specifica sequenza di interesse
3. Si aggiunge l'enzima DNA polimerasi insieme con nucleotidi liberi marcati
4. Eliche complementari di DNA vengono sintetizzati a partire dai primers aggiunti con l'incorporazione di nucleotidi marcati.
5. Il DNA viene nuovamente denaturato per rilasciare la sonda genetica marcata

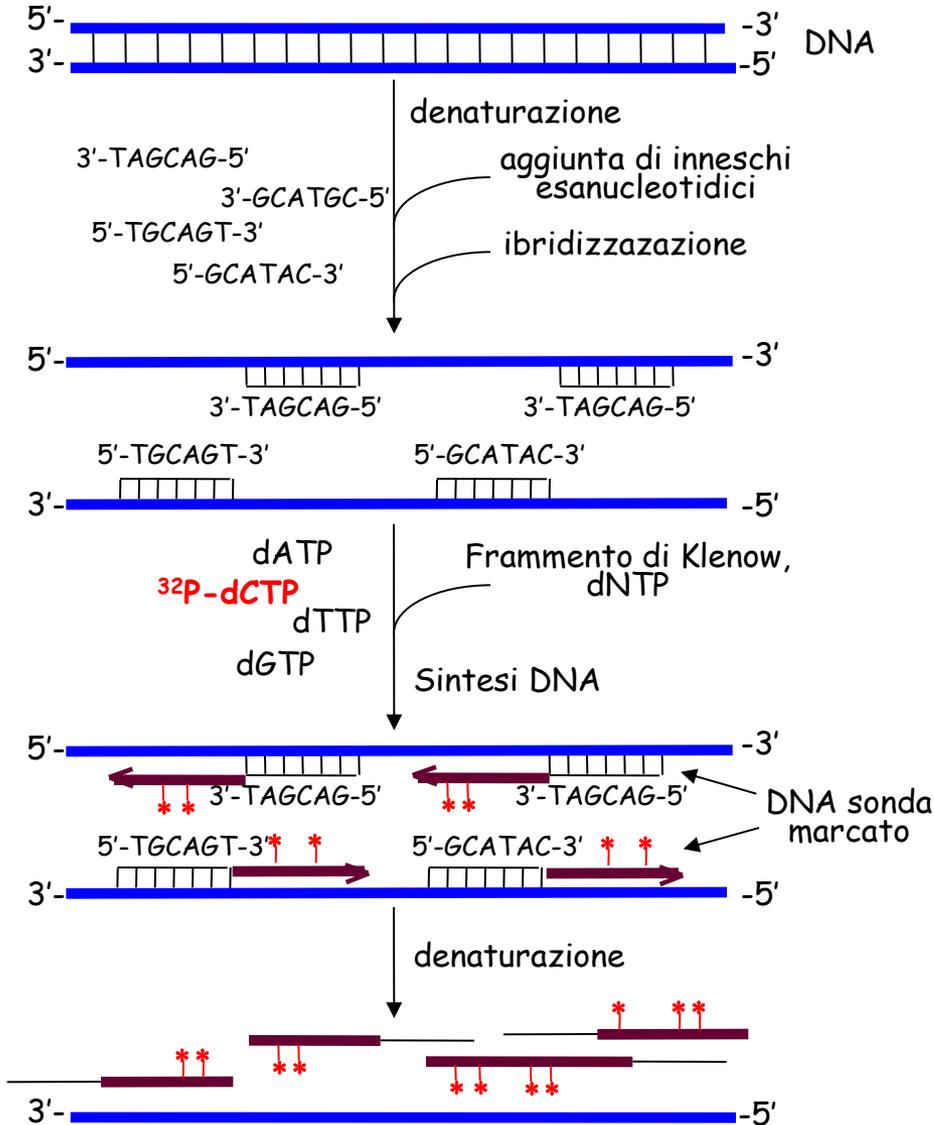
RNA polimerasi

Si utilizza per sintetizzare RNA marcato a partire da filamenti di DNA impiegati come stampo e aggiungendo ribonucleotidi marcati.

MARCATURA delle SONDE OLIGONUCLEOTIDICHE

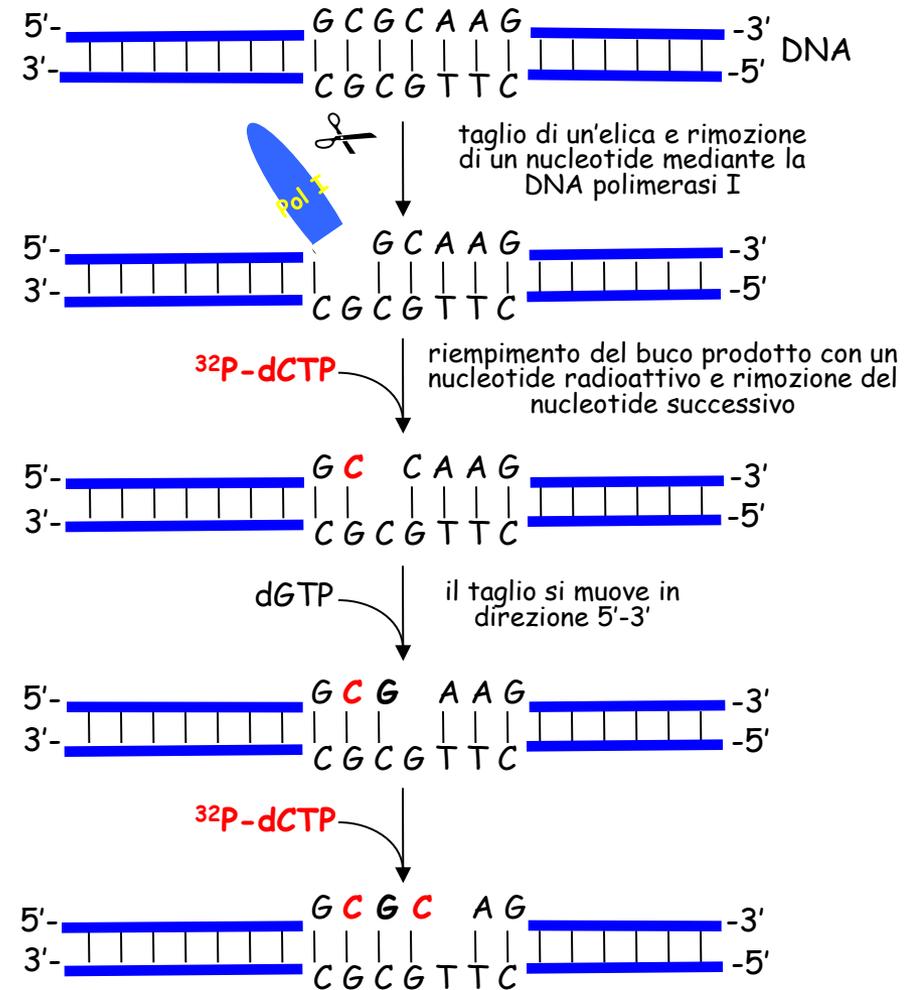
RANDOM PRIMING

Metodo dell'innesco casuale



NICK TRANSLATION

Spostamento dell'incisione



Ibridazione del DNA: metodi di marcatura

End labelling

La marcatura è attaccata alla parte terminale sia 3' che 5' sia di DNA che di RNA.

L'enzima polinucleotide chinasi viene utilizzato per catalizzare il trasferimento di un gruppo fosfato marcato alla terminazione 5' di una catena nucleotidica.

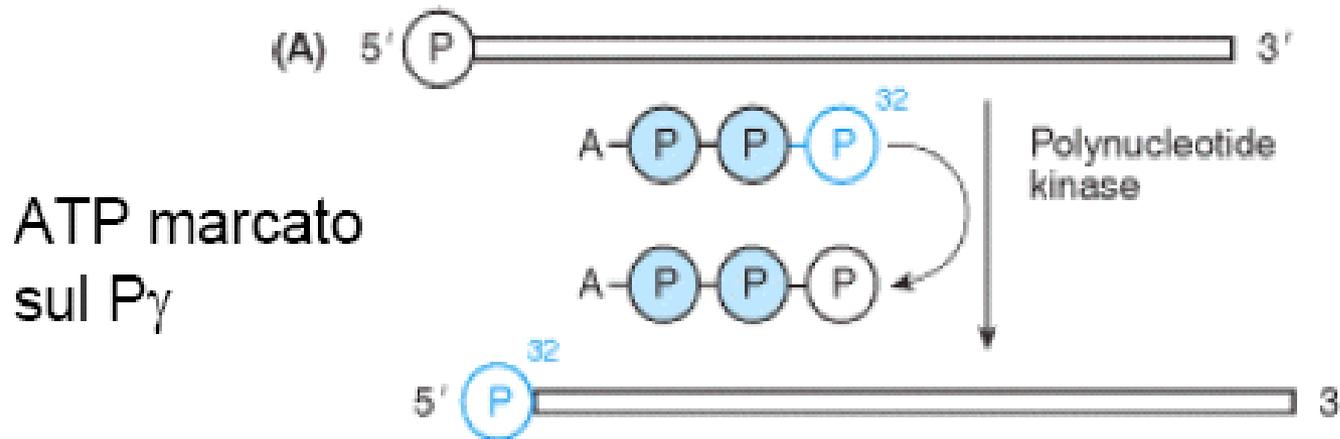
La sensibilità è minore poiché la marcatura è limitata alle terminazioni della sonda.

Marcatura diretta

Gli acidi nucleici possono essere marcati sfruttando reazioni specifiche che aggiungono atomi marcati alla catena nucleotidica come nel caso della reazione di alogenazione del DNA con ^{125}I .

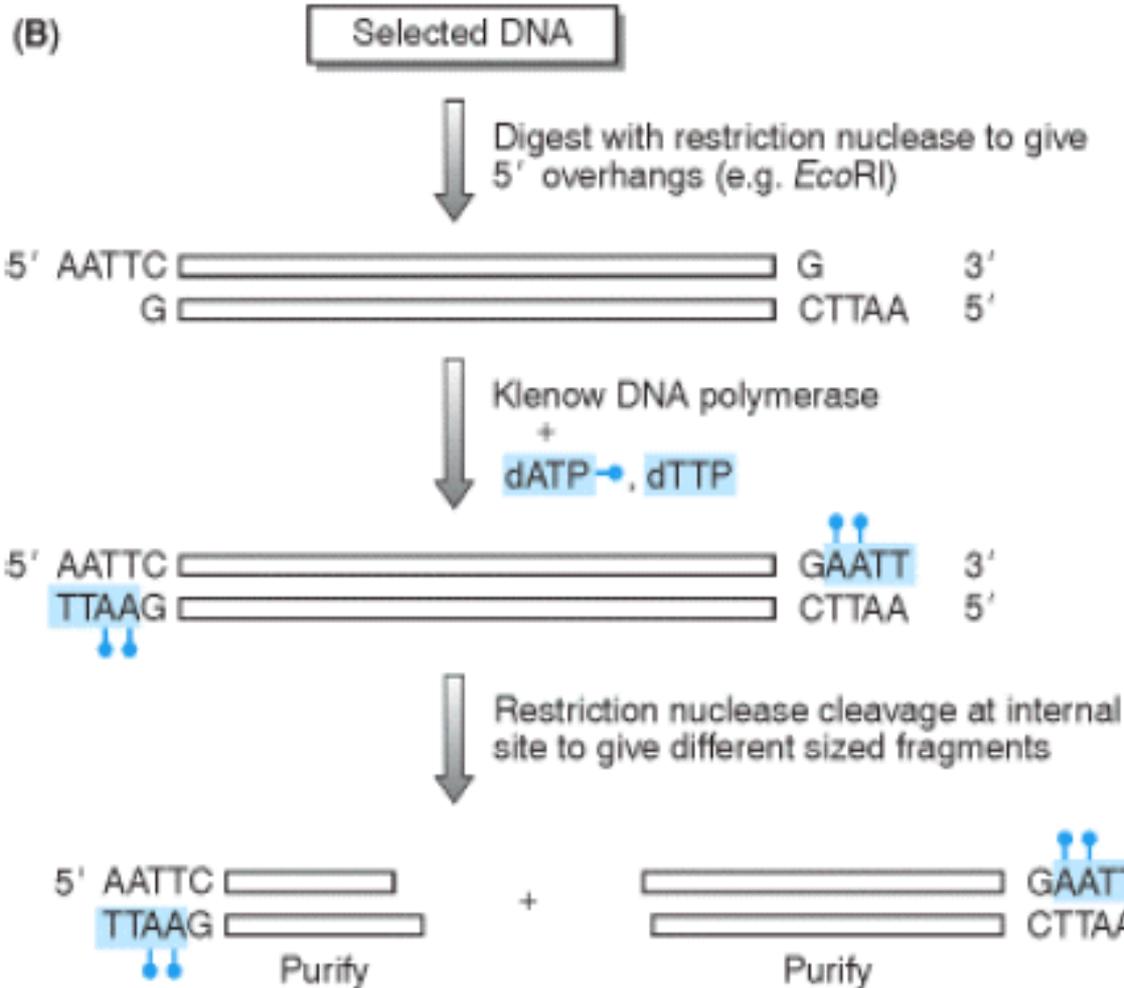
Indipendentemente dal metodo con cui si ottiene la sonda genetica la sequenza target viene amplificata con PCR per aumentarne la sensibilità

Marcatura sonda



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

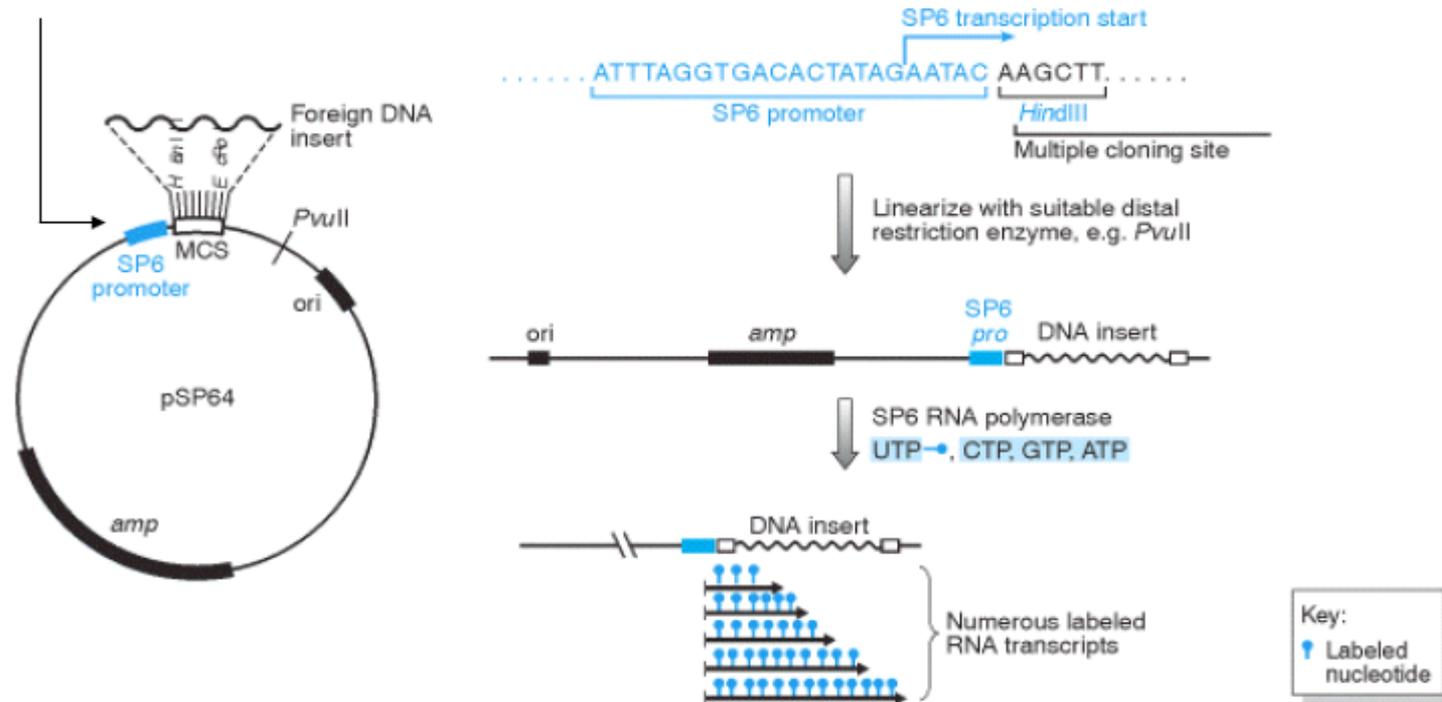
Marcatura sonda



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

Marcatura sonda

PROMOTORE FAGICO



Marcatura per incorporazione di nucleotidi marcati con sostanze radioattive (^{32}P) nella nascente catena di RNA

Tipico per sonde ibridazione in situ

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

Ibridazione del DNA: mescolare target e sonda

Su supporto solido (Dot blot)

La sequenza target è legata ad un supporto solido come un filtro da membrana e la sonda è aggiunta in soluzione: dopo lavaggio per rimuovere la sonda libera l'ibridazione viene rilevata sul supporto solido utilizzando il metodo più appropriato a seconda della marcatura.

In soluzione

Sia il target che la sonda sono liberi di muoversi così da massimizzare le opportunità di reazione: in tale modo la velocità di reazione è massima.

In situ

Con questo metodo la sonda in soluzione è aggiunta ad un preparato microbiologico o citologico che viene esaminato al microscopio. La sonda produce una variazione visibile nel campione se il target viene ibridizzato. La sensibilità è bassa, è utile per la ricerca di microrganismi in un campione.

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

L'ibridazione degli acidi nucleici ne richiede prima la denaturazione

Condizioni che possono destabilizzare la doppia elica provocando la separazione delle due catene (denaturazione):

- **Alte temperature**
- **pH alcalino estremo (>13)**
- **Bassa forza ionica [Na⁺]**
- **Presenza in soluzione di sostanze che rompono i ponti a idrogeno (urea, formammide).**

Condizioni dell'ibridazione

Quali sono le condizioni che aumentano la specificità del legame tra le due porzioni a singola elica degli acidi nucleici?

Il fattore principale che determina la specificità è la capacità di formare legami di idrogeno, che a sua volta dipende da 4 fattori esterni:

- Temperatura
- pH
- Forza salina
- Presenza di denaturanti

Gli acidi nucleici possono tollerare un certo grado di copie non complementari e formare comunque una doppia elica. Maggiori sono le coppie sbagliate e minore è la stabilità della doppia elica che tenderà pertanto a denaturarsi. Quindi si possono variare le condizioni operative per verificare la percentuale di complementarità tra le basi.

Da tali fattori dipende il grado di non complementarità tollerato e quindi la specificità di una sonda

Specificità delle sonde

fattori	↓ specificità	↑ specificità
temperatura	bassa	alta
pH	neutro	estremi
conc. salina	alta	bassa/nulla
denaturanti	bassa	alta
tolleranza	alta	bassa

Dei quattro fattori la temperatura è quello che può essere modificato con maggiore facilità e viene usato per saggiare la specificità di una sonda.

La discesa graduale della temperatura e la permanenza delle molecole per un certo tempo pochi gradi al di sotto della temperatura di denaturazione sono fondamentali affinché ci possa essere ibridazione, processo dipendente dai moti di agitazione termica. Se dopo la denaturazione la soluzione viene portata a bassa temperatura non si ha ibridazione, ma stabilizzazione della struttura secondaria delle singole catene.

Per mezzo dell'ibridazione si possono formare delle doppie eliche di DNA-DNA, DNA-RNA o RNA-RNA. La condizione fondamentale perché ciò avvenga è che in soluzione si mettano molecole con sequenza complementare (antiparallele). L'ibridazione è una forma di riconoscimento molecolare estremamente specifica.

Controllo della stringenza

- Temperatura
- Forza ionica del tampone

Sonde >100 nt

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41(\%G+C)$$

M=forza ionica del tampone (moli/litro)

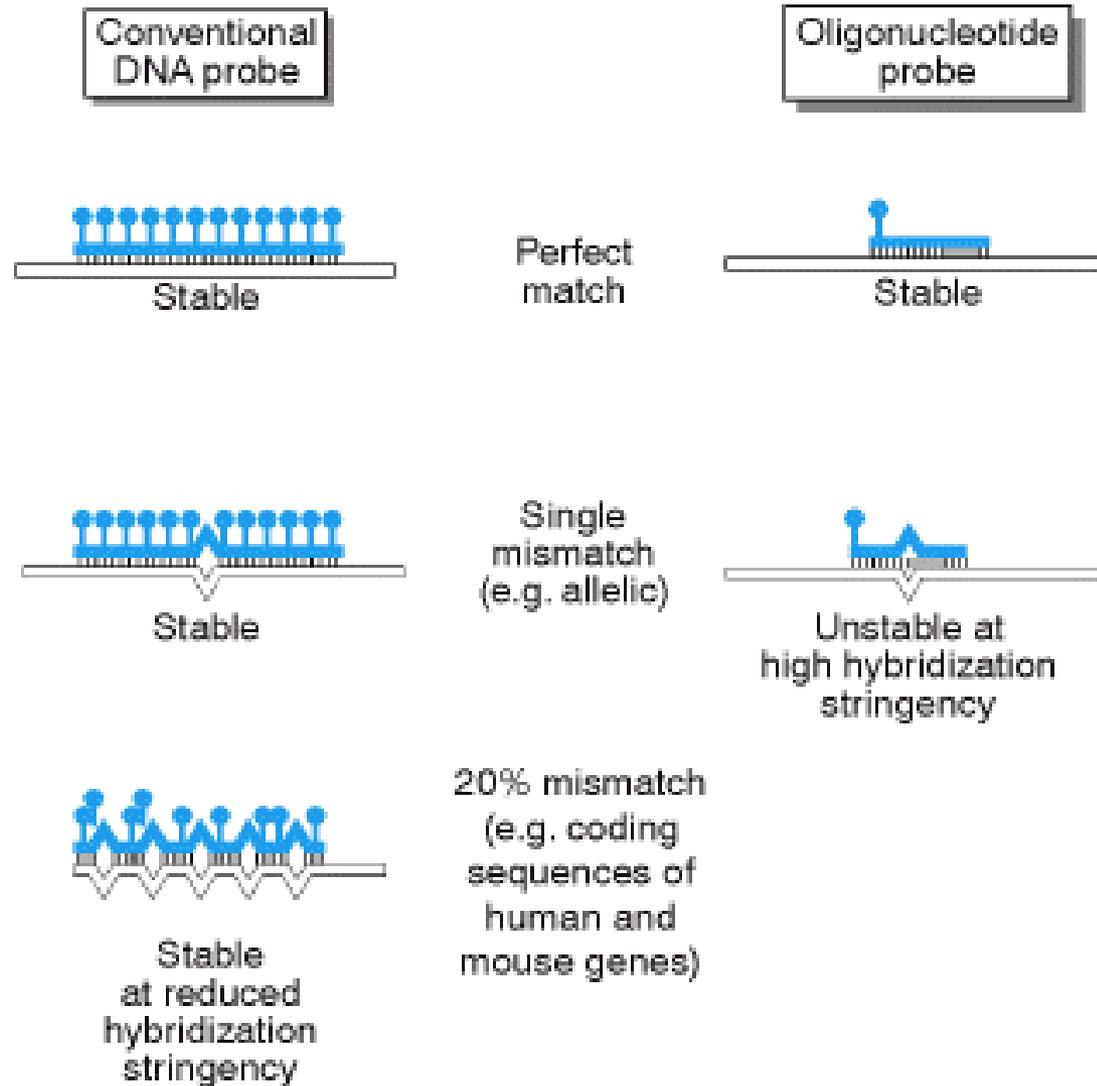
$$T \text{ ibridazione} = T_m - 25^\circ\text{C}$$

Sonde oligonucleotidiche

$$T_m = 4(\text{numero G+C}) + 2(\text{numero A+T})$$

$$T \text{ ibridazione} = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Effetti della stringenza di ibridazione



STRINGENZA

- **Condizioni di ibridazione piu' stringenti** (richiedono maggiore percentuale di omologia tra sonda e bersaglio):
 - maggiore Temperatura
 - minore [] salina
 - presenza di denaturanti chimici

- **Condizioni di ibridazione meno stringenti** (permettono minore percentuale di omologia tra sonda e bersaglio):
 - minore Temperatura
 - maggiore [] salina
 - assenza di denaturanti chimici

La lunghezza delle sonde

Oligonucleotidi corti hanno una lunghezza di 10-50 basi, mentre sonde lunghe hanno una lunghezza di qualche centinaio di basi. In condizioni ottimali di alta selettività una sonda dovrebbe essere capace di individuare il cambio di una coppia di basi in una sequenza nucleotidica.

Le sonde brevi hanno i seguenti vantaggi:

- più stabili nel tempo**
- più semplici da ottenere**
- ibridizzano più rapidamente ($t < 30$ min.)**

ed hanno i seguenti svantaggi:

- la quantità di marcatura è minore**
- la sensibilità è minore**

Applicazioni dell'ibridazione

Identificazione di mutazioni in sequenze nucleotidiche

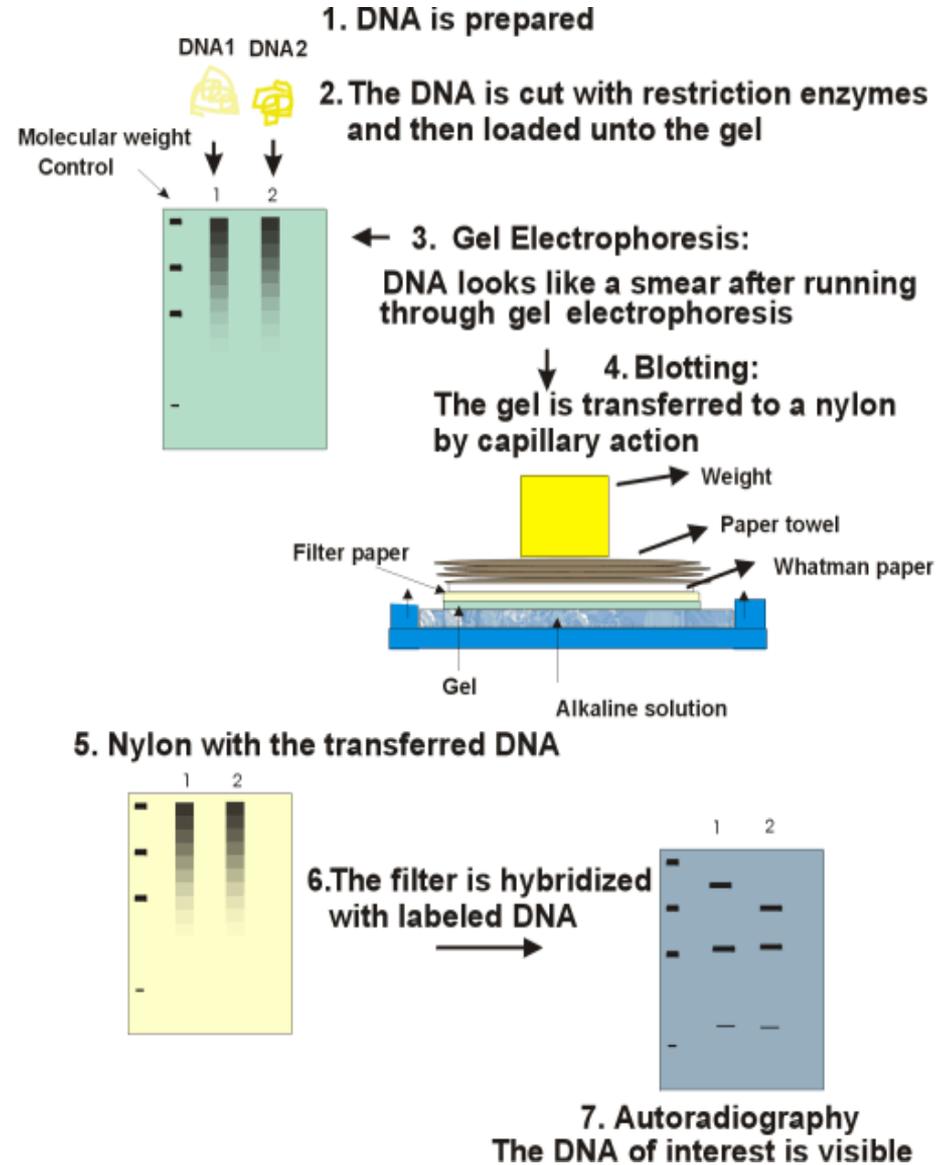
La ricerca di tali mutazioni può essere utilizzata per diagnosticare malattie ereditarie anche se molto spesso una malattia può essere indotta da più di una patologia. Per questo è necessario utilizzare sonde con bassa specificità o più sonde contemporaneamente. Tra le patologie diagnosticabili ricordiamo: fibrosi cistica, distrofia muscolare, fenilchetonuria e anemia.

Identificazione dell'impronta genica

Insieme alla PCR può essere utilizzata per determinare l'identità di una persona e viene usata nelle ricerche giudiziarie per confermare i sospetti su una persona o nei tests di paternità

il Southern Blotting

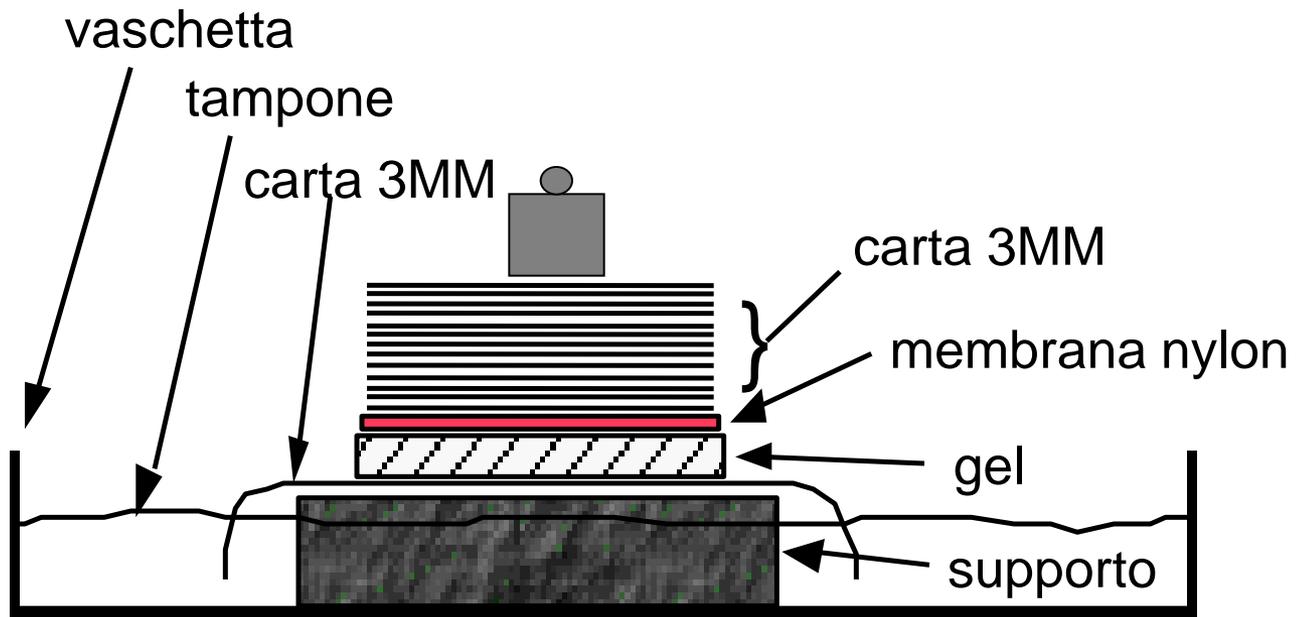
- Il DNA genomico è frammentato con opportuni enzimi di restrizione.
- I frammenti di restrizione di diversa lunghezza sono separati su gel di agarosio.
- I frammenti sono denaturati in filamenti singoli e trasferiti per capillarità su una membrana (blot), un supporto solido.
- I frammenti di DNA legati 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)



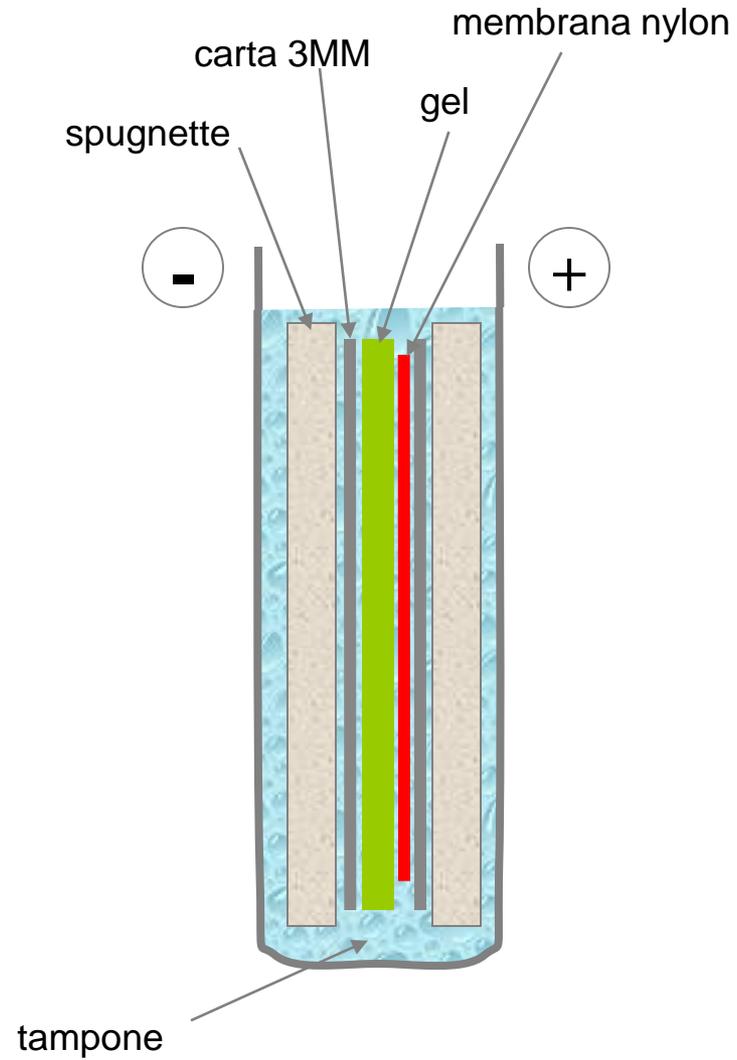
Metodi di trasferimento

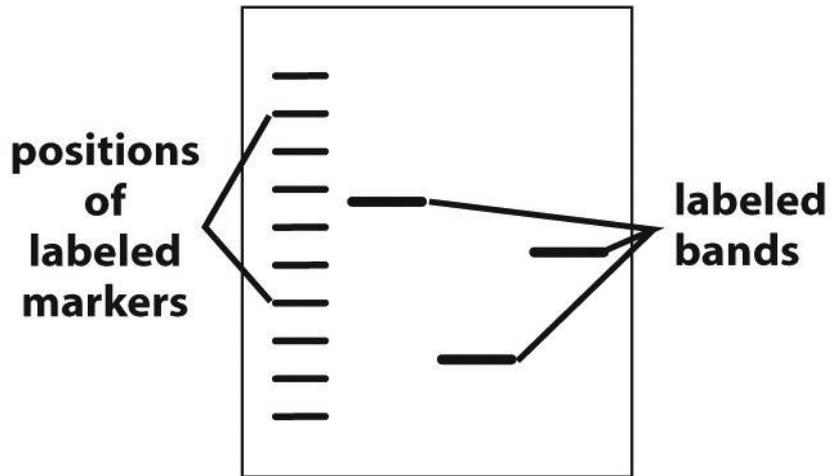
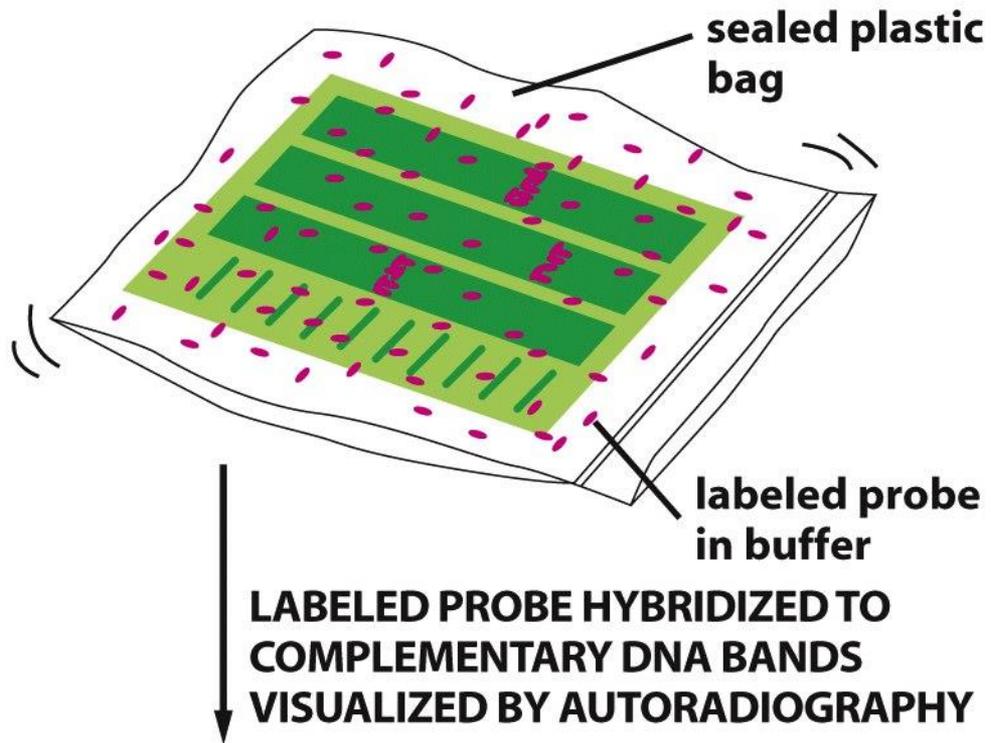
- **Capillare**
- **Elettroblot**

Assemblaggio del blot capillare



Assemblaggio dell'elettroblot

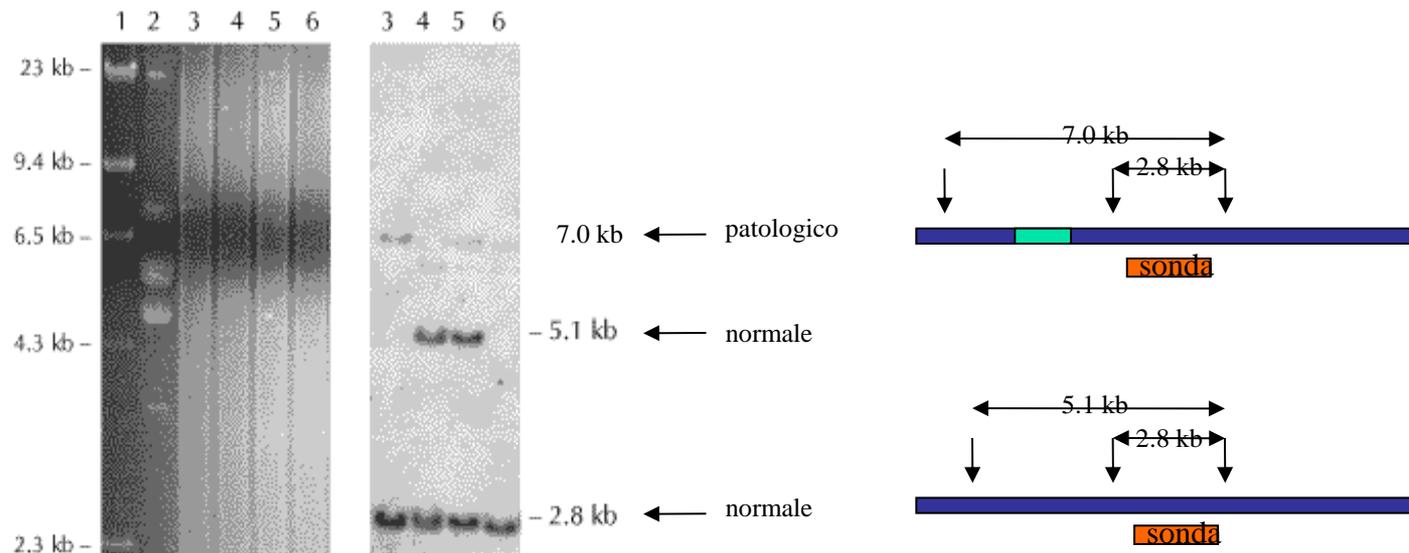




Applicazioni dell'analisi Southern blot

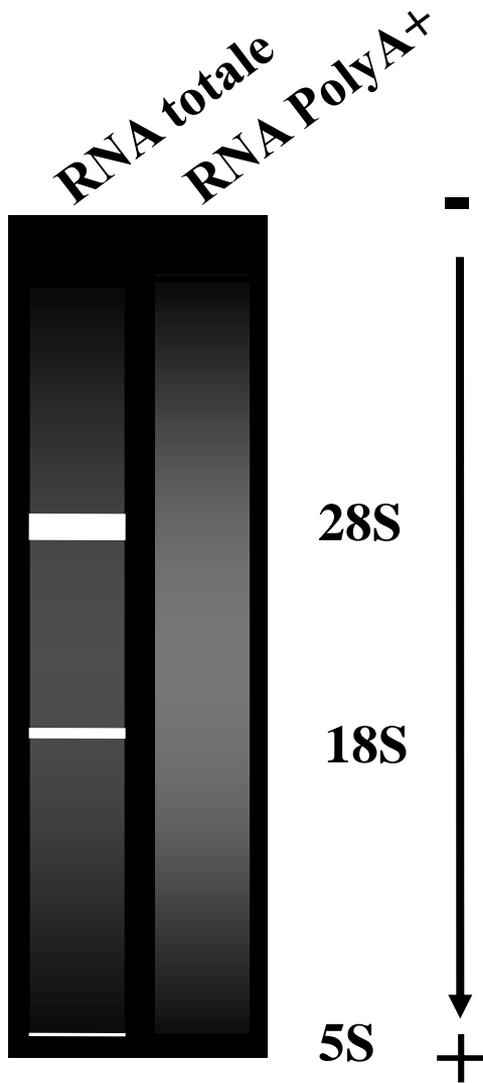
Tecnica utilizzata laddove variazioni della sequenza nucleotidica determinano una differenza della lunghezza dei frammenti di restrizione, i quali possono essere messi in evidenza ibridizzandoli con sonde specifiche. Esempi:

- Parziale o totale delezione di geni
- Variazioni della sequenza di un gene (polimorfismi e mutazioni)
- Variazioni del numero di copie di geni, riarrangiamenti dei geni (traslocazioni)



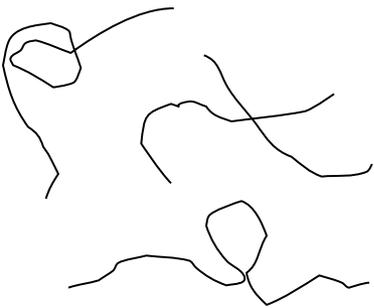
Come si fa a vedere se un gene è espresso?

Northern Blotting



- L'RNA (totale o poly-A+) viene frazionato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio denaturante (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.

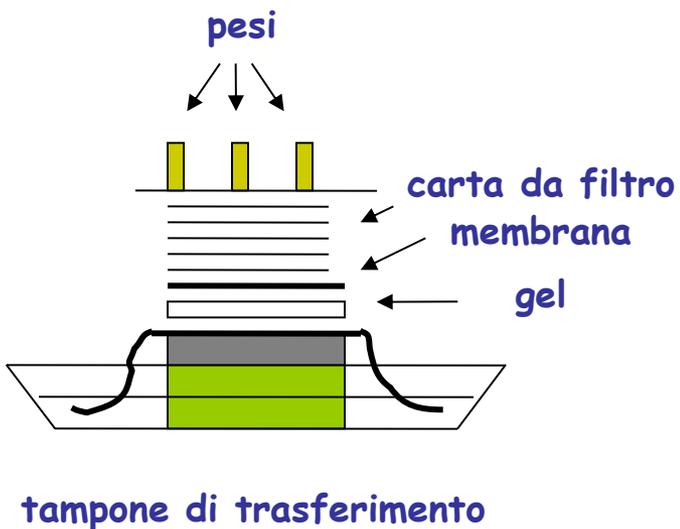
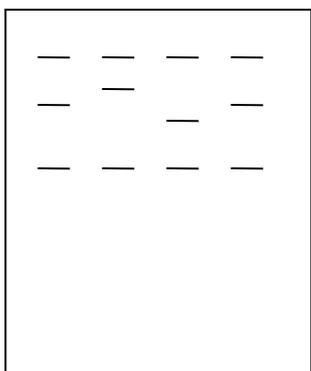
RNA totale



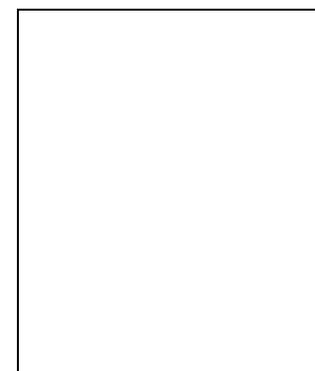
Esempio di Northern blotting

elettroforesi
denaturante

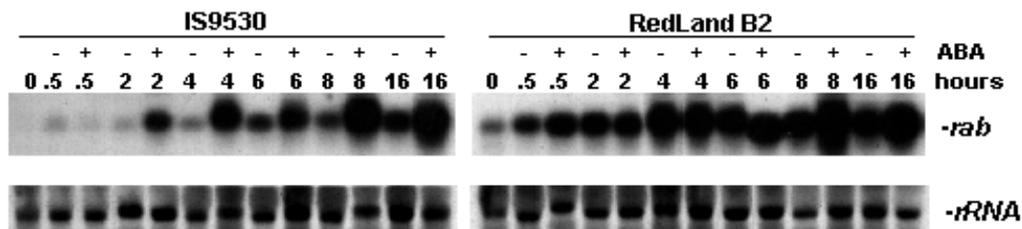
trasferimento
alcalino su
membrana



ibridazione
con sonda
radioattiva

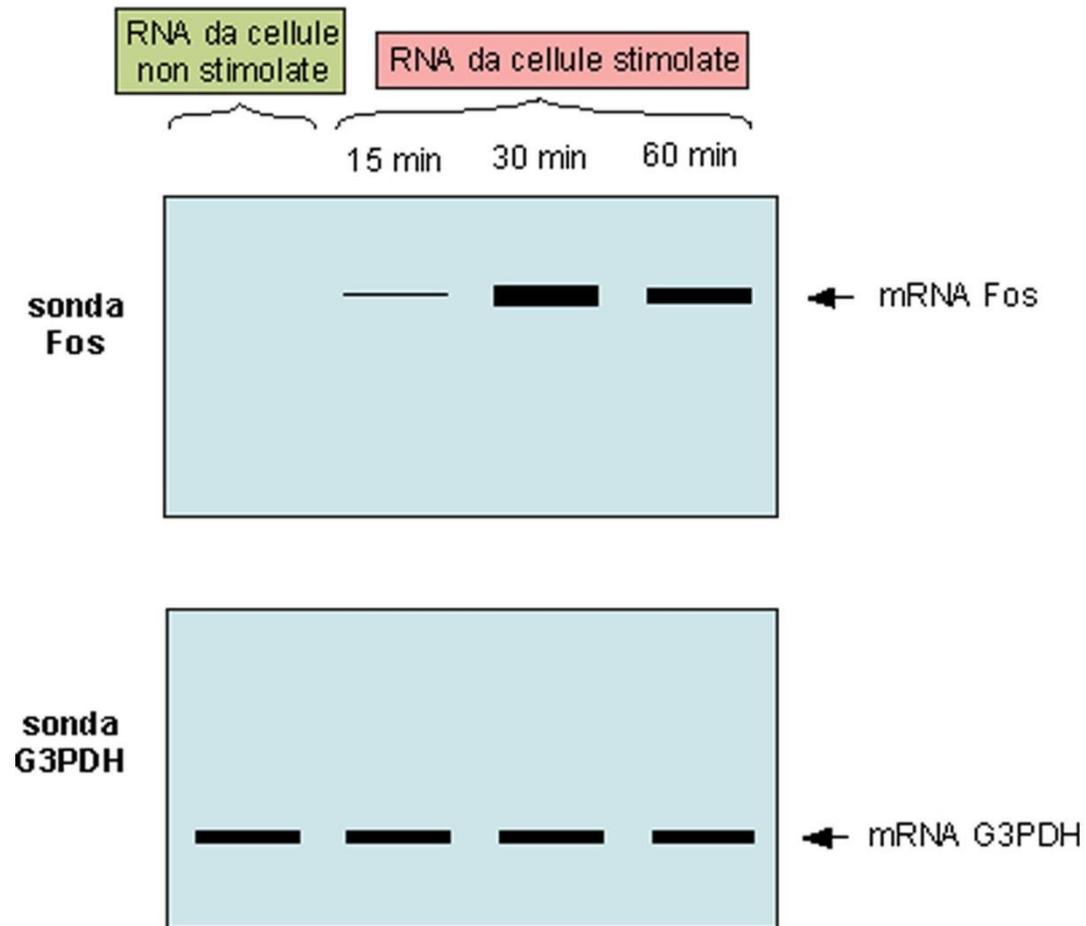


autoradiografia



Analisi di espressione con Northern blot

Schema esperimento di analisi di espressione mediante Northern blot

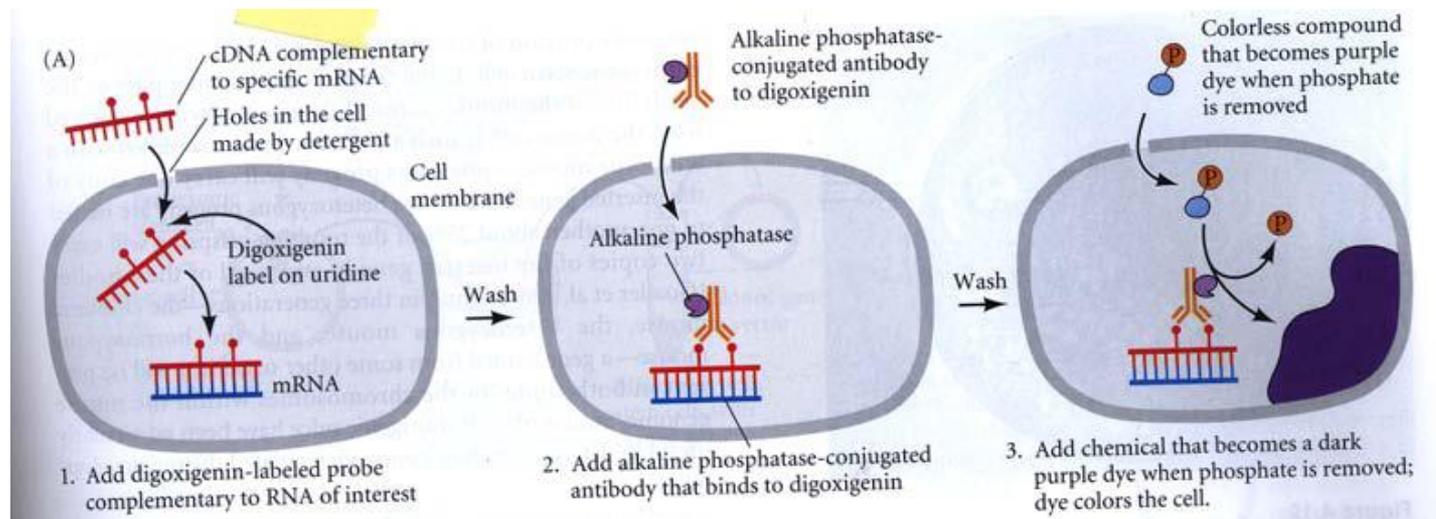


Caratteristiche del Northern Blotting

- **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.**

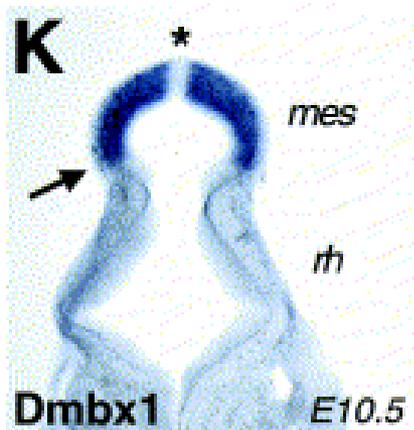
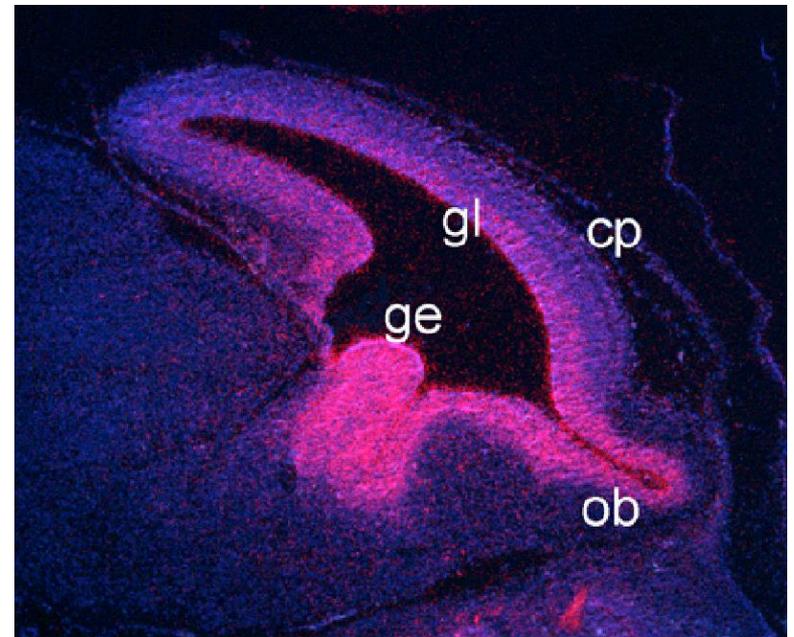
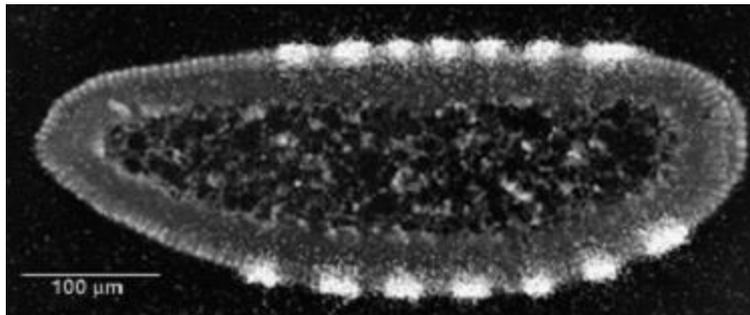
Ibridazione in situ

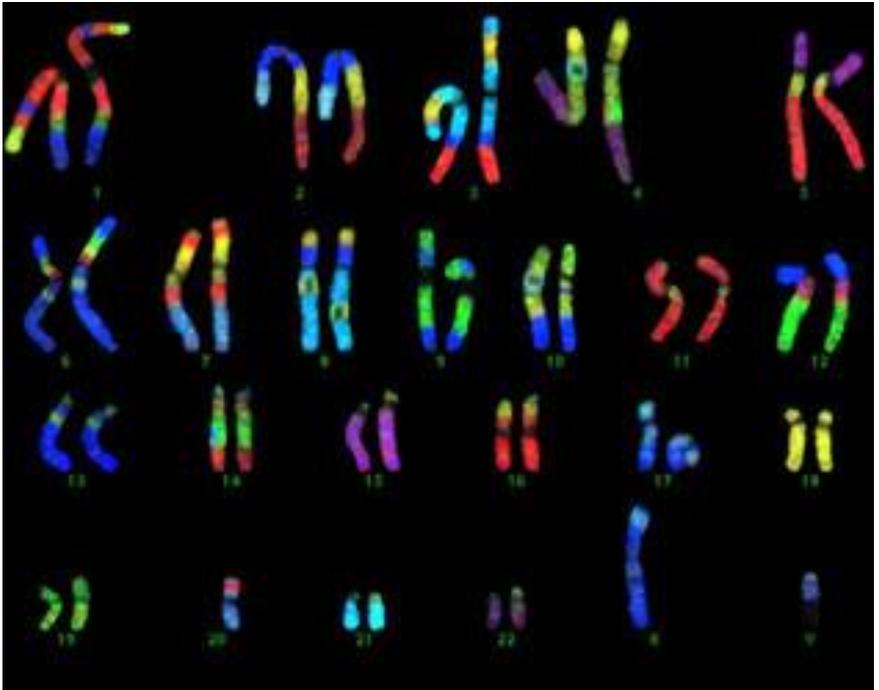
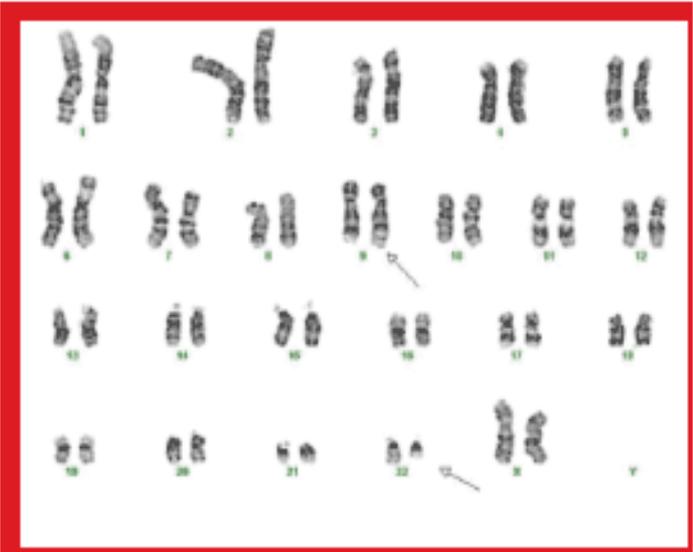
- Questa metodica si basa sull'ibridazione di sonde marcate direttamente su cellule o tessuti. Si può ibridare su sezioni istologiche o su materiale non sezionato (in quest'ultimo caso si parla whole-mount).
- E' l'unica tecnica che permette di localizzare l'espressione di un dato mRNA a livello delle singole cellule.
- Ideale per studiare i geni espressi in un gruppo ristretto di cellule all'interno di un tessuto, o i geni la cui espressione è modulata nel tempo e nello spazio (estremamente utilizzata negli studi di biologia dello sviluppo).



Ibridazione in situ

Esempi

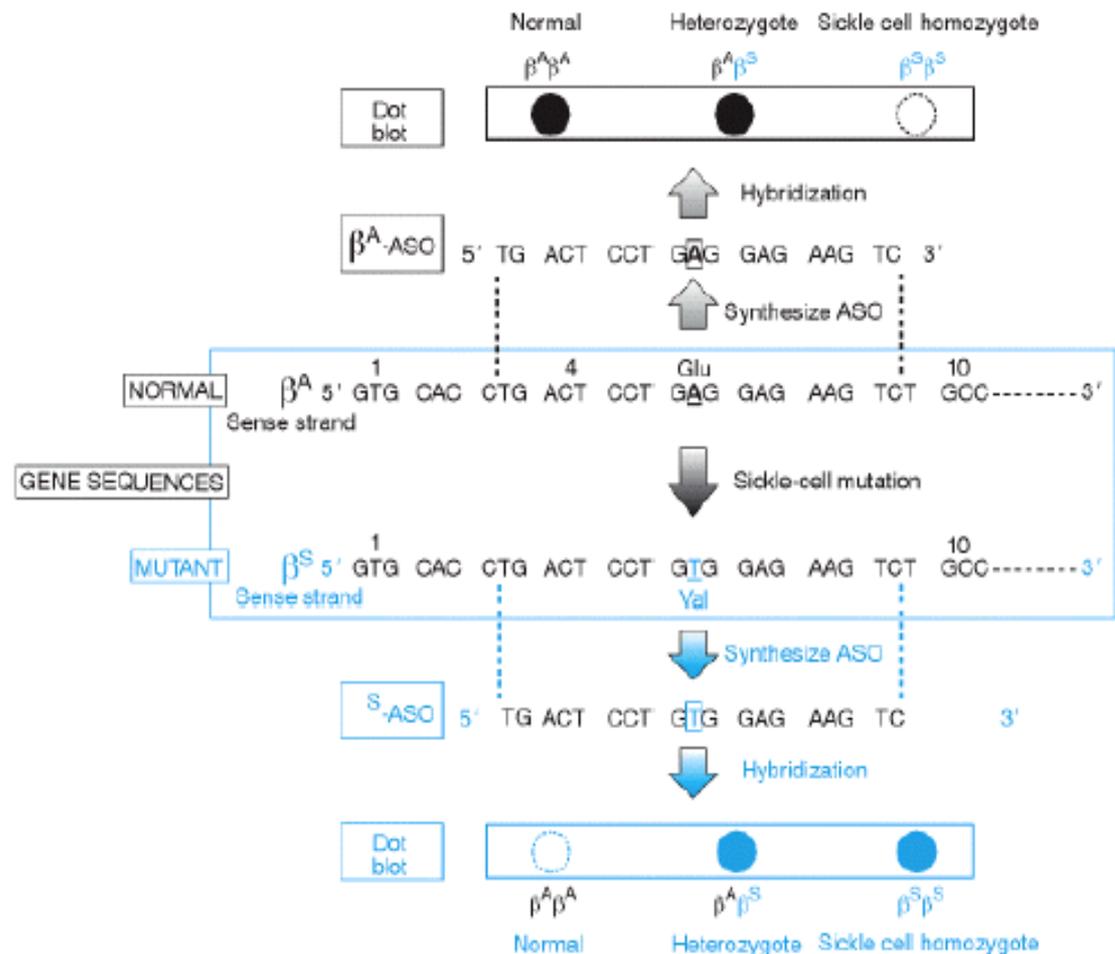




DOT-BLOT

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

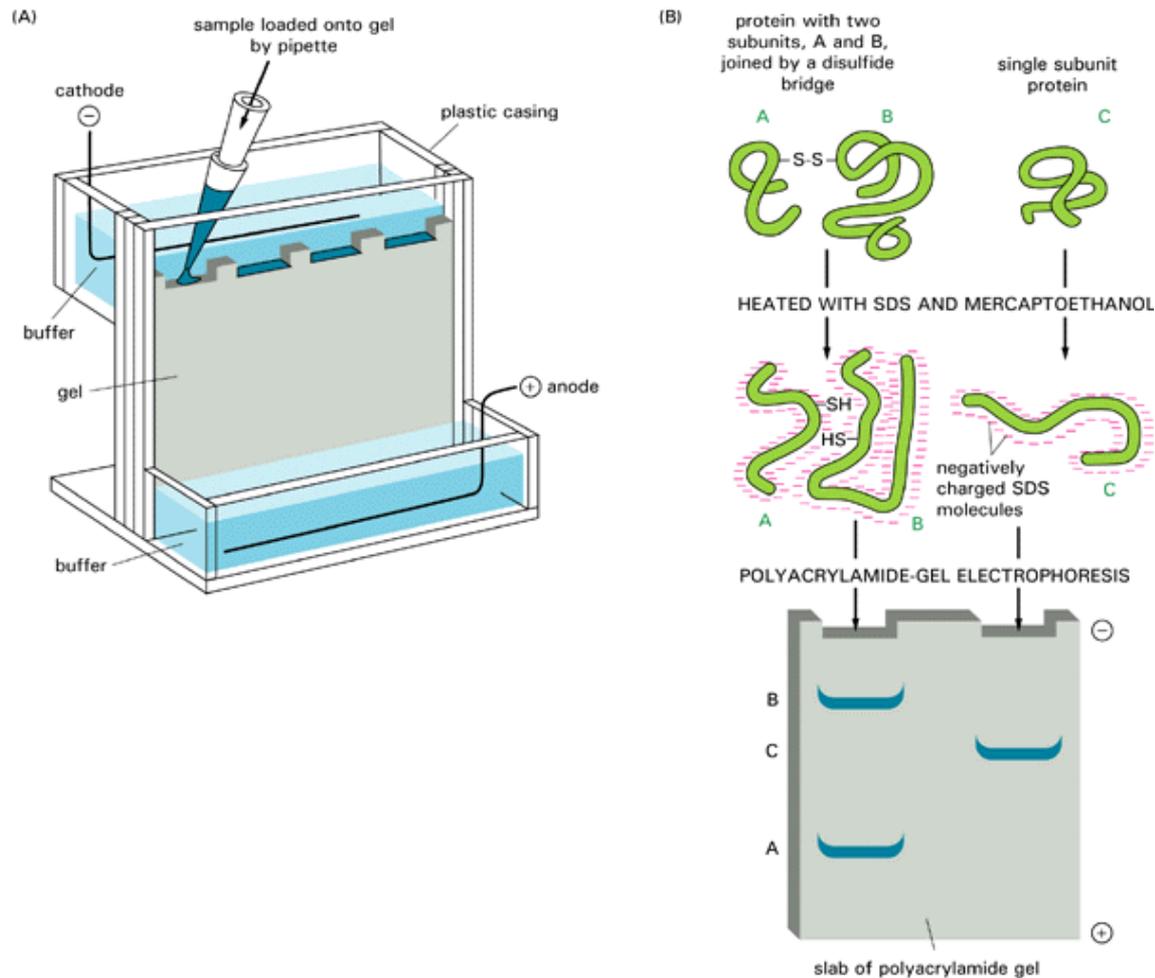
Basate su appaiamento perfetto



Misurazione espressione a livello della proteina

Western Blotting

SDS-PAGE

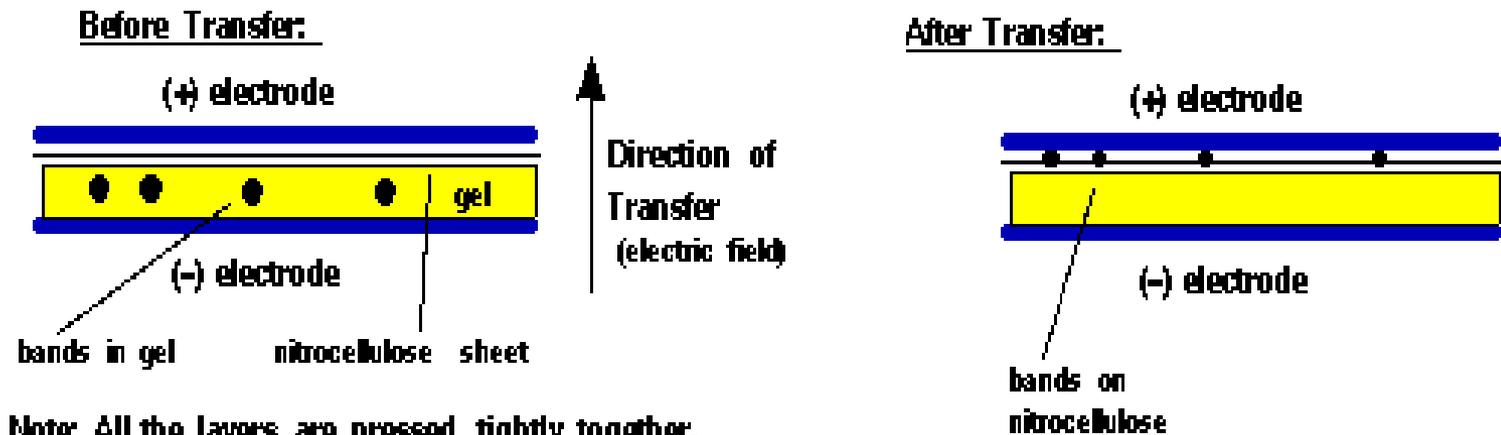


Misurazione espressione a livello della proteina

Western Blotting

Electroblotting

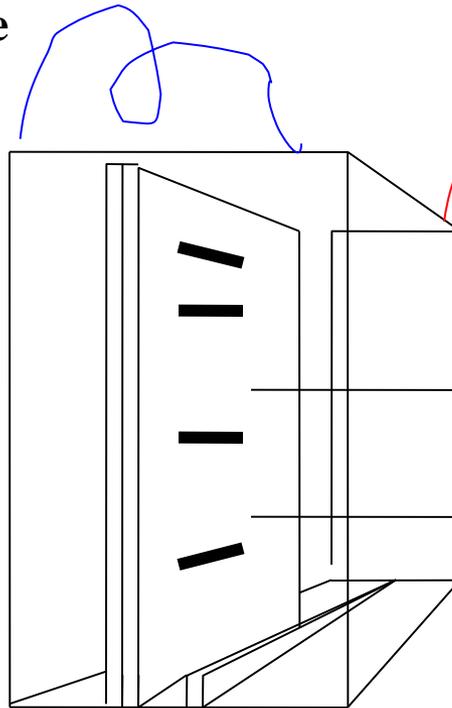
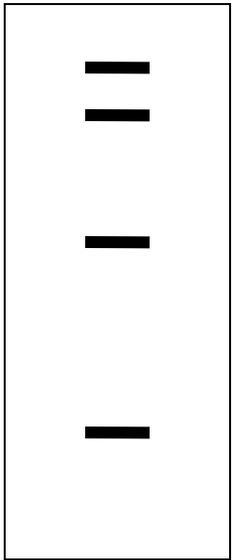
Side View:



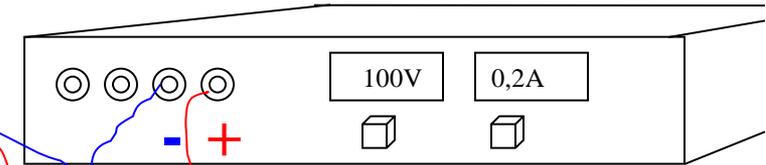
Note: All the layers are pressed tightly together.

Western blotting

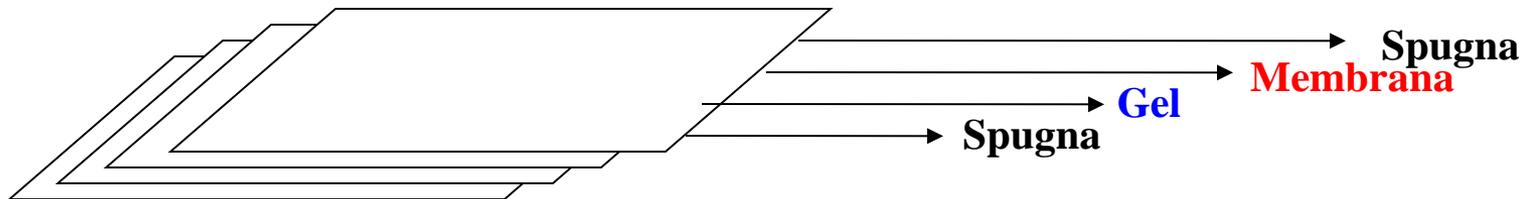
1. Gel di poliacrilamide in SDS



3. Elettroblotting



+

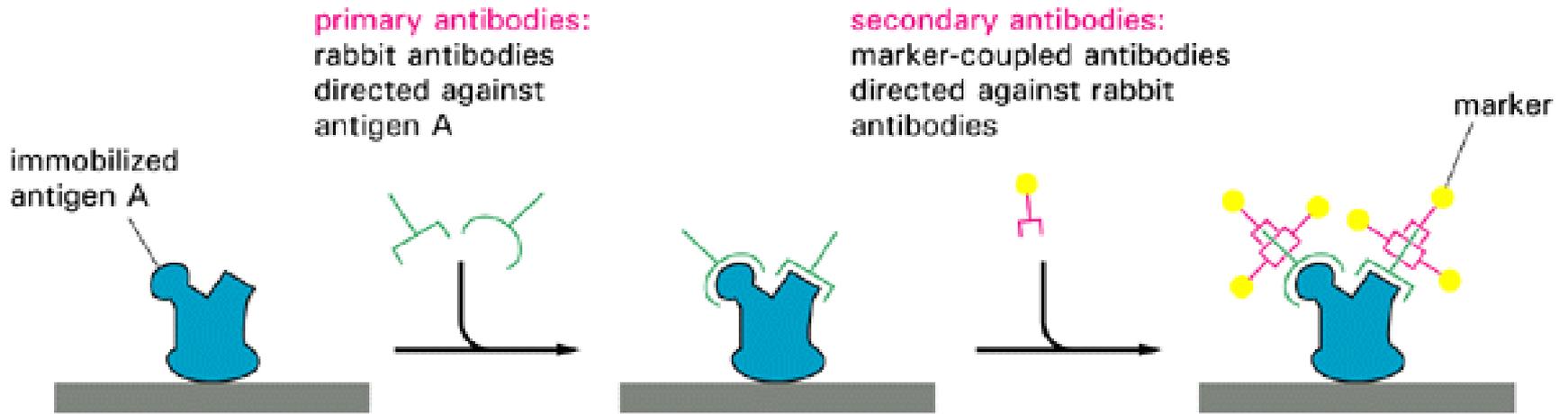


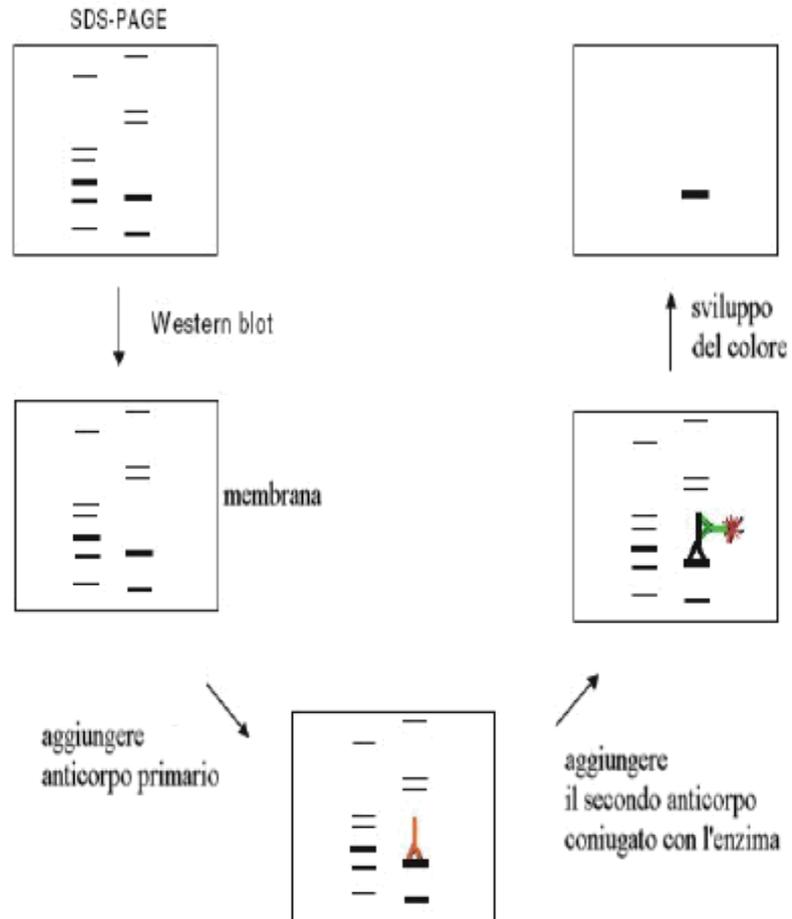
2. Preparazione del "sandwich"

Misurazione espressione a livello della proteina

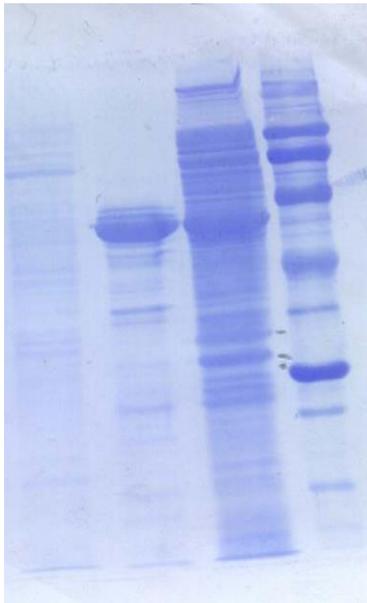
Western Blotting

Immunodetection





SDS-PAGE



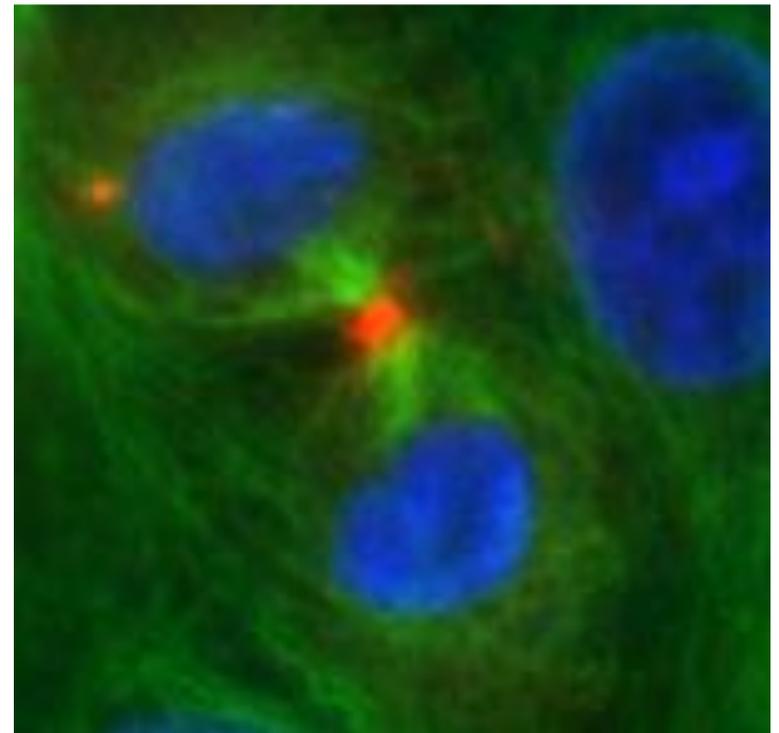
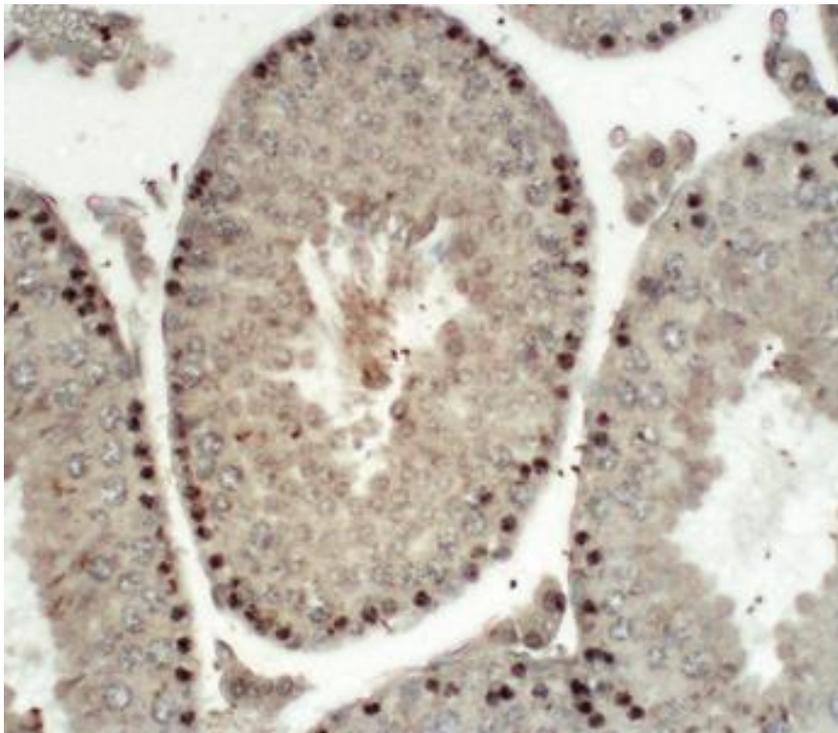
Westernblotting



Misurazione espressione a livello della proteina

Immunofluorescenza ed immunoistochimica

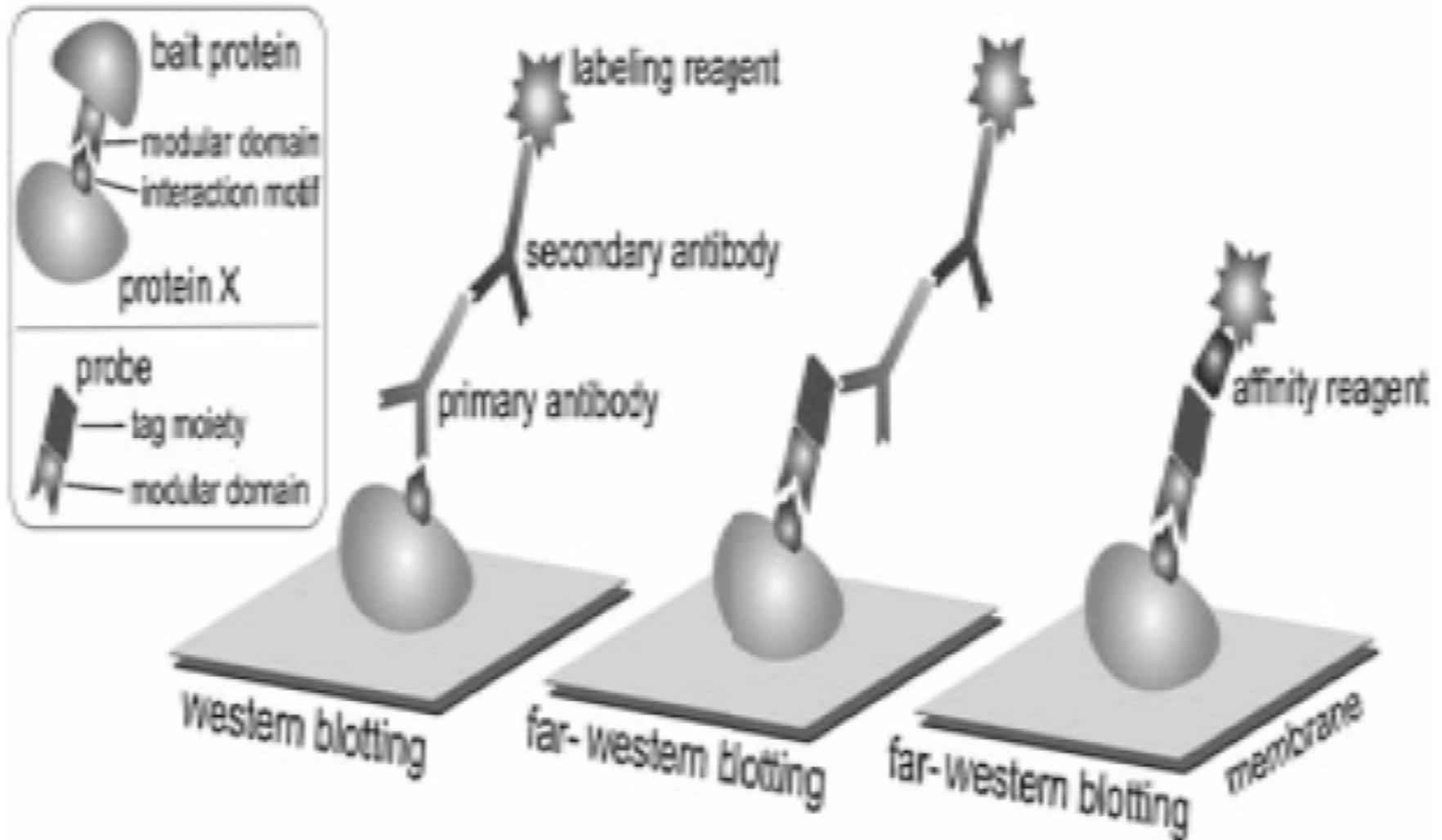
Permettono di valutare in quali cellule e in quali strutture subcellulari sono localizzate le proteine



Blotting delle proteine

- Westernblotting (interazione proteina-anticorpo)
- Farwesternblotting (interazione proteina-proteina)

Western e farwesternblotting



Southwestern blotting

Il Southwestern blotting è un metodo per identificare proteine che legano il DNA basato sulla separazione elettroforetica delle proteine e successivo trasferimento su membrana. Usa una combinazione di Western e Southern blotting, da cui il nome.

In un esperimento tipico, un estratto proteico, in cui si presume esserci una DNA-binding protein, viene separato su 2-D PAGE (Isoelettrofocusing seguito da SDS/PAGE) e successivamente elettro-trasferito su membrana.

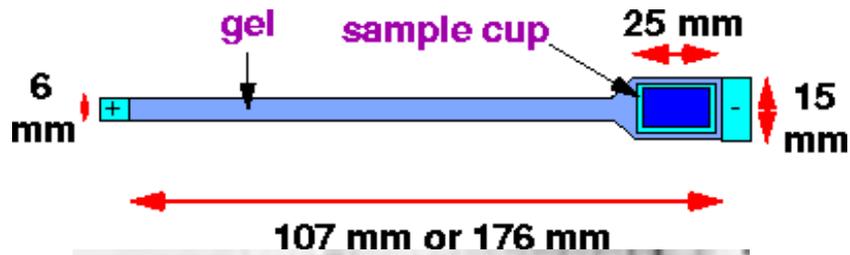
In una terza fase il blot viene fatto **rinaturare**, per rimuovere l'SDS e permettere l'interazione DNA/ proteina.

Infine il blot viene ibridizzato con una sonda radioattiva (anch'essa **non denaturata**), e processato come al solito rimuovendo la sonda non legata o in eccesso mediante lavaggi e identificando l'eventuale legame per autoradiografia.

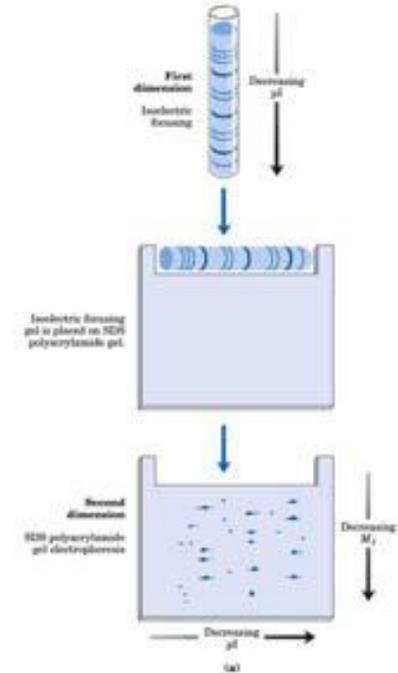
I Soutwestern blotting, dunque, indicano la presenza di proteine capaci di legare una sequenza data, fornendo, nel contempo, informazioni sul loro punto isoelettrico e peso molecolare

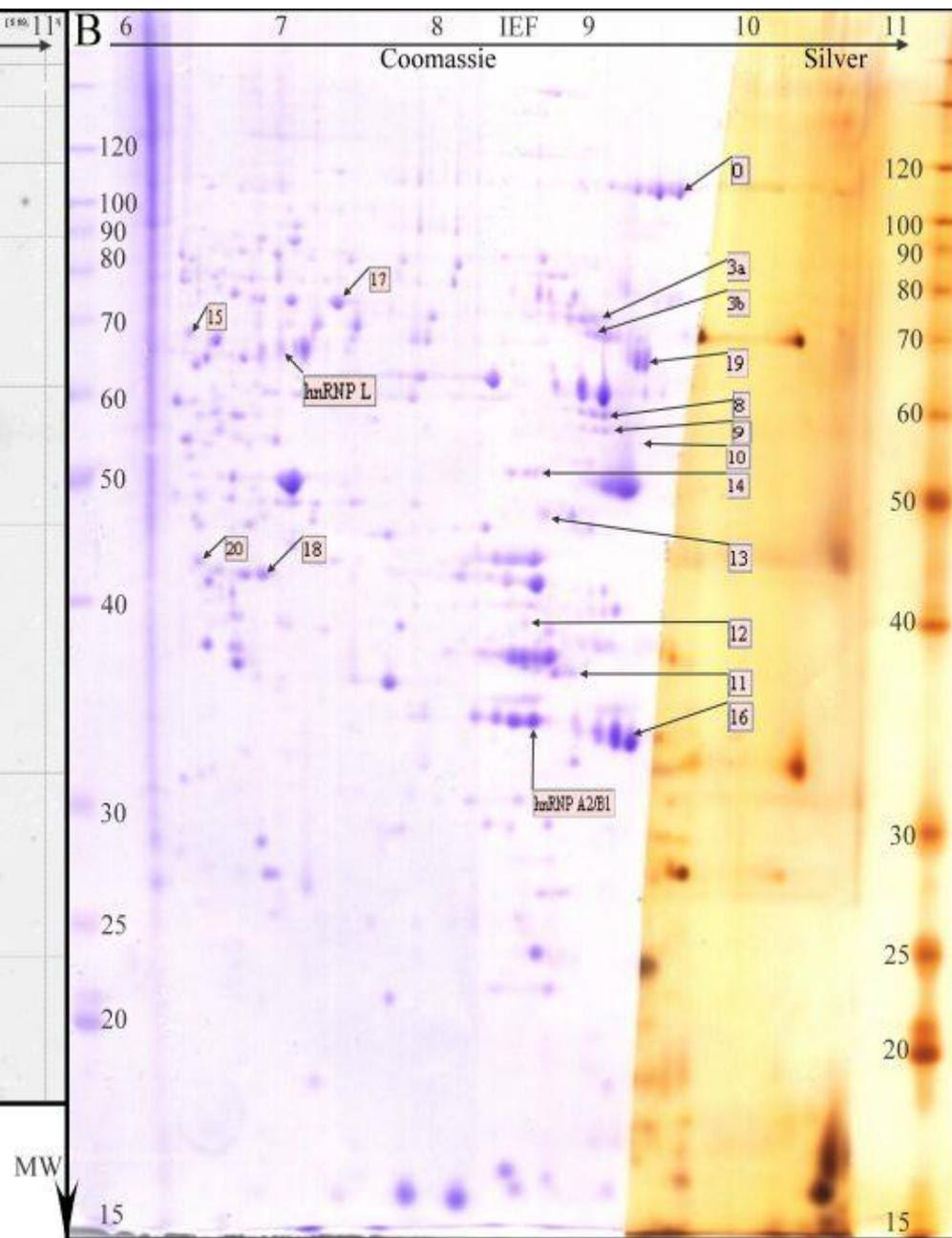
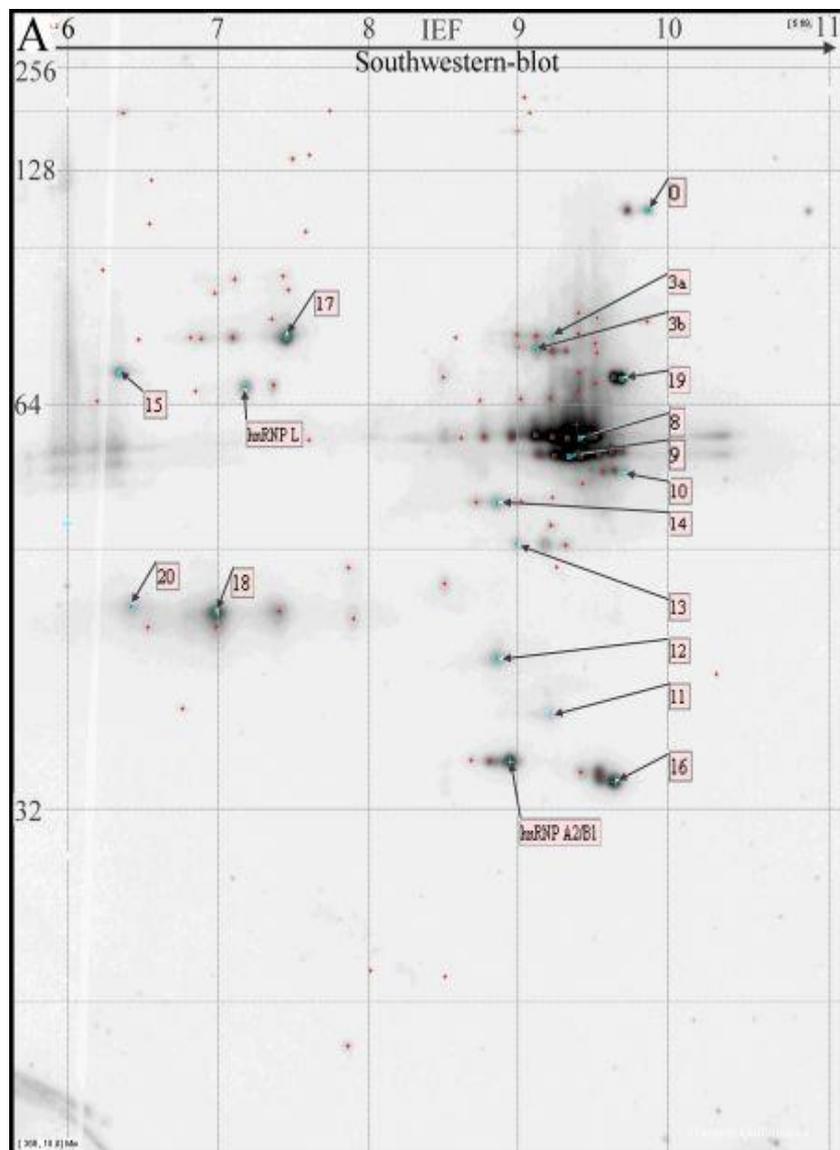
Elettroforesi bidimensionale

Focalizzazione isoelettrica



SDS-PAGE





Southwestern-blotting

