

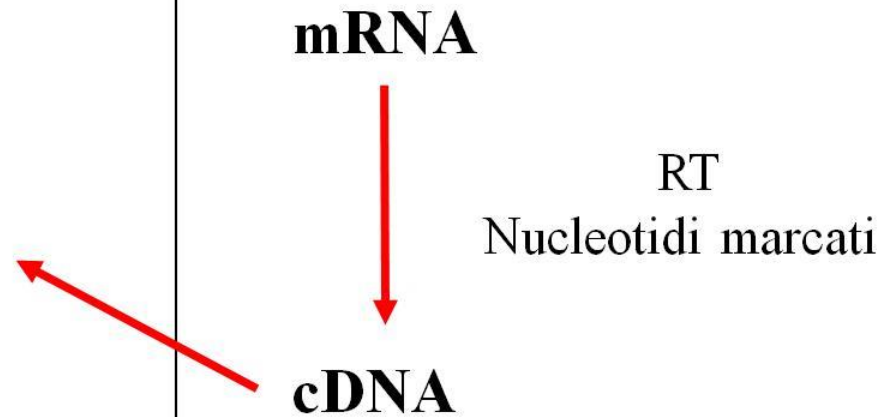
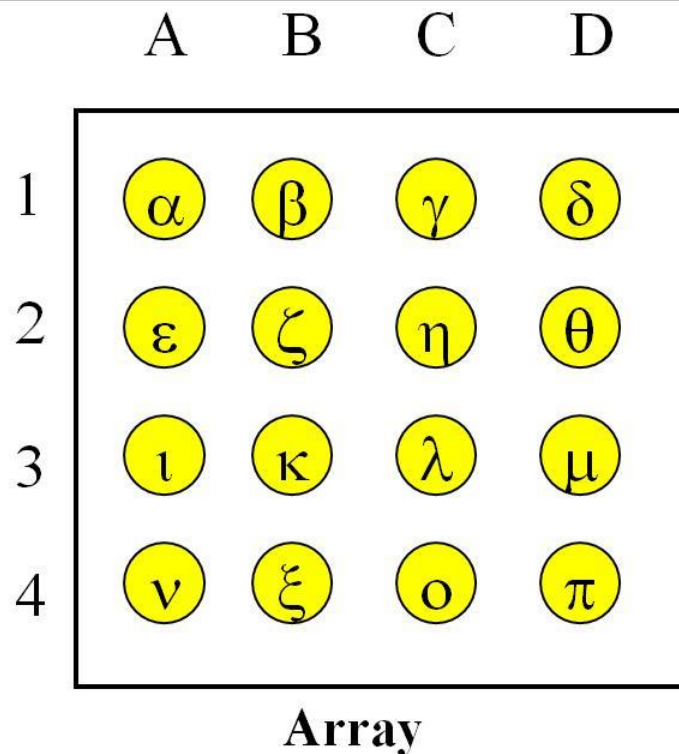
Saggi di ibridazione inversa

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:

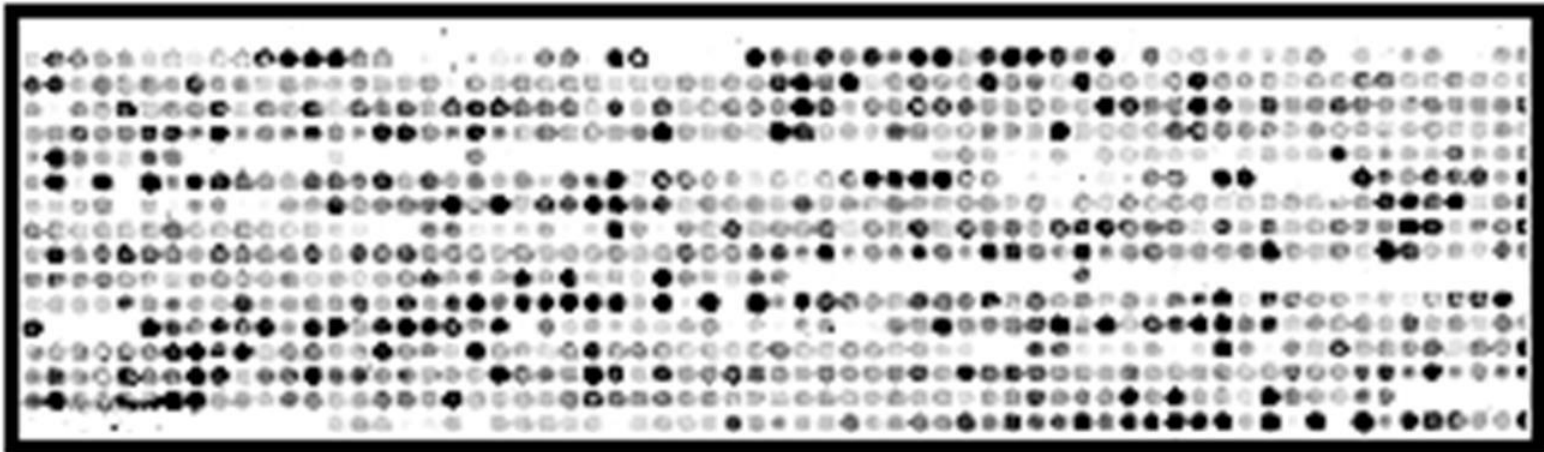
1. Come sonda si usano oligonucleotidi o molecole di cDNA non marcati, immobilizzati in posizioni precise di un supporto solido

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



Macrorray

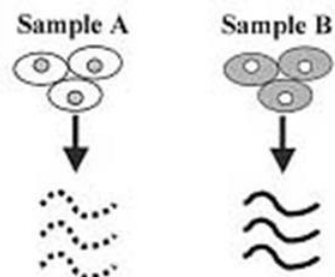
- **Le molecole sonda vengono legate a membrane di nylon**
- **Come tracciante viene utilizzata la radioattività**
- **Analisi di qualche decina o poche centinaia di geni**



Microrray di cDNA (o di oligonucleotidi lunghi)

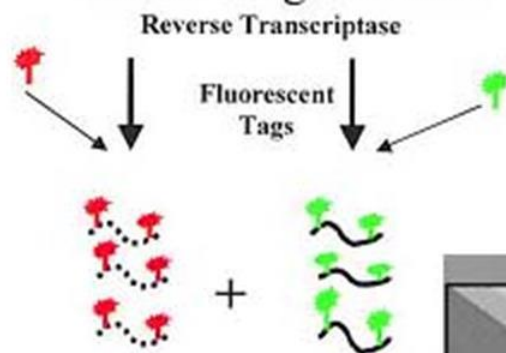
- **Le molecole sonda sono cDNA o oligonucleotidi lunghi 70-80 paia di basi, sintetizzati tradizionalmente e legati ad una matrice solida che può essere vetro, plastica o silicio per mezzo di un processo di stampa a getto (litografia) robotizzata.**
- **Su ogni vetrino possono trovare posto anche tutti i nostri geni (23.500 circa).**
- **Metodica che si usa per comparare le differenze di espressione genica tra due campioni.**

A. RNA Isolation

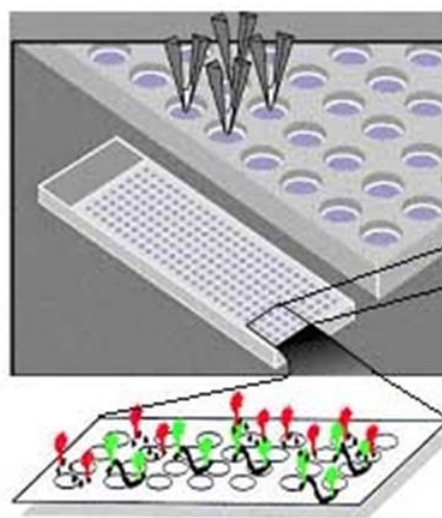


B. cDNA Generation

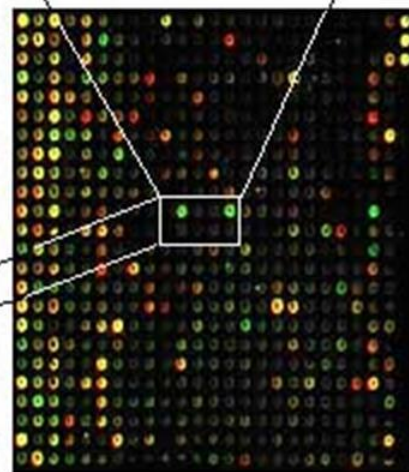
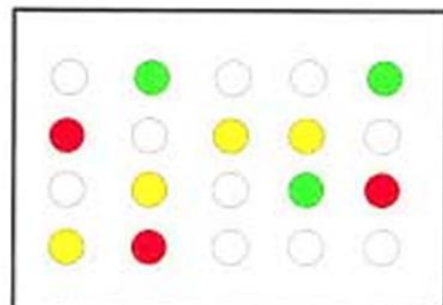
C. Labeling of Probe



D. Hybridization to Array



E. Imaging



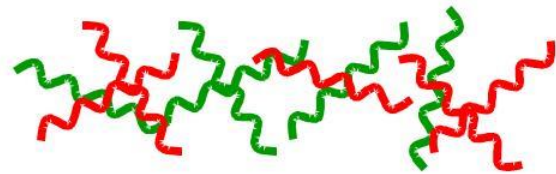
mRNA

Reverse
transcription

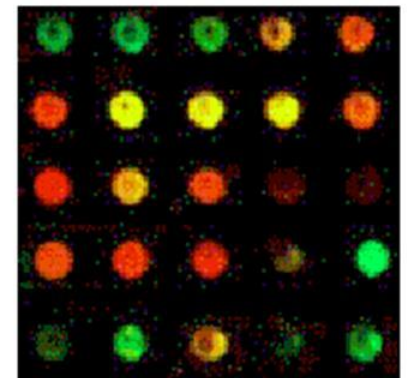
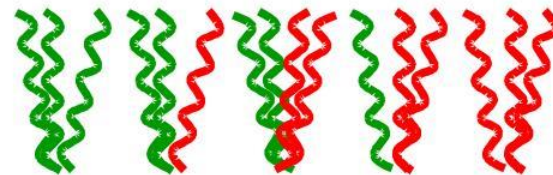
Labeled
1st strand cDNA

Sample 1 (test)

Sample 2 (reference)

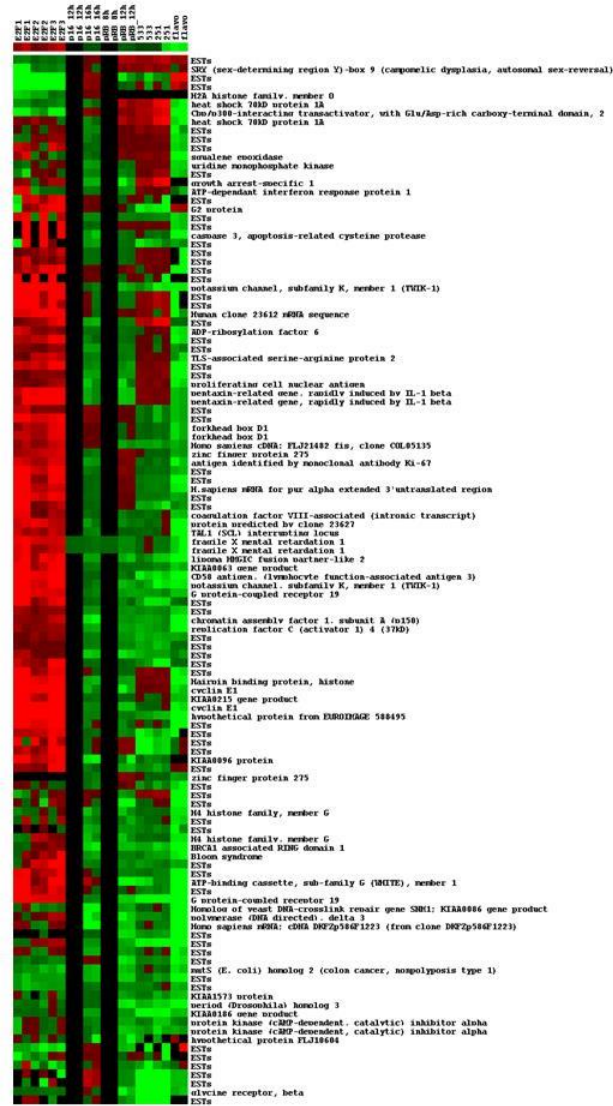


Hybridization on the cDNA microarray



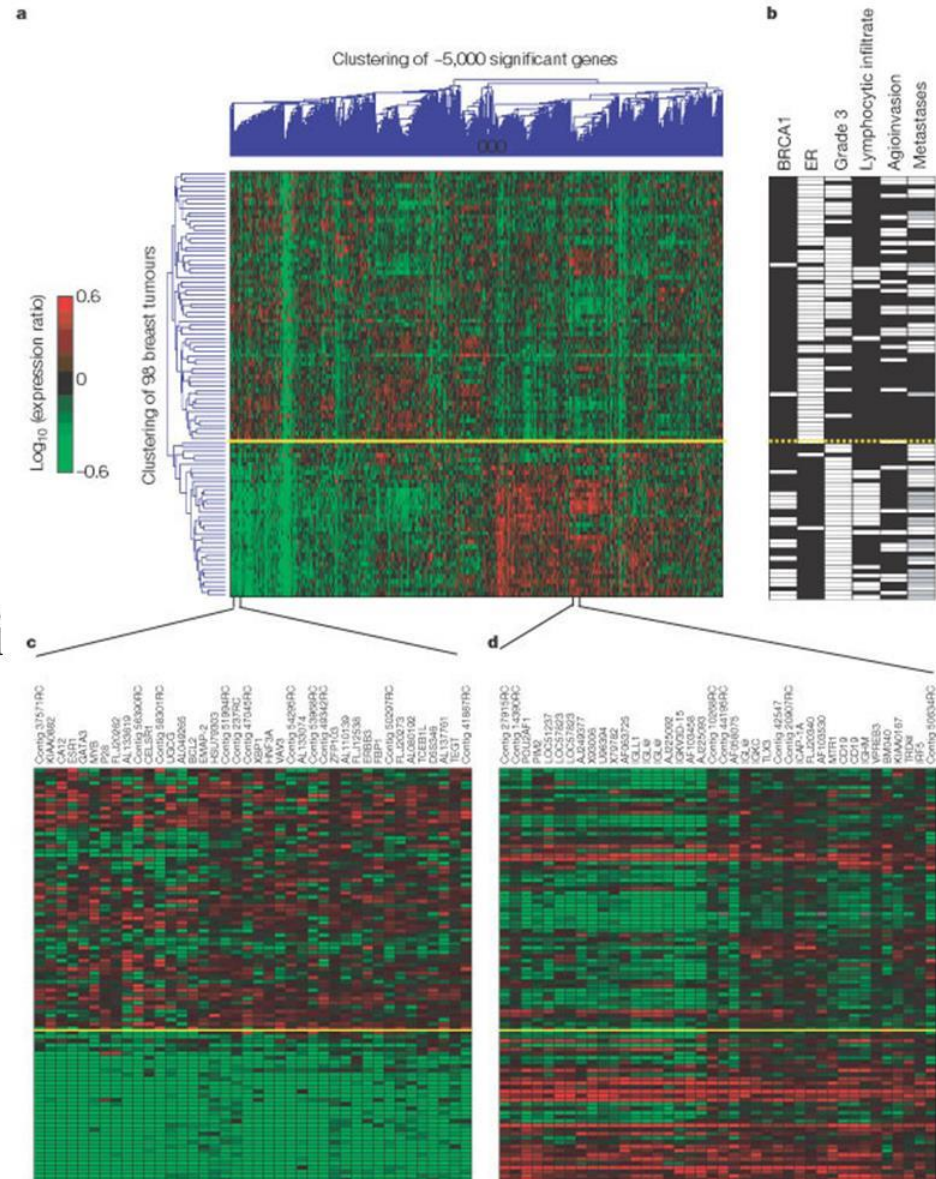
Generazione di una enorme quantità di dati.

L'acquisizione dei dati è solo la parte iniziale della procedura. La parte più complicata è l'elaborazione della enorme quantità di dati generati da questi esperimenti, necessaria per rispondere ai quesiti biologici di partenza. I dati più significativi devono essere poi verificati con altri sistemi (northern, real time RT-PCR)



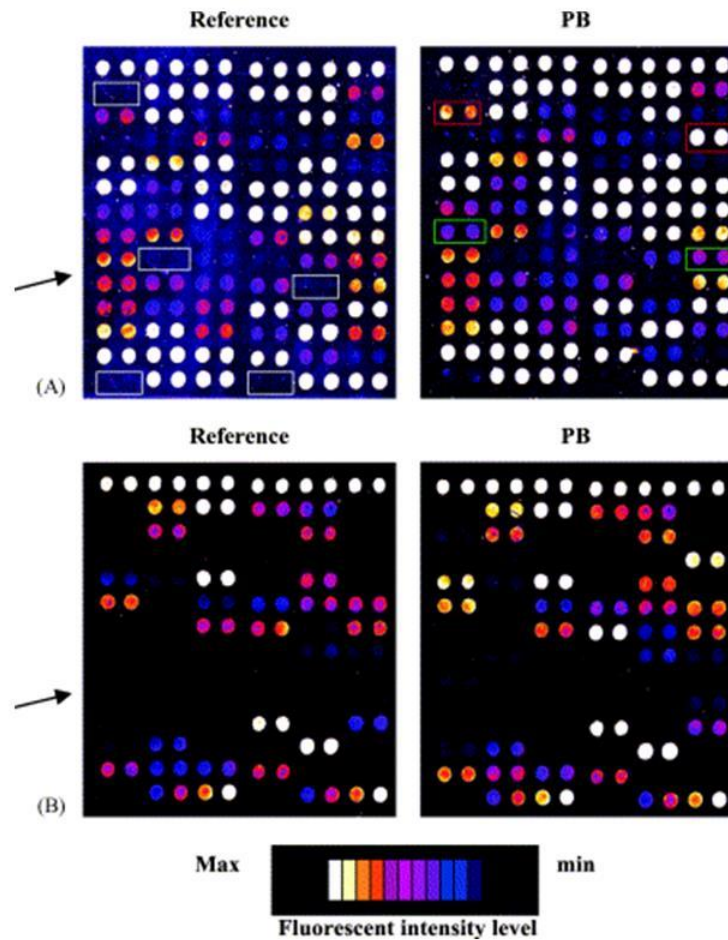
Applicazioni

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



Applicazioni

Farmacogenomica e tossicogenomica





Metodi di amplificazione

Amplificazione della sequenza bersaglio

Amplificazione del segnale

Amplificazione della sonda

L'Amplificazione del bersaglio: la PCR

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)

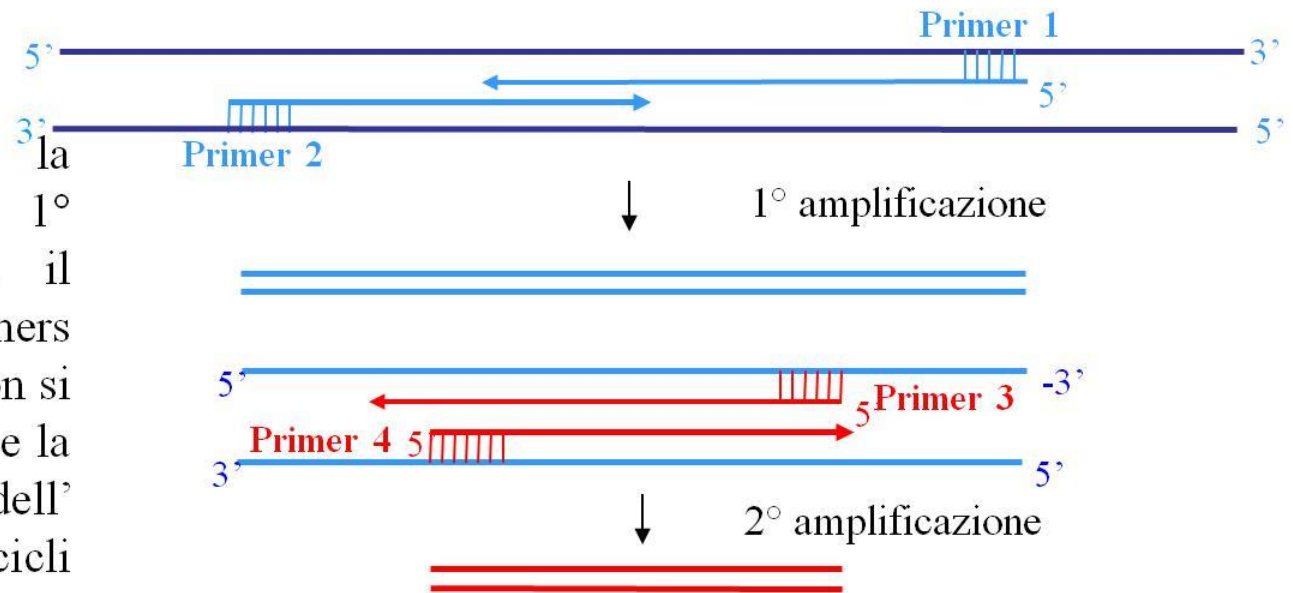
Recupero di DNA da diversi tessuti e fonti

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 10⁵ 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

Nested PCR (PCR annidata)

Consiste in due PCR consecutive effettuate con due paia di primers annidati uno dentro l'altro.

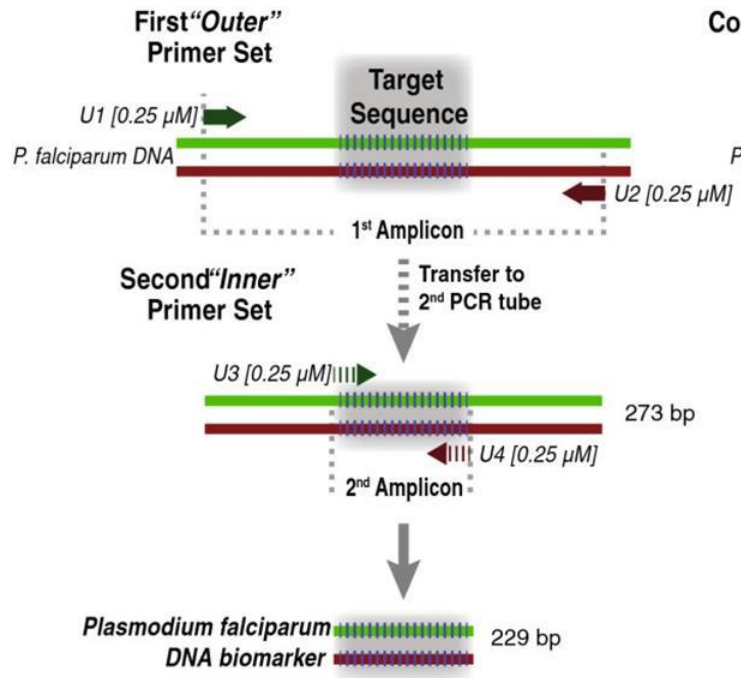
Permette di aumentare la **specificità** (Se la 1° amplificazione non dà il corretto prodotto, i primers nella 2° amplificazione non si appaieranno al bersaglio) e la **sensibilità** dell'amplificazione (n. di cicli totale).



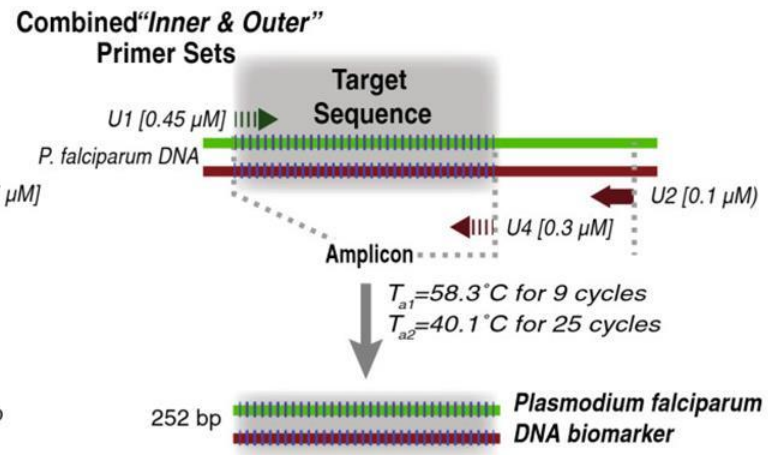
Dall'aumento di sensibilità deriva anche un maggior rischio di **contaminazione** del campione iniziale.

Es. utilizzo: ricerca di virus presenti a bassissime concentrazioni

A. Traditional Nested PCR



B. Semi-nested Asymmetrical PCR

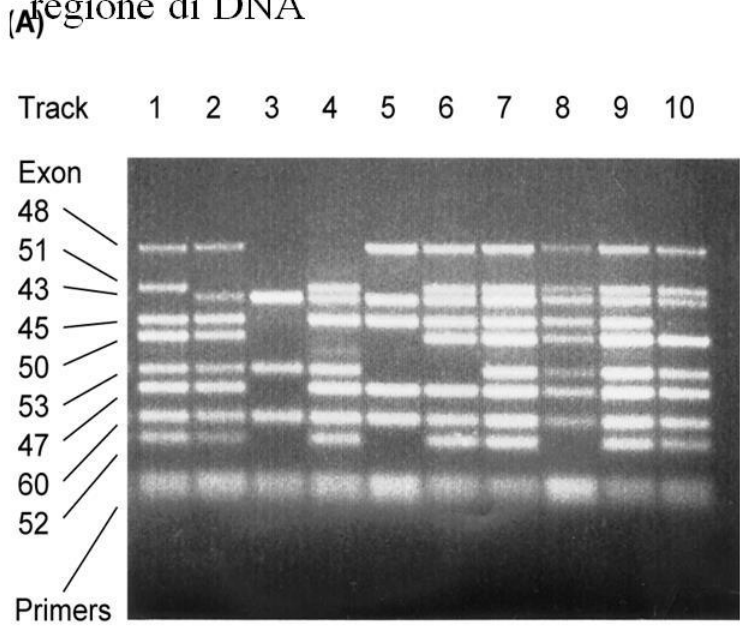


PCR multipla

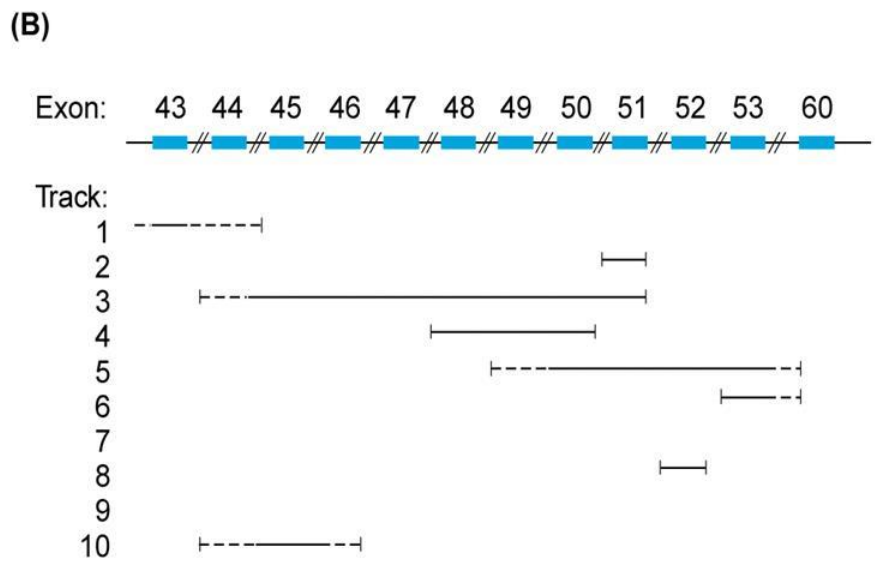
Appare chiaro da quanto detto che la PCR risulta un metodo molto semplice per verificare la delezione di una sequenza di DNA. Aggiungendo gli opportuni primers o si ottiene il prodotto oppure tale sequenza è assente. Alcune patologie derivano dalla perdita di una particolare sequenza nucleotidica di un gene costituito da più sequenze. Il caso più noto è la *distrofia muscolare di Duchenne (DMD)*, che deriva da alterazioni di un gene costituito da nove frammenti e la delezione può interessare uno di questi nove frammenti. E' possibile allora, aggiungendo più coppie di primers, riprodurre simultaneamente tutte e nove le sequenze che vengono poi visualizzate per elettroforesi su gel di agarosio. Tale malattia viene quindi diagnosticata dall'assenza di una delle nove bande che si ottengono dal gel di agarosio per un individuo sano. Il limite di tale metodica è la conoscenza di tutte le sequenze implicate per la produzione degli opportuni primers che devono agire simultaneamente e nelle stesse condizioni per produrre i vari segmenti di DNA.

PCR Multiplex

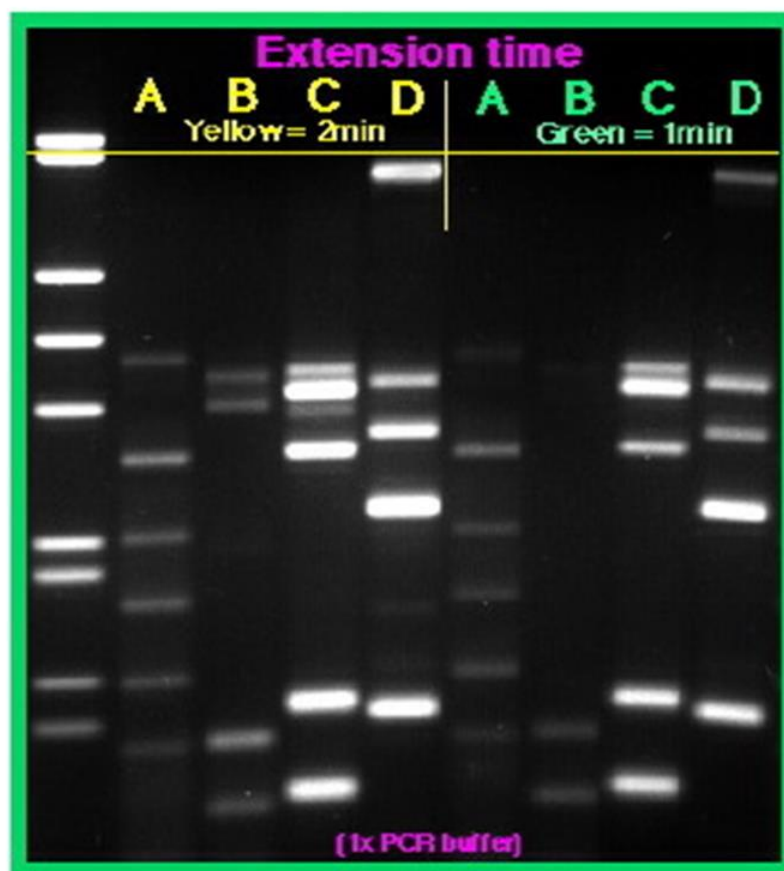
Variante della PCR che permette di amplificare simultaneamente diversi DNA bersaglio impiegando in un'unica reazione numerose coppie di inneschi, ognuna specifica per una data regione di DNA



Analisi con multiplex PCR di esoni nel gene della distrofina



La PCR multiplex è utilizzata per analizzare contemporaneamente più bersagli di DNA. Es. Per la ricerca simultanea di una serie di lesioni note (delezioni) che possono interessare un gene ed essere causa di una certa malattia genetica. L'ottimizzazione delle condizioni di amplificazione per tutte le coppie inneschi presenti può presentare difficoltà (scelta della Tm)



PCR: Applicazioni diagnostiche

Una delle applicazioni più diffuse in campo medico è l'uso della PCR per la caratterizzazione delle mutazioni che causano malattie genetiche. Con tale metodica vengono amplificate i geni interessati a possibili mutazioni patogene e vengono confrontate con sequenze di sintesi corrispondenti sia al gene mutato sia a quello normale in una metodica denominata "slot blotting" e a seconda che il DNA amplificato vada ad interagire con quello mutato o quello normale si risale alla possibile patologia genetica. Tra le principali patologie diagnosticabili con PCR ricordiamo

Fibrosi cistica	morbo di Fabry
Ipercolerolemia	morbo di Gaucher
Emofilia A	Emofilia B
sindrome di Lesch-Nyhan	Fenilchetonuria
Retinoblastoma	morbo di Sandoff
morbo di Tay-Sachs	beta-talassemia
morbo di von Willebran	delta talassemia
deficienze enzimatiche	anemia

La PCR può essere utilizzata anche per diagnosi prenatale e per la precisa determinazione del sesso tramite l'amplificazione del cromosoma Y (presente solo nel maschio)

PCR e il cancro

Numerose patologie tumorali sono dovute a mutazioni ereditarie o casuali di geni, come nel caso dei tumori solidi al colon e di numerose forme leucemiche che nascono da mutazioni casuali al gene Ras che codifica per una proteina normalmente coinvolta nello sviluppo cellulare. La PCR può avere vaste applicazioni per la diagnosi e la terapia di tali patologie.

Il *Retinoblastoma* è un tumore infantile che colpisce gli occhi ed è dovuto a mutazioni (spontanee e ereditarie) al gene q14 del cromosoma 13. Coloro che soffrono di retinoblastoma ereditario presentano mutazioni in tutte le cellule, mentre nelle forme spontanee sono interessate solo le cellule retinali. La PCR permette di stabilire con semplicità se si tratta di retinoblastoma ereditario o spontaneo, confrontando cellule retinali con cellule di altri organi e consente di evidenziare i pazienti che hanno ereditato tale mutazione in modo da poter diagnosticare, con controlli periodici, nel breve tempo possibile l'insorgere della patologia

PCR e patogeni infettivi

Normalmente la presenza di organismi patogeni viene controllata con due metodi, crescita in coltura e uso di anticorpi, ma la prima risulta troppo lunga e la seconda può portare ad errori. La PCR può risultare utile per individuare la presenza di patogeni, di cui si conoscono alcune sequenze nucleotidiche. Ormai viene utilizzato in modo abitudinario per individuare infezioni da virus come nel caso dell'*HIV*, di cui si può stabilire anche la diffusione nelle cellule dell'individuo, e del papilloma umano (*HPV*).

In maniera analogo può essere esaminata l'acqua e gli alimenti alla ricerca della presenza di patogeni.

In campo biotecnologico la presenza di microrganismi patogeni nelle colture o negli organismi geneticamente modificati può essere individuata con metodi di PCR, che ricercano ed amplificano sequenze nucleotidiche di particolari agenti infettivi in modo più efficace e sensibile che con l'uso di anticorpi.

PCR e le relazioni familiari

Un'altra applicazione della PCR consiste nello stabilire le relazioni familiari tra due individui. Tale operazione sfrutta due diversi principi. Il primo è basato sul polimorfismo genetico che differenzia gli individui umani ma accomuna individui legati da parentela. Per tale motivo se sottopongo ad endonucleasi una porzione genica se ottengo gli stesse sequenze vuol dire che i due individui sono parenti, altrimenti ottengo diverse sequenze nucleotidiche. La seconda metodica si basa su alcune sequenze proprie di ciascun individuo e che si ripetono più volte nel patrimonio genetico (*VNTRs, variable number tandem repeats*). Confrontando tali sequenze per un padre e un figlio si osserveranno delle analogie e tali analogie dipenderanno dal grado di parentela tra i due individui considerati. Tale metodica è utilissima anche per verificare l'identità di un individuo e ciò trova vaste applicazioni in ambito legale per individuare un criminale di cui si posseggono, ad esempio, tracce di sangue.

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

Metodi di amplificazione della sonda o del segnale: alcuni esempi

- Amplificazione della sonda
 - LCR – Ligase Chain Reaction
- Amplificazione del segnale
 - bDNA – Branched DNA probes

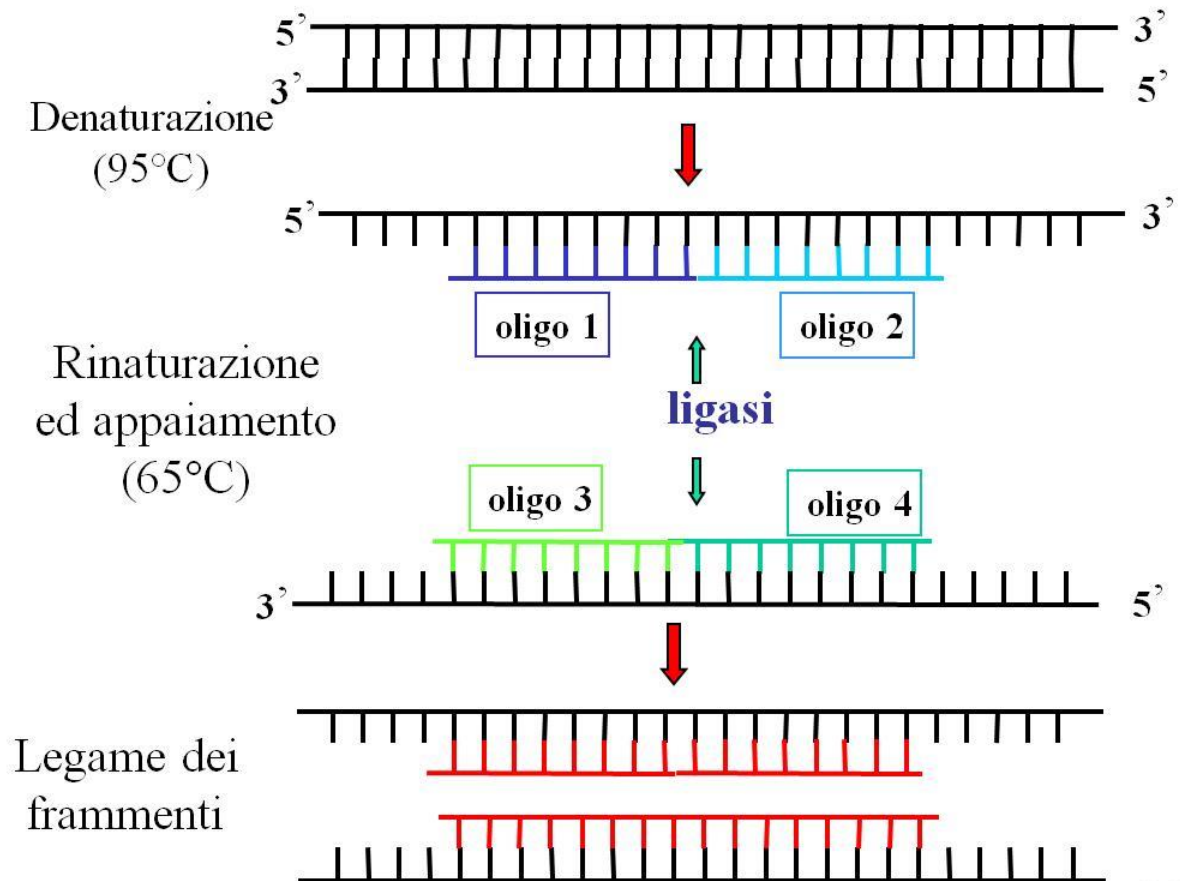
Ligase Chain Reaction

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

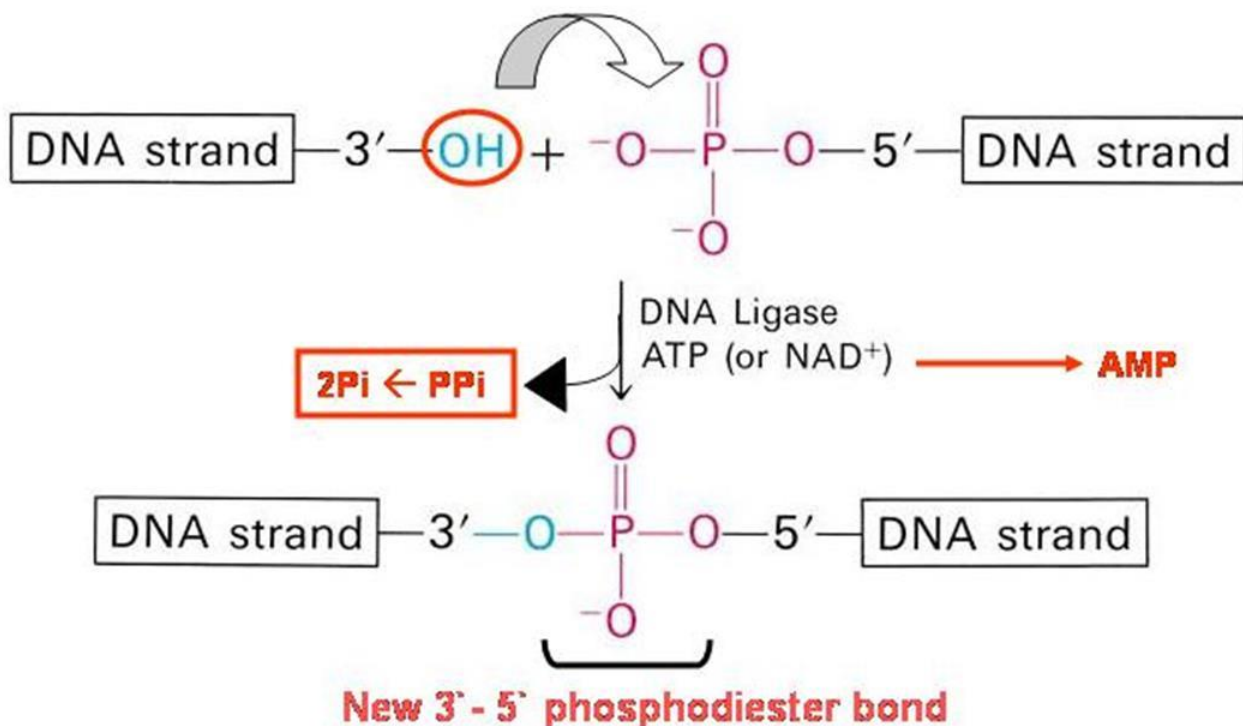
LCR (Ligase Chain Reaction)

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.



DNA LIGASE Reaction

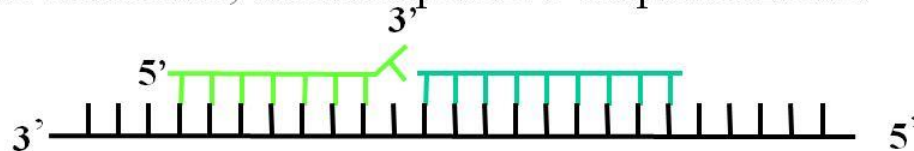


LCR Ligase Chain Reaction

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.

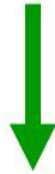


Limiti

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



Ligation

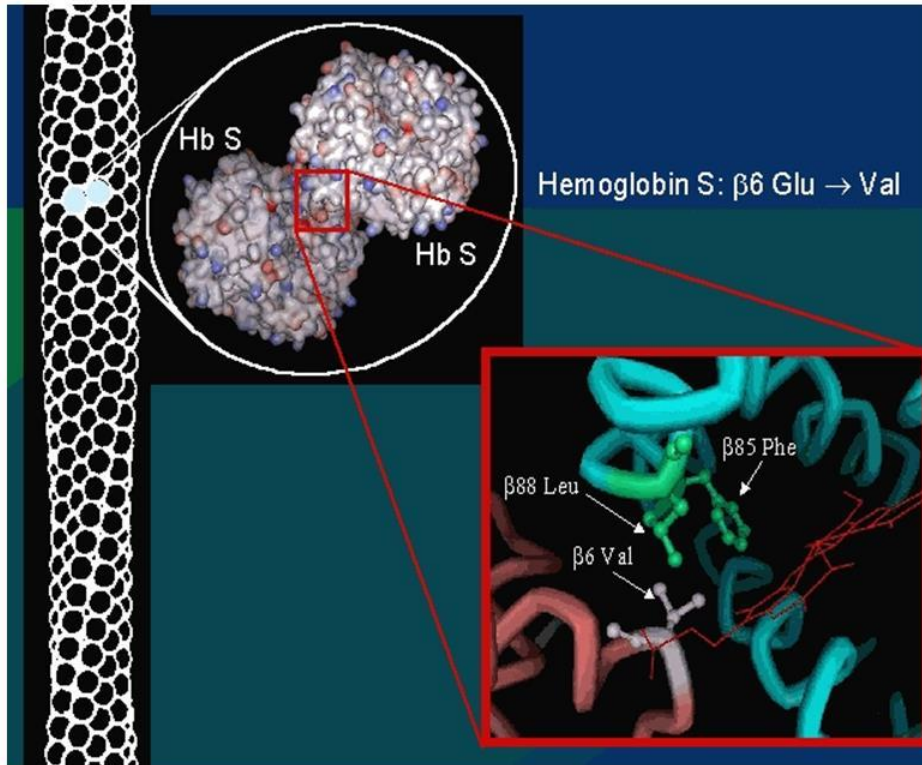
No DNA Products

Mutant Sequence



DNA Product

Why Do Cells Sickle?

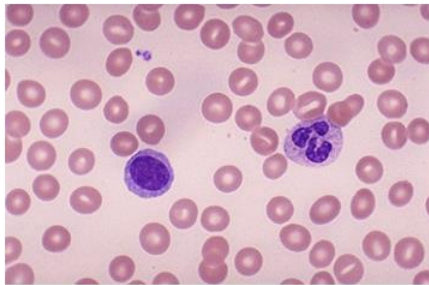


- Glutamic acid is substituted for valine
- Allowing the polymerization of sickle hemoglobin when deoxygenated

Normal Vs. Sickle Red Cells

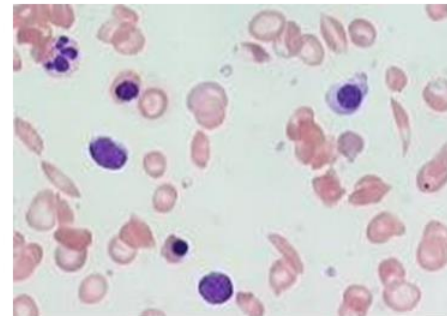
Normal

- Disc-Shaped
- Deformable
- Life span of 120 days

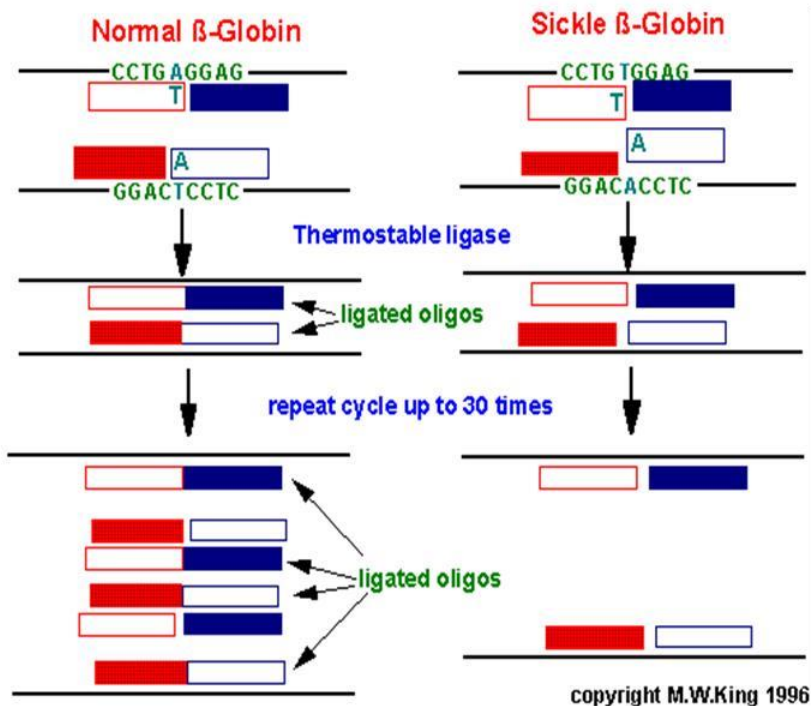


Sickle

- Sickle-Shaped
- Rigid
- Lives for 20 days or less



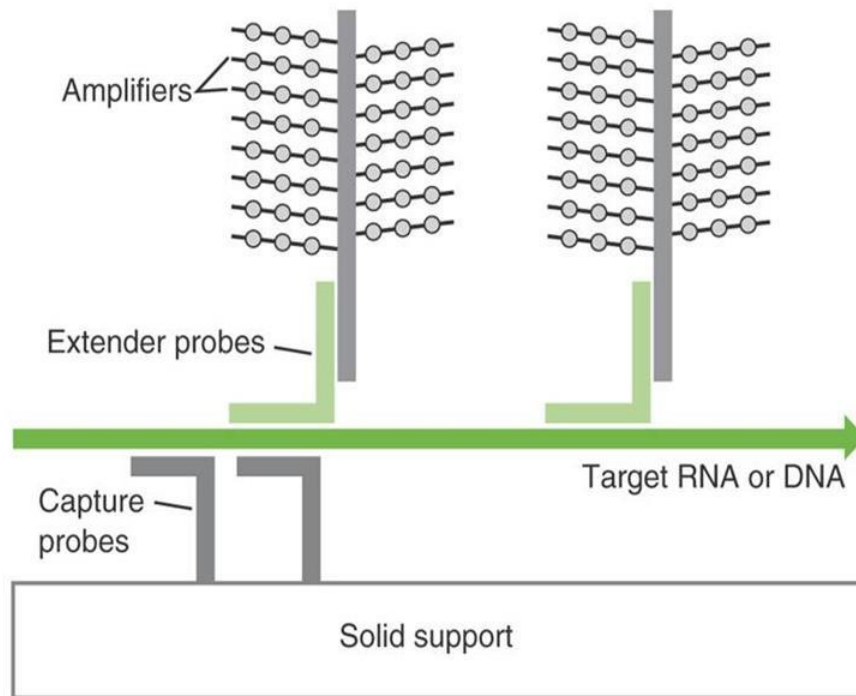
Ligase Chain Reactions (LCR)



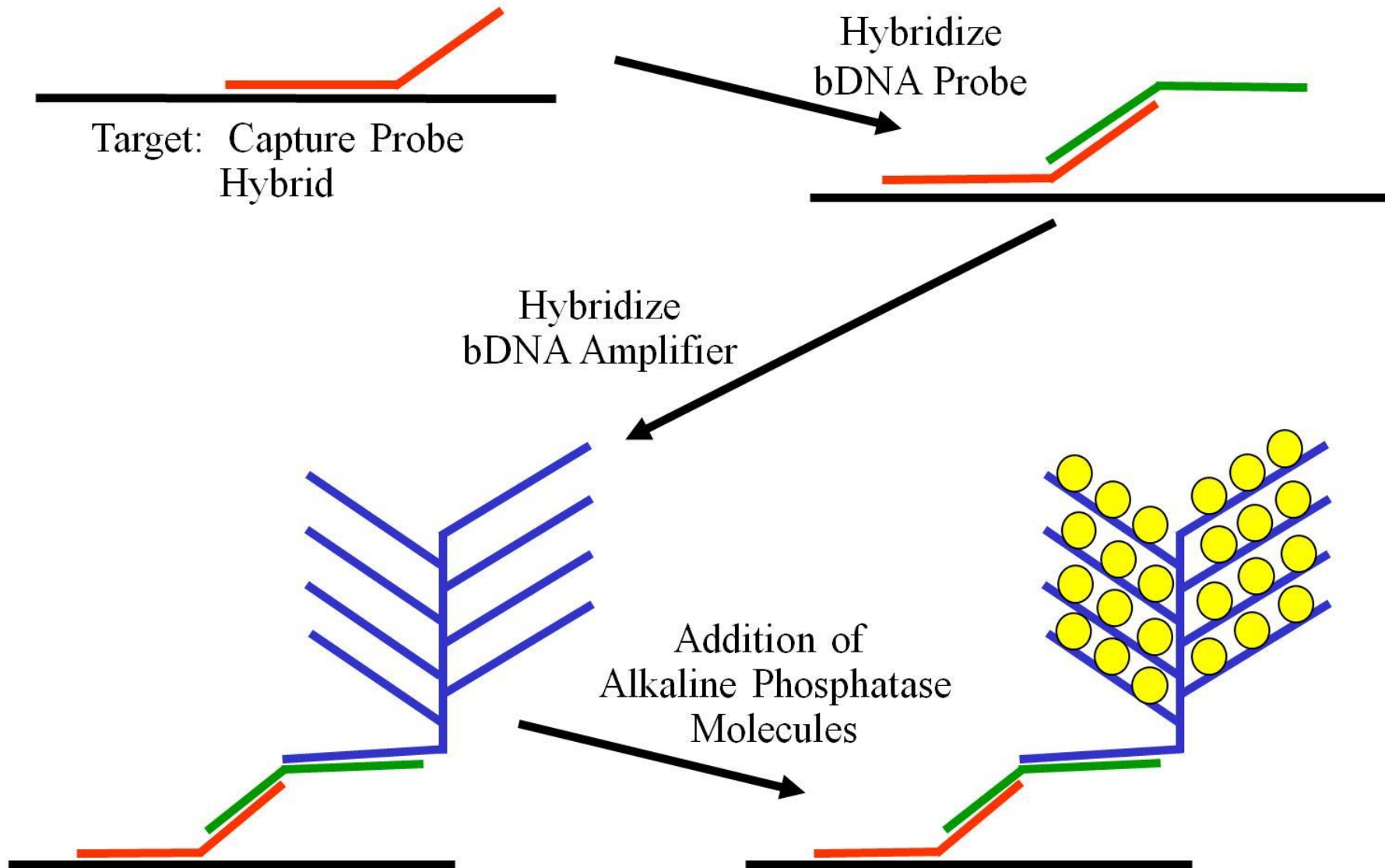
- Thermostable DNA ligase to ligate together perfectly adjacent oligos.
- Two sets of oligos anneal to one strand of the gene
- With a wild-type target sequence, the oligo pairs ligate together and become targets for annealing other oligos in an exponential amplification
- At a point mutation the oligos only completely anneal to the mutant sequences and DNA ligase will not ligate the two oligos of each pair together

Amplificazione del segnale: DNA ramificato (o bDNA)

bDNA (branched DNA o DNA ramificato). Tecnica di ibridizzazione su supporto solido. Consiste nell'amplificazione di un segnale prodotto da una sonda sintetica di DNA altamente ramificato che va ad ibridizzare l'acido nucleico da analizzare. Il processo avviene su micropiastre rivestite di una sonda "capture probe" (sonda 1) a cui viene aggiunto il campione contenente il bersaglio di RNA (DNA ss).

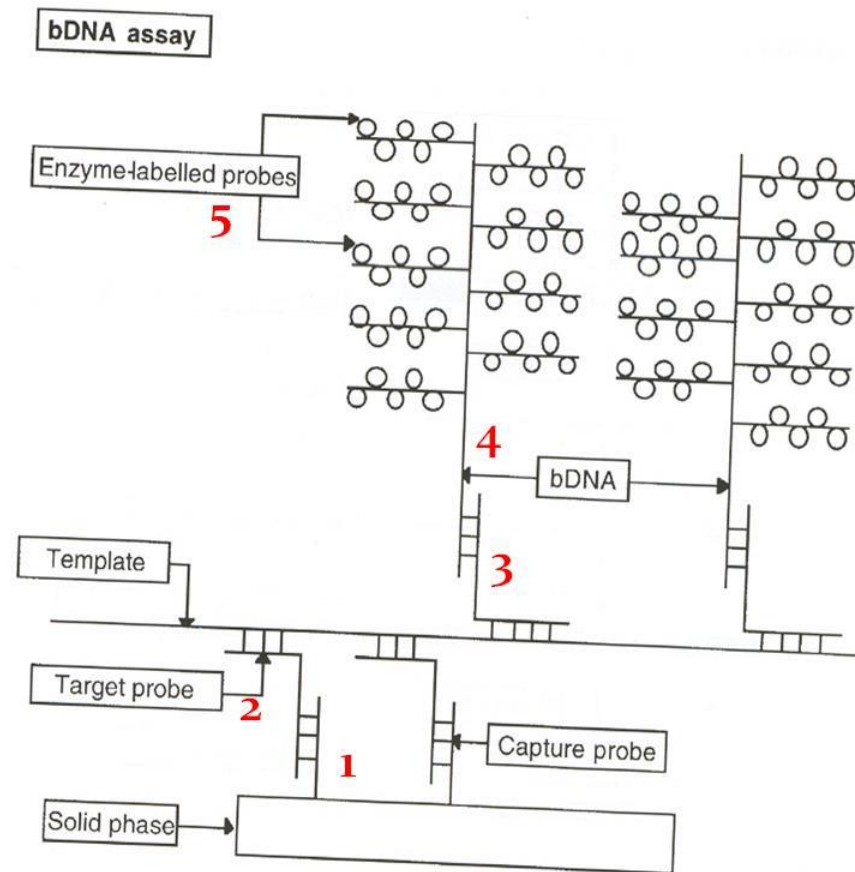


Branched DNA Detection



Le altre sonde sono aggiunte nell'ordine:

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



Utilizzando speciali sonde chemiluminescenti si può avere un'ibridazione sensibile che amplifica il segnale di rivelazione in maniera lineare.

- Questa tecnica offre la possibilità di quantificare gli acidi nucleici virali riducendo i rischi di contaminazioni.
- Vengono utilizzati per studiare pazienti in corso di infezione da HIV, HBV, HCV e anche le varianti virali.

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

T7 Promoter Gene-specific Sequence



Target RNA Sequence 5'  3'

Reverse Transcription

RNA:DNA Hybrid 

RNase H

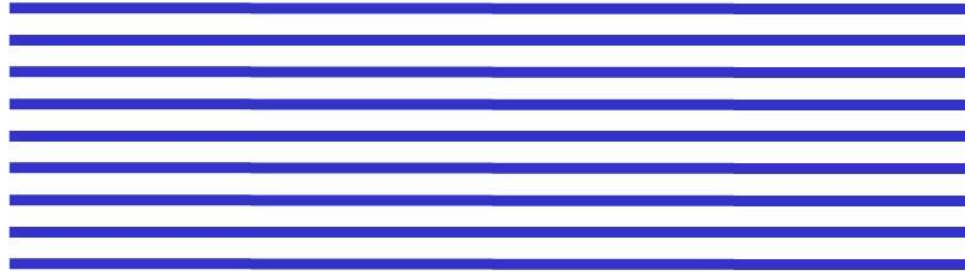
Reverse Transcription

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

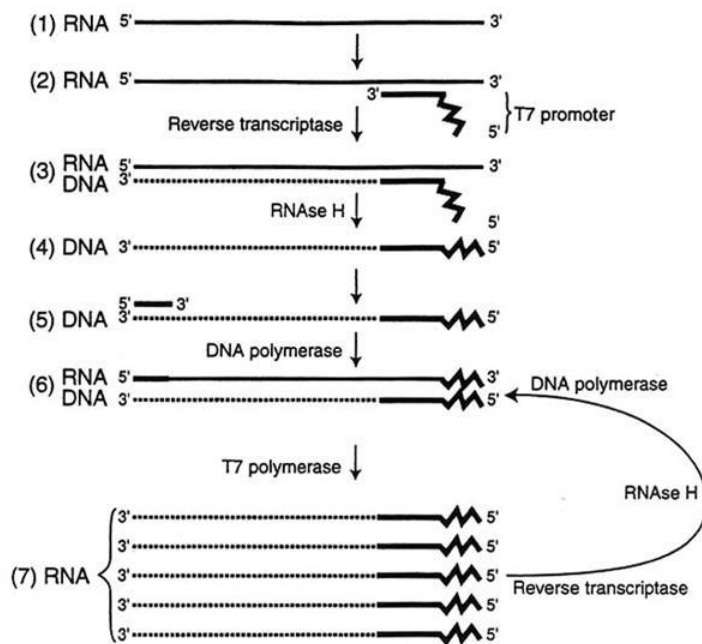


FIGURE 2 Transcription-based amplification.

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)

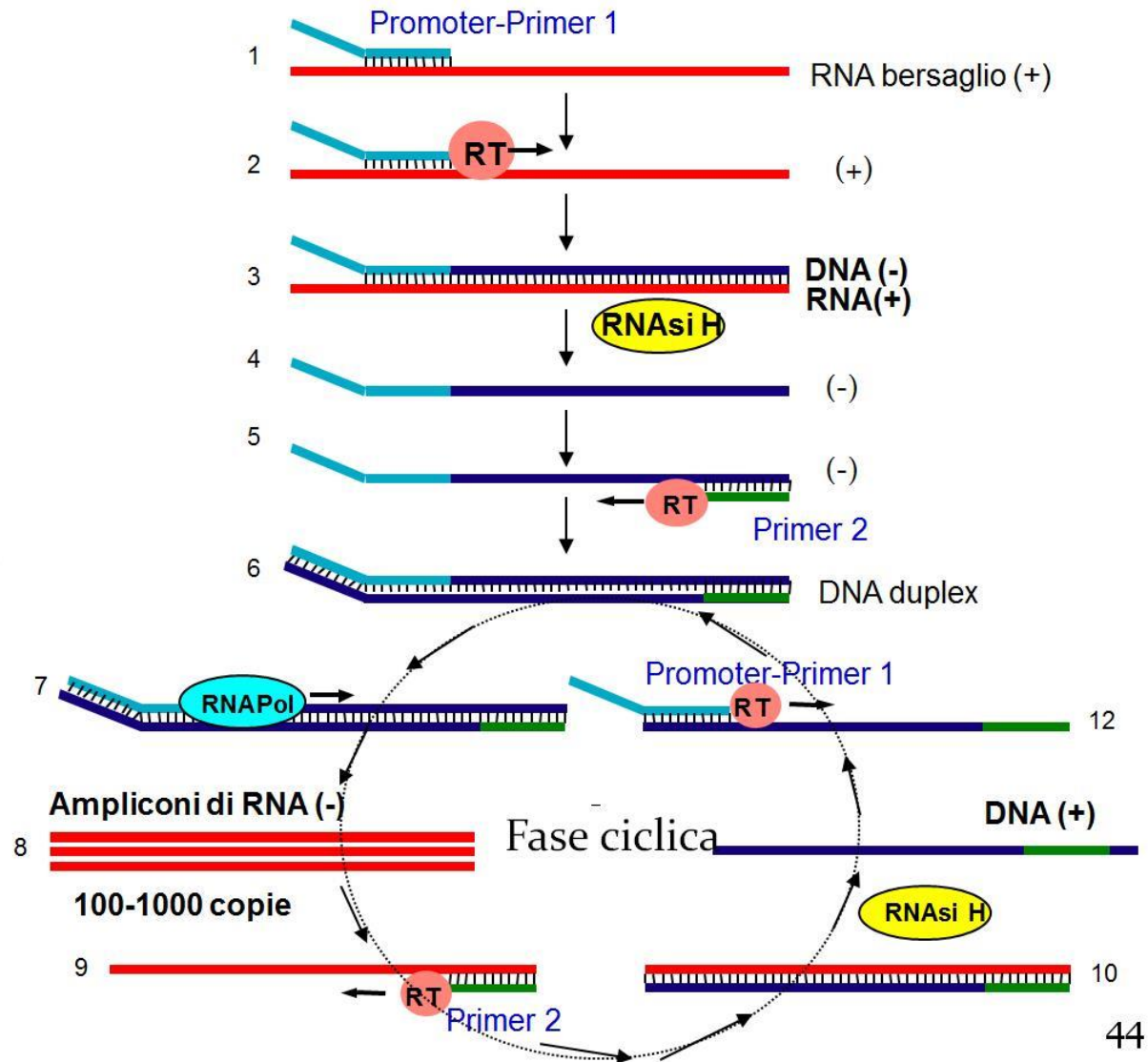
NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) e TMA (Transcription Mediated Amplification)

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.

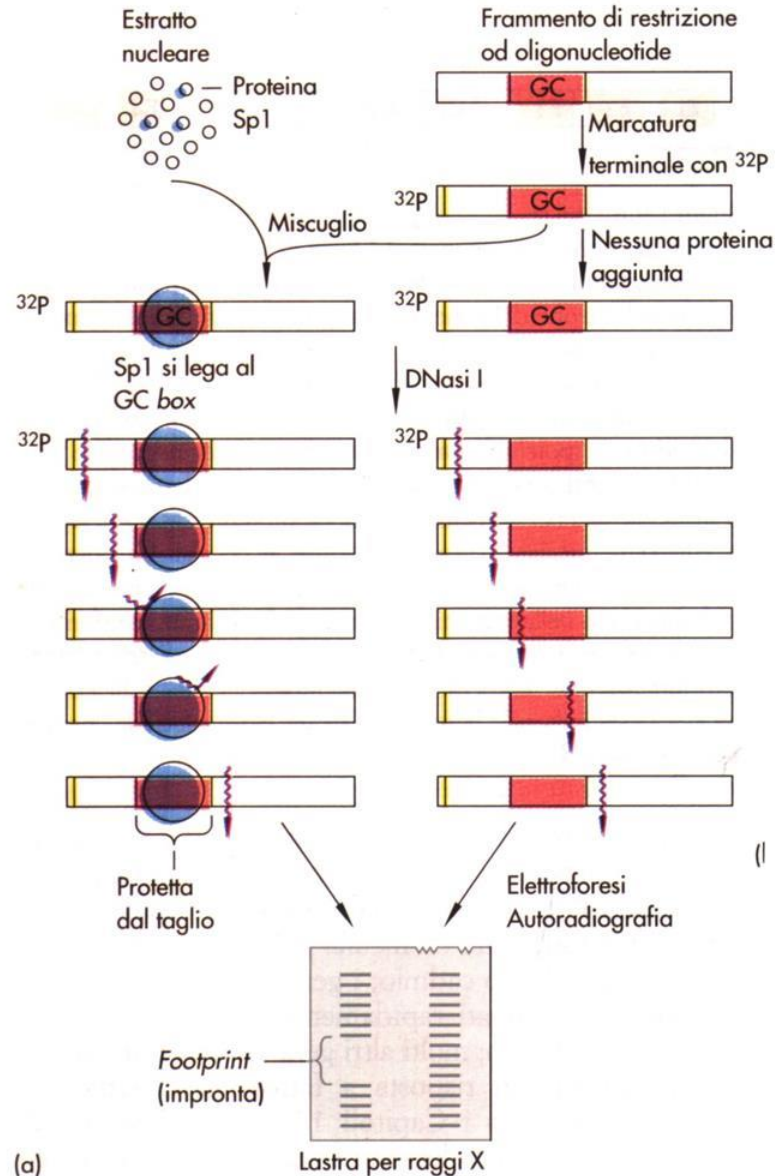
Fase di retrotrascrizione dell'RNA in DNA a doppio filamento utilizzando una RT, due inneschi e RNAsi H.

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

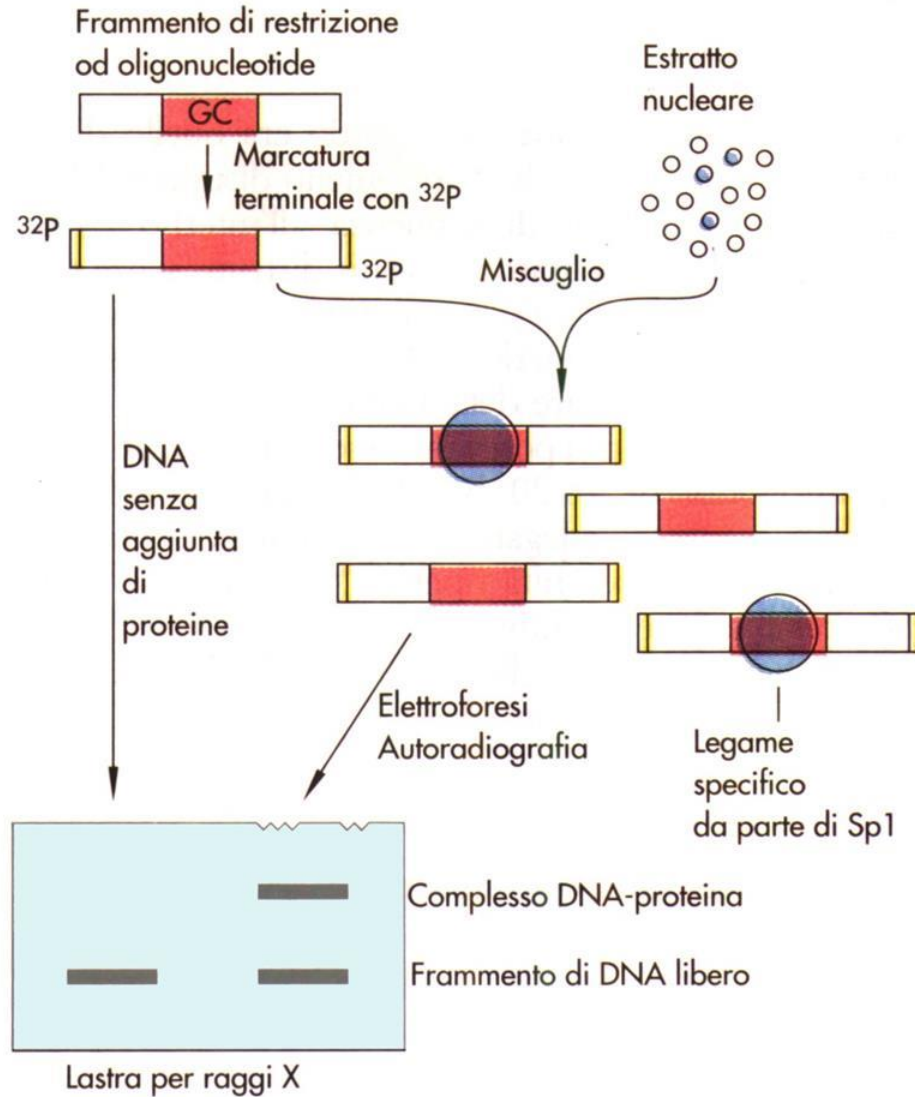
LA fase ciclica si ripete.



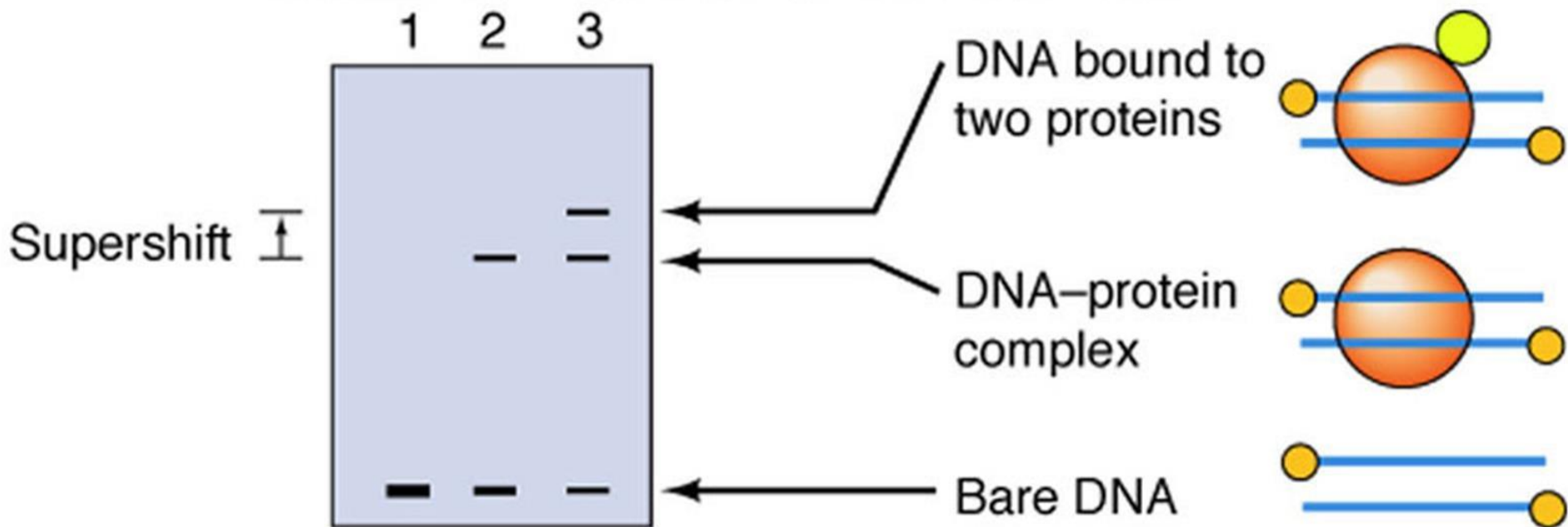
Analisi interazioni DNA-proteine: saggio di footprinting

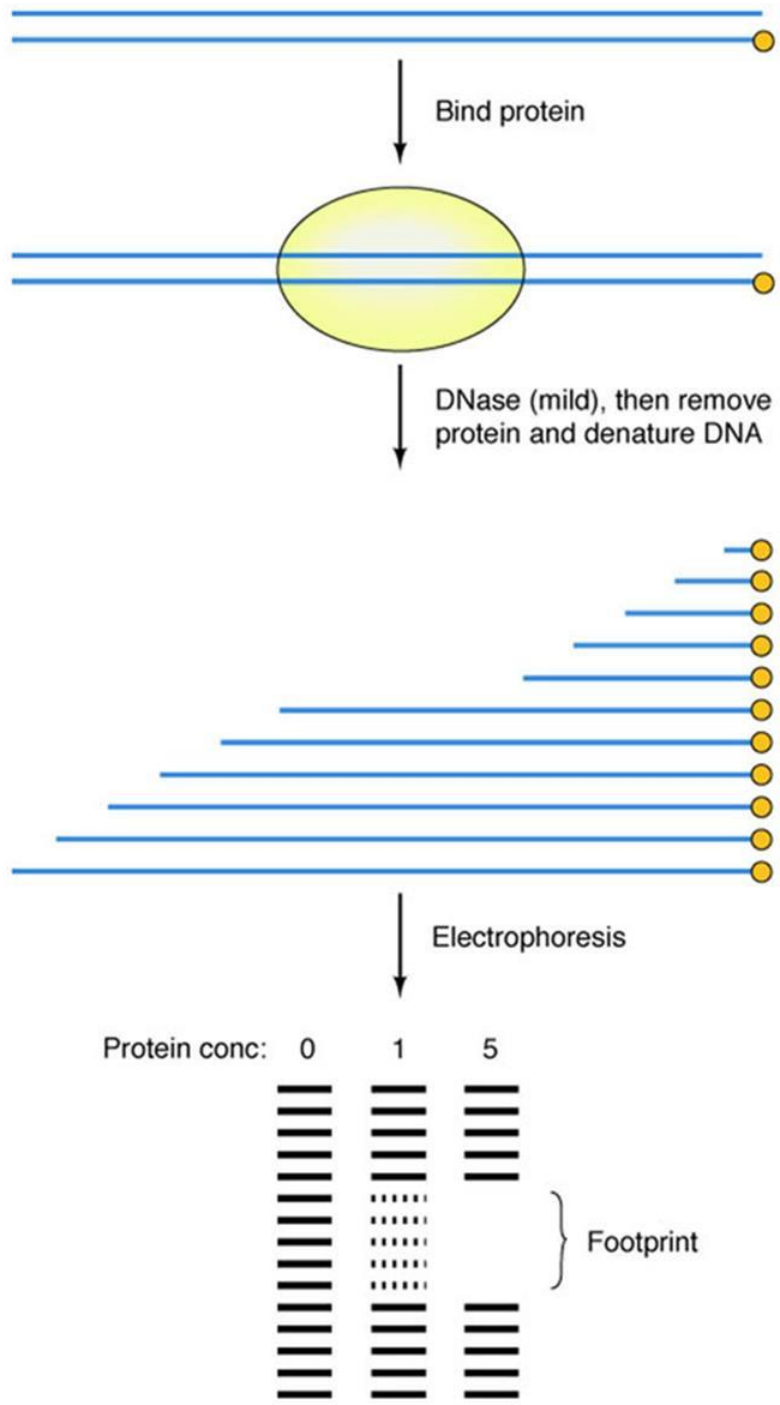


Analisi interazioni DNA-proteine: saggio EMSA

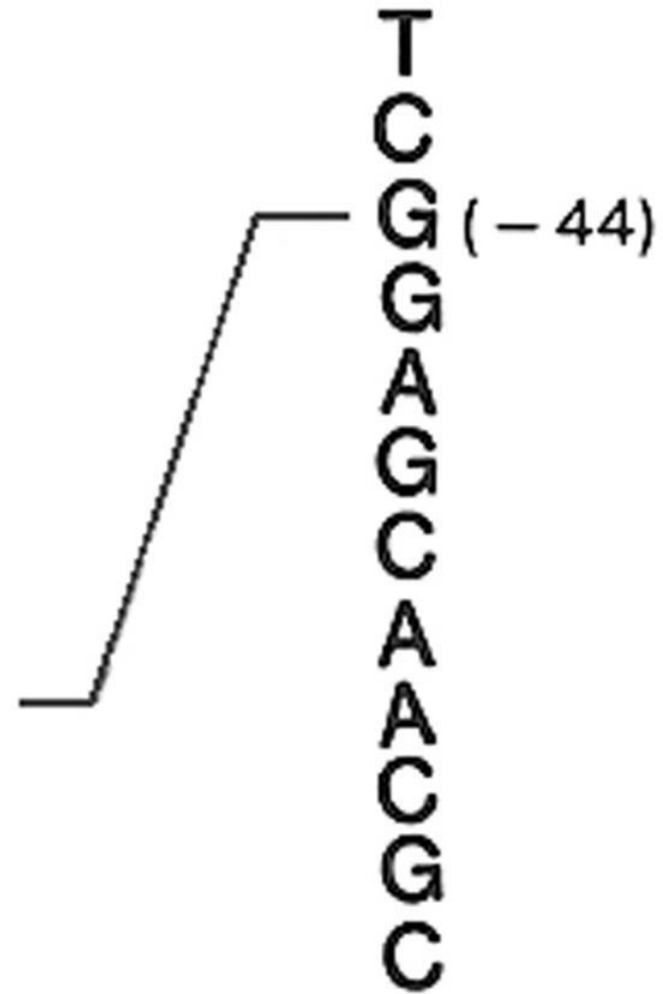
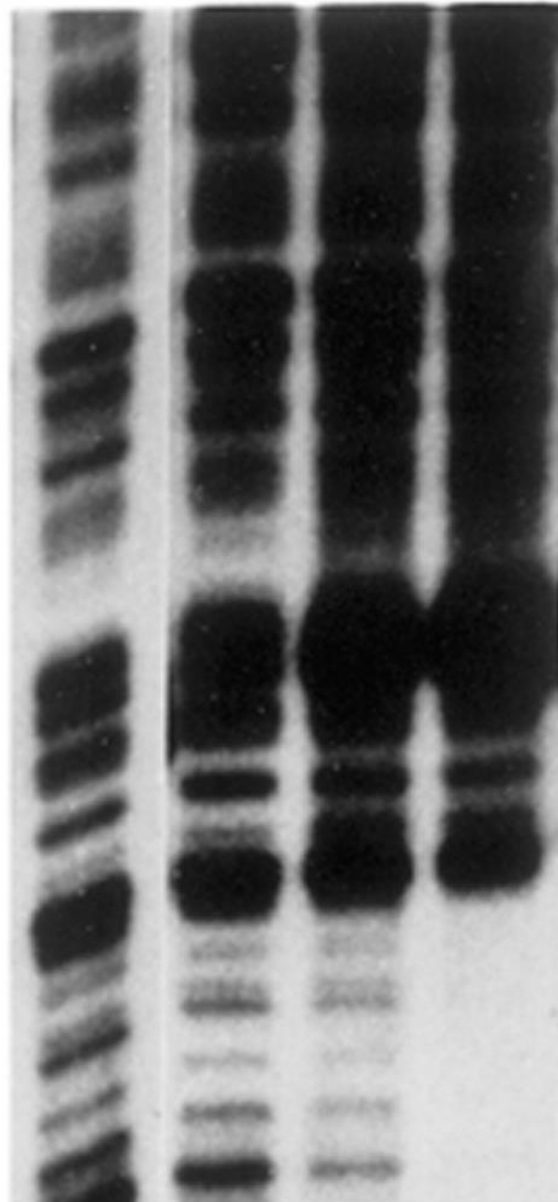


Copyright: © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.





1 2 3 4



Sequenziamento del DNA

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

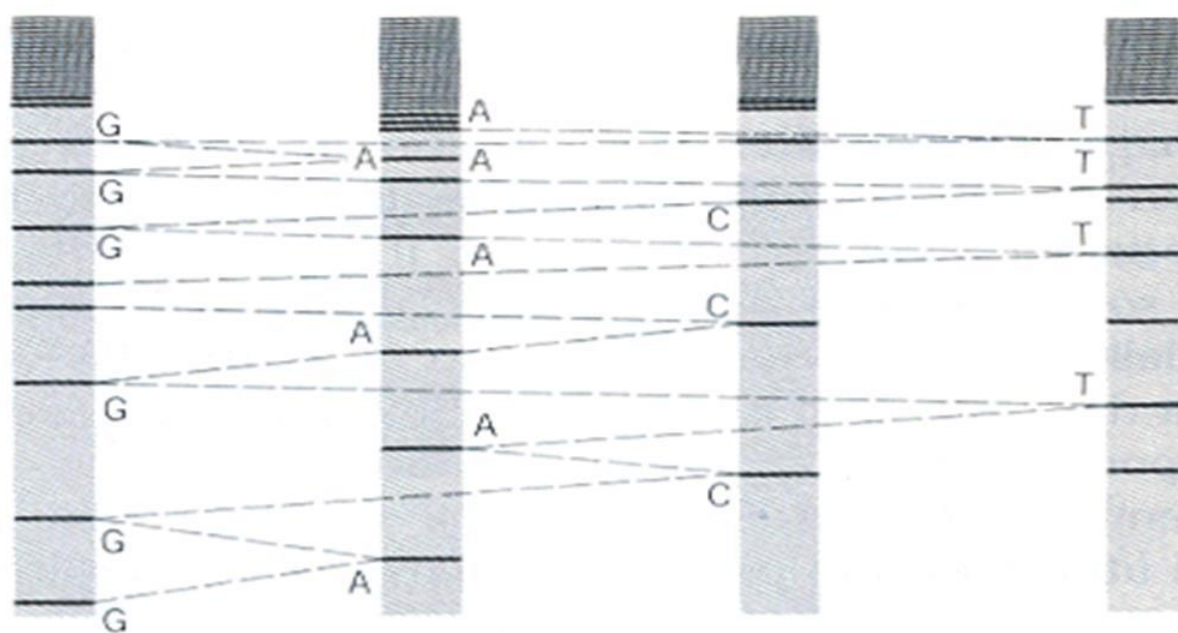
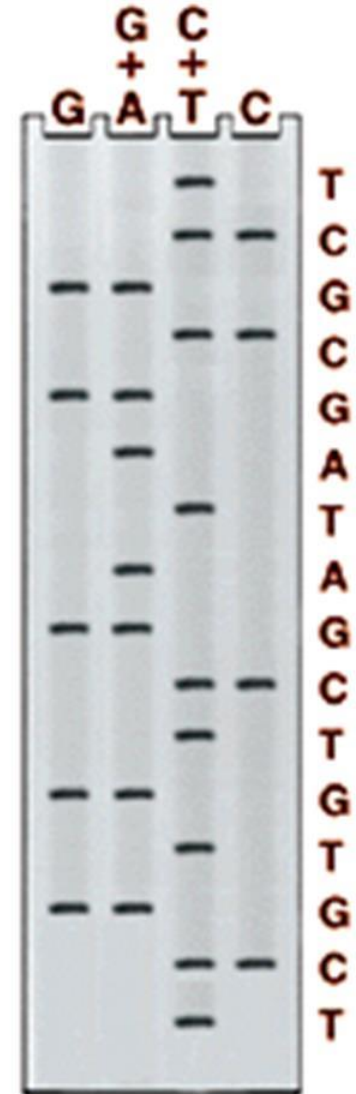
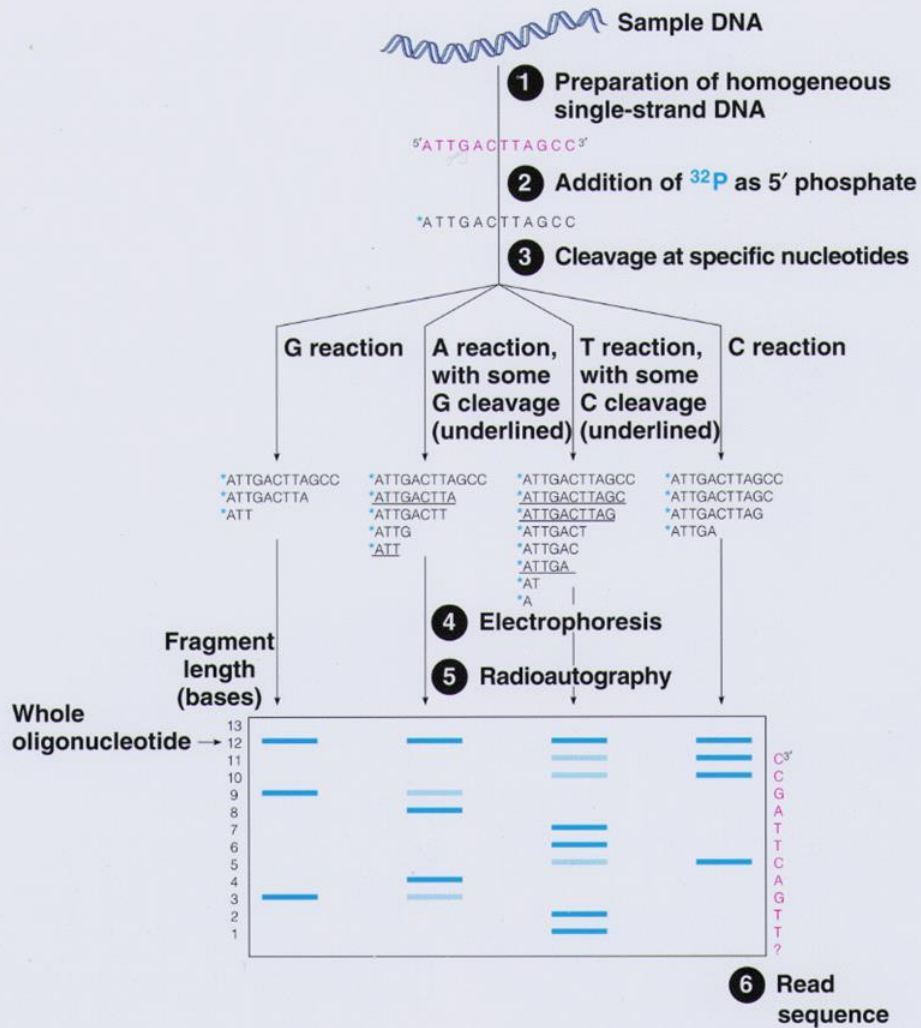


Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



Sequenziamento del DNA

Metodo enzimatico (Sanger)

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

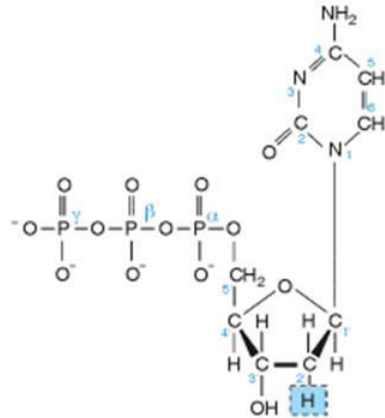
Si basa sull'uso di didesossi-nucleotidi, che possono essere incorporati nella catena nascente ma la bloccano.

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

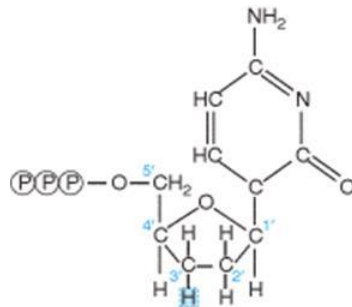
La reazione viene realizzata in presenza di deossiribonucleotidi marcati ed in 4 provette ciascuna delle quali contiene un tipo di dideossiribonucleotide che viene incorporato durante la sintesi del DNA, bloccandone la prosecuzione della stessa.

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

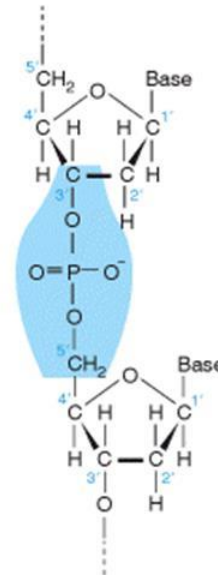


2' desossi-CTP 5' trifosfato

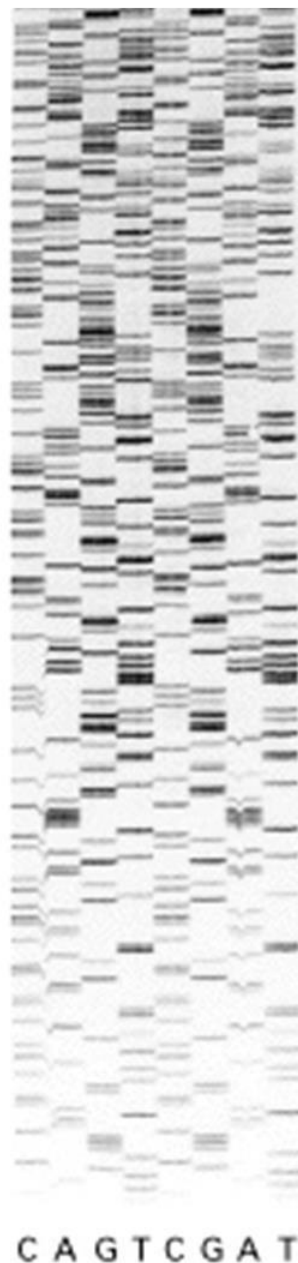
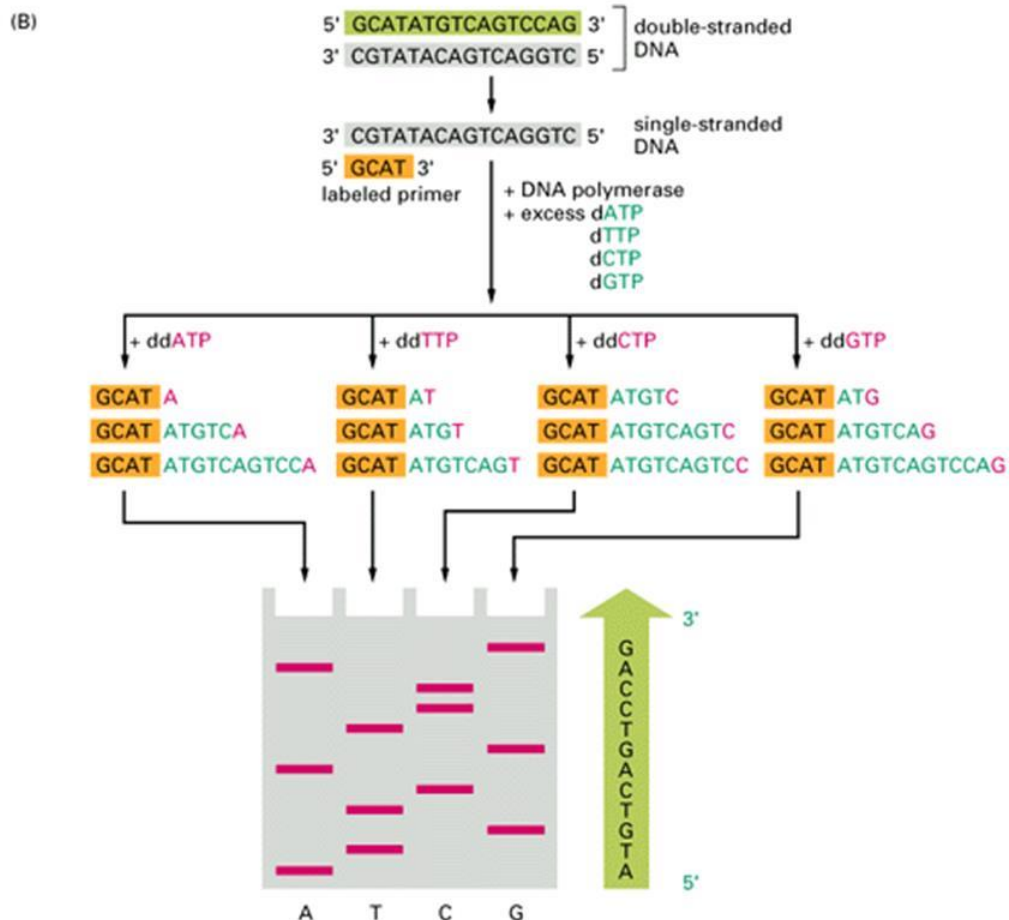
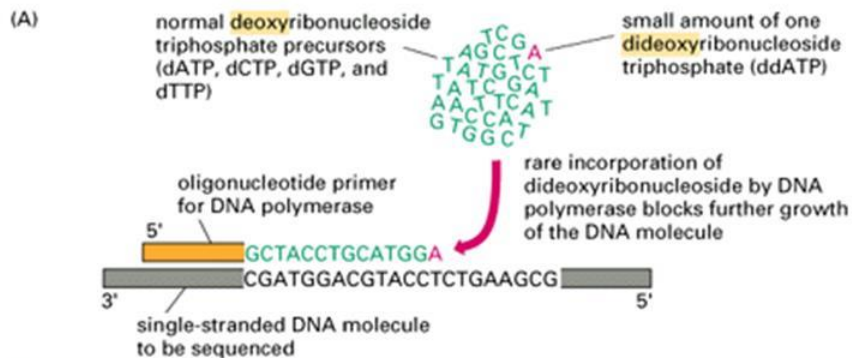


Key:
 (P) Phosphate group

2', 3' didesossi-CTP 5' trifosfato



Legame fosfodiesterico



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

Sequenziamento con Taq polimerasi

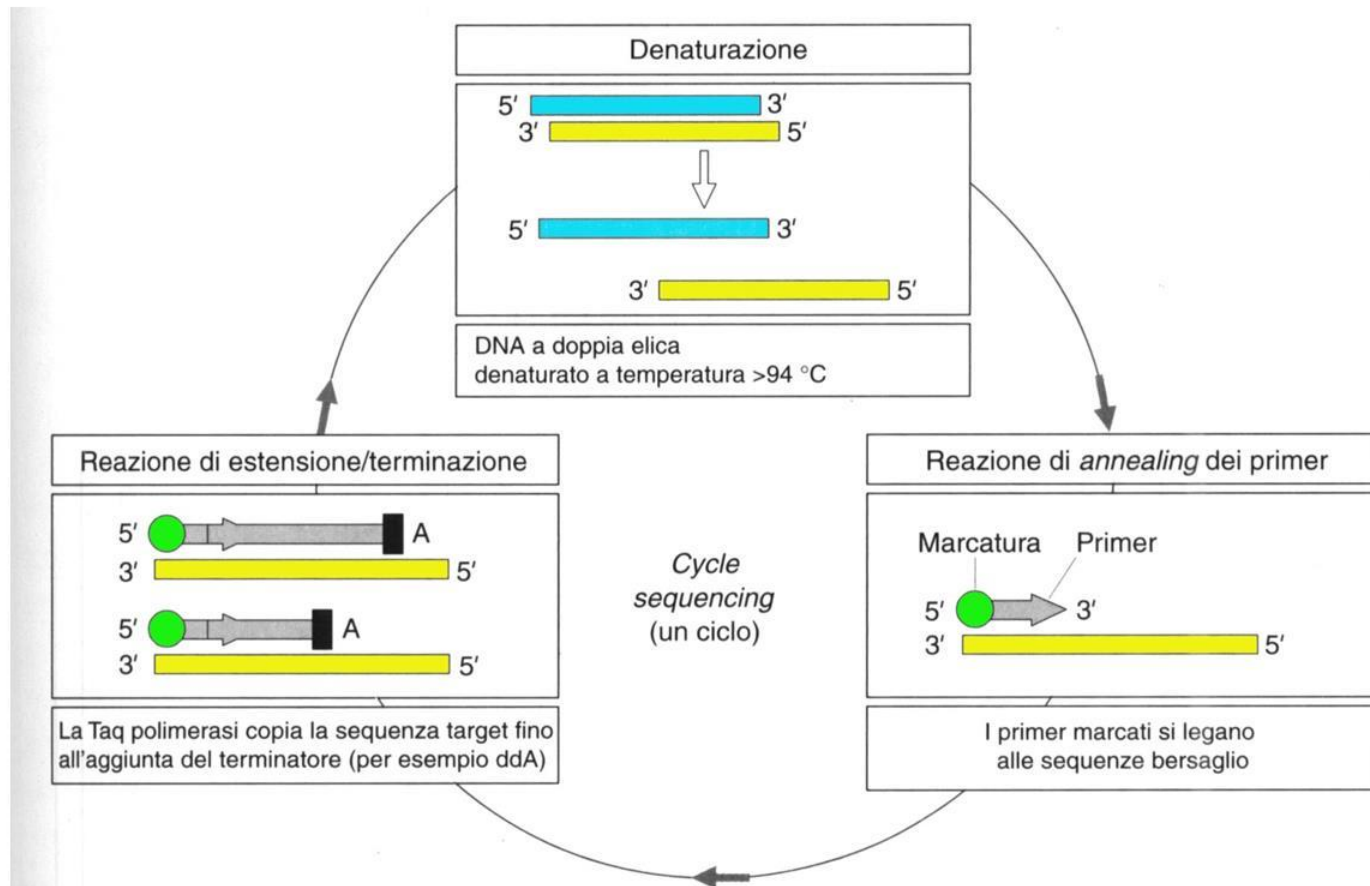


Figura 2.38 Schema semplificato del *cycle sequencing*. I primer marcati consentono l'amplificazione lineare. Durante le reazioni di estensione e terminazione, si incorporano nella sequenza crescente i didesossiribonucleotidi, terminatori della catena. Questo avviene in quattro reazioni separate (A, 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.

- ▶ Dye primer sequencing: il primer contiene al 5' un nucleotide coniugato covalentemente con un fluoroforo.



- ▶ Dye terminator sequencing: la molecola fluorescente è attaccata covalentemente a un dideossinucleotide e quindi il segnale si fissa al 3' della sequenza.



Dye Terminator Sequencing

- ▶ Un fluoroforo diverso o “colore” è usato per ognuno dei diversi ddNTP.
- ▶ Poichè I nucleotidi terminatori (ddNTPs) possono essere distinti in base al colore, tutte quattro le reazioni possono essere fatte in un'unica provetta.



I frammenti sono distinti per grandezza e “colore.”

Sequenziamento automatico

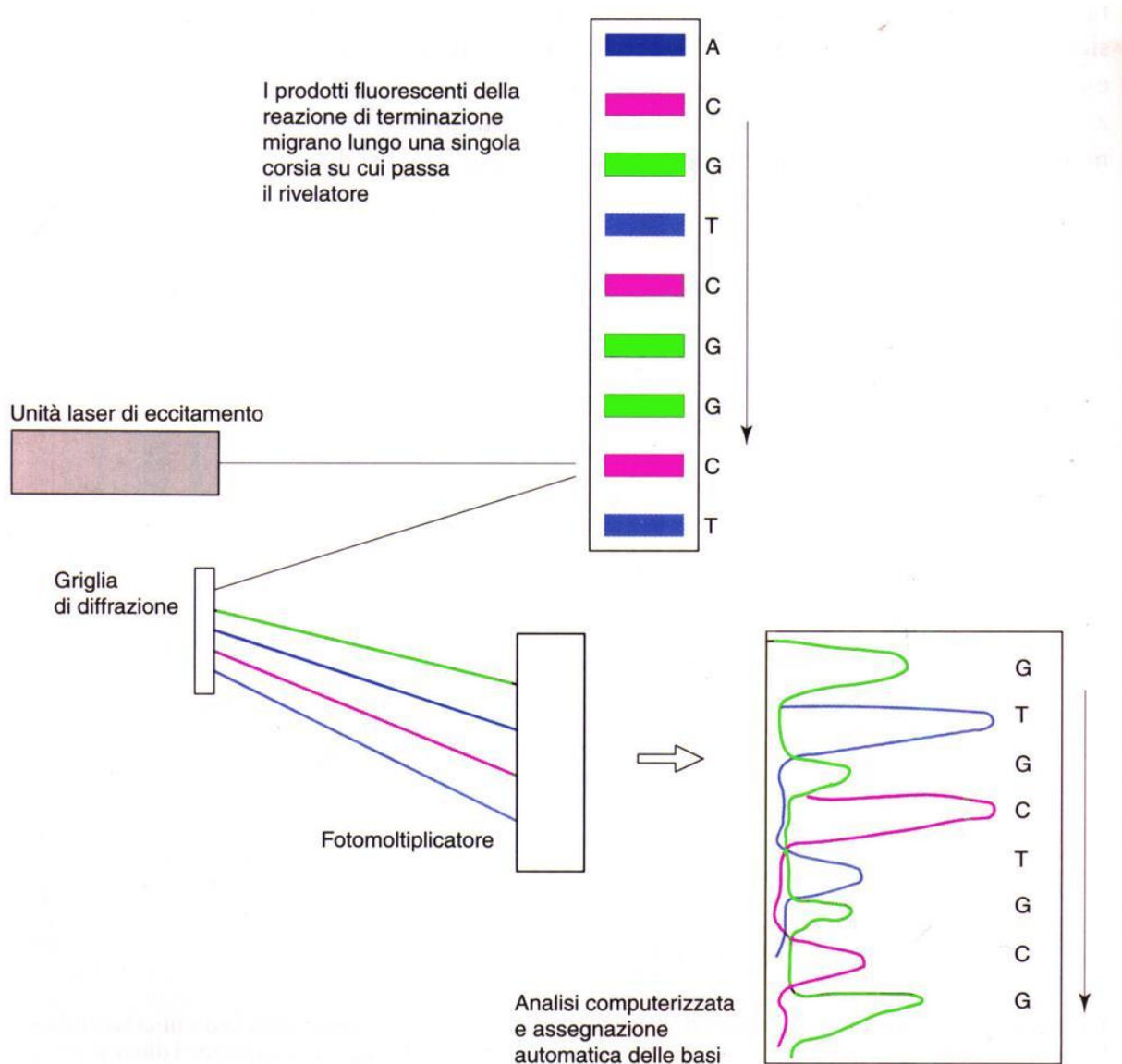
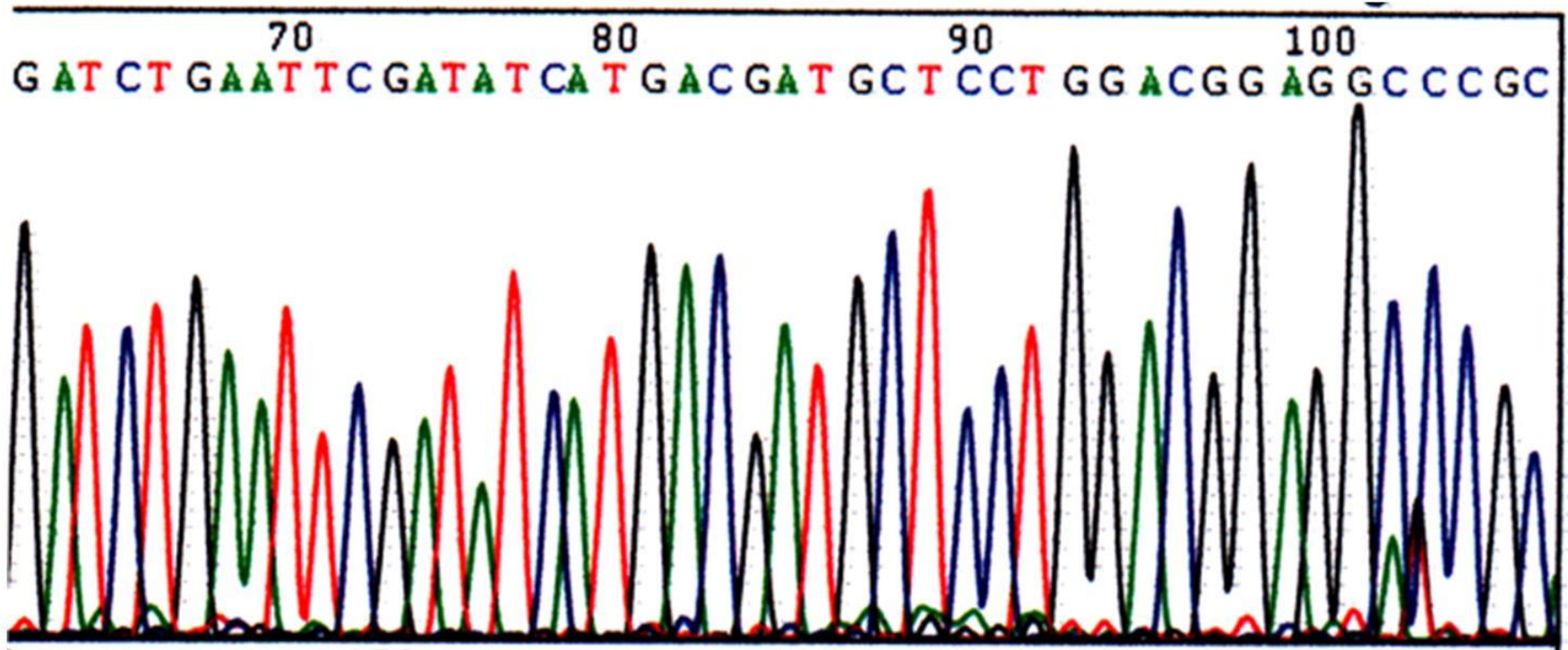


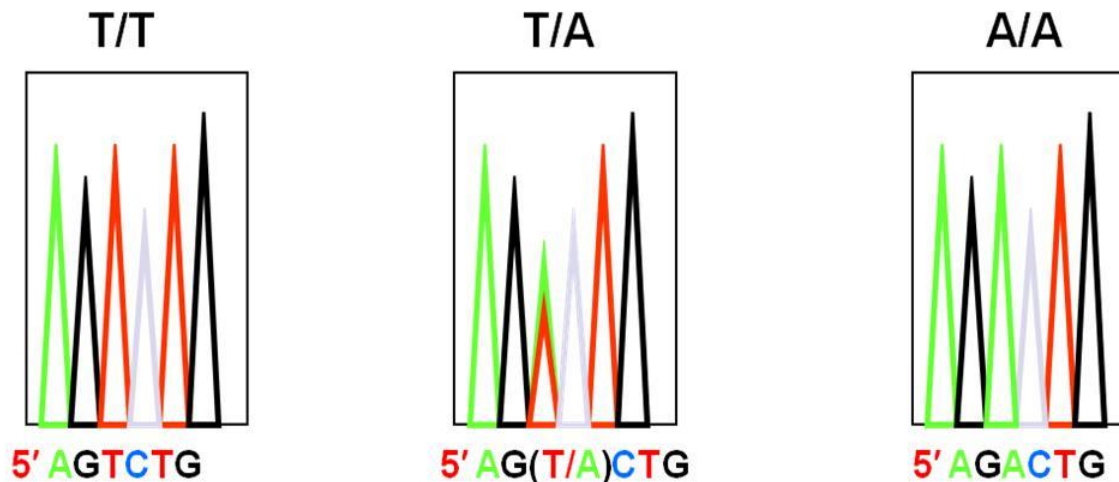
Figura 2.39 Rivelazione automatizzata della fluorescenza di sequenza, utilizzando una singola corsia di un gel e un fotomoltiplicatore.

Elettroferogramma

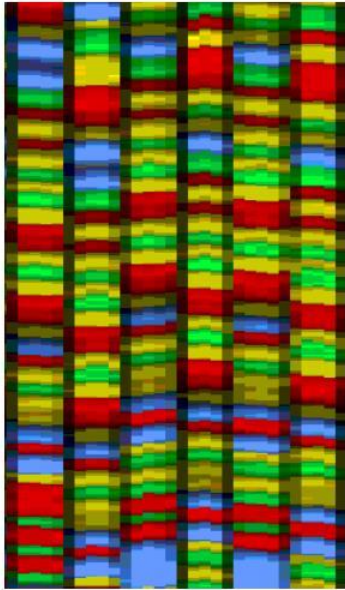


Automated Sequencing

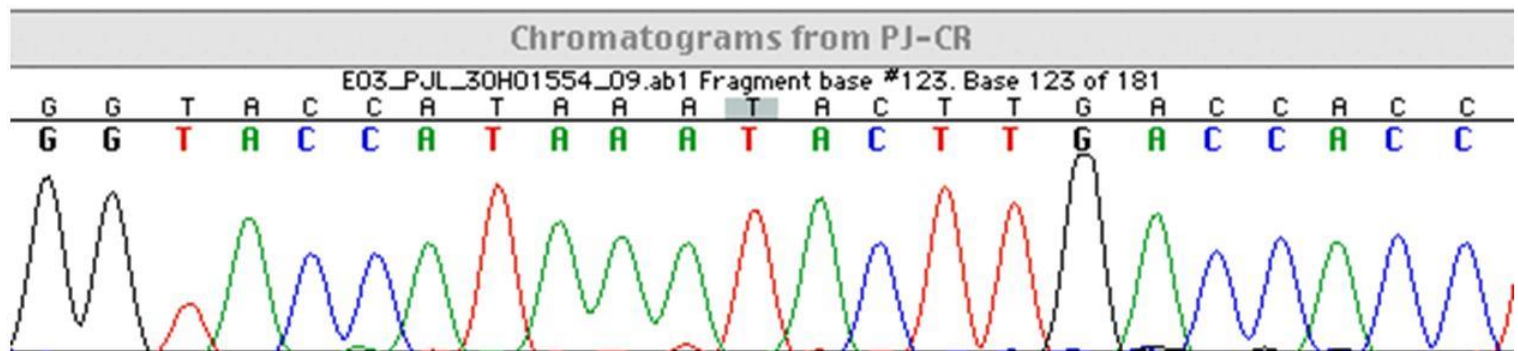
- ▶ Dye primer or dye terminator sequencing su strumenti capillari.
- ▶ Software che analizza l'elettroferogramma.
- ▶ Patterns di picchi che riflettono le mutazioni o i cambiamenti di sequenze.



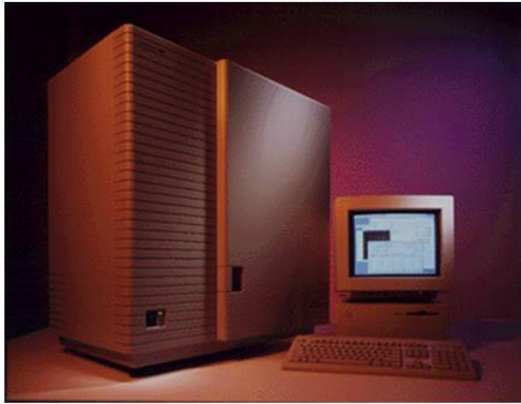
"virtual autorad" - real-time DNA sequence output from ABI 377



1. Trace files (dye signals) are analyzed and bases called to create chromatograms.
2. Chromatograms from opposite strands are reconciled with software to create double-stranded sequence data.



**Applied Biosystems PRISM 377
(Gel, 34-96 lanes)**



**Applied Biosystems PRISM 3700
(Capillary, 96 capillaries)**



**Applied Biosystems PRISM 3100
(Capillary, 16 capillaries)**

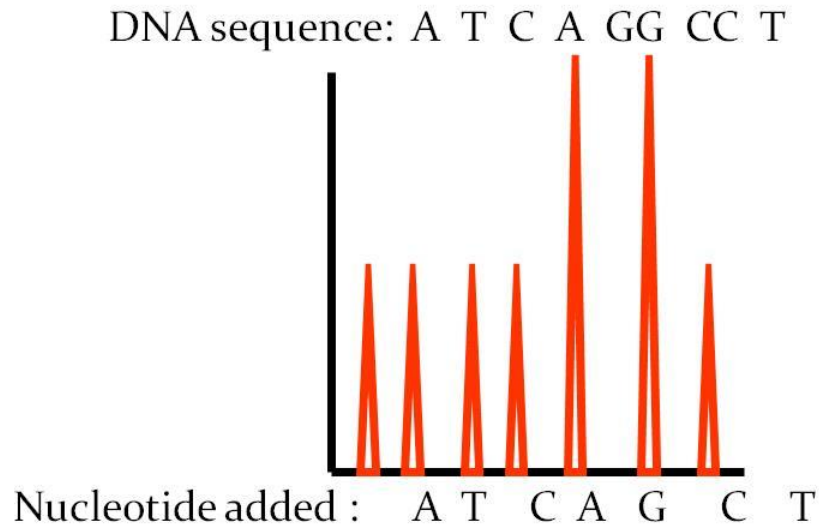


Metodo alternativo di sequenziamento: Pyro-sequencing

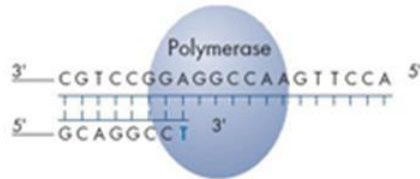
- ▶ Pyro-sequencing si basa sulla generazione di un segnale luminoso attraverso il rilascio di pirofosfato (PPi) dal nucleotide addizionato.
 - $\text{DNA}_n + \text{dNTP} \rightarrow \text{DNA}_{n+1} + \text{PPi}$
- ▶ PPi è usato per generare ATP da adenosina fosfosolfato (APS) con una ATP sulfurilasi.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

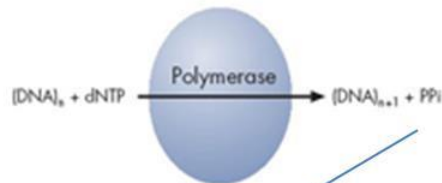


Pirosequenziamento



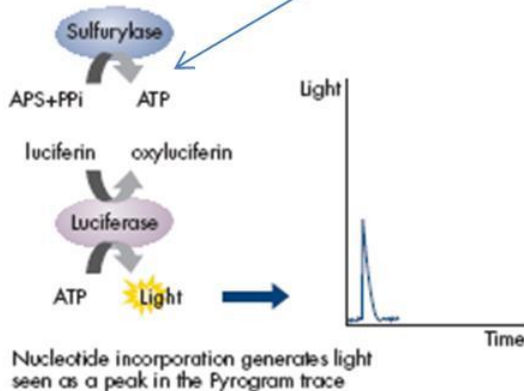
Step 1

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.



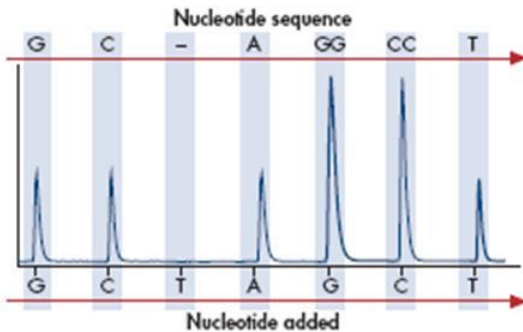
Step 3

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: ...GTCGGCGATCTATCGTGCA...

Treated sequence: ...GTCGGCGATUTATCGTGUA...



This sequence indicates that these Cs are methylated.