

Le tre fasi dell'analisi di un campione

1. Fase preanalitica

- Trasporto e spedizione, accettazione, smistamento e **conservazione dei campioni**

2. Fase analitica

- Preparazione del campione:
 - **estrazione dell'acido nucleico**
 - **(verifica della qualità dell'acido nucleico purificato)**
 - **conservazione del campione di acido nucleico**
- Esecuzione dell'analisi
- Rilevamento del dato e formulazione di un risultato.

3. Fase postanalitica.

- Refertazione, archiviazione e smaltimento dei campioni e di altro materiale.

Campioni biologici da cui il DNA e/o l'RNA vengono estratti

Tipi di campione biologico :

- Sangue totale fresco (anticoagulanti: EDTA, eparina) o congelato. Siero o plasma (ricerca di DNA virale)
- Altri liquidi corporei (espettorato bronchiale, liquido amniotico, liquido seminale, liquido cefalo-rachidiano, urine, etc)
- Campioni tissutali (biopsie)
 - – Freschi/congelati
 - – Immersi in paraffina
- Cellule in coltura
- Tracce di DNA da campioni vari (tamponi boccali, capelli, macchie di sangue, di liquido seminale, mozziconi di sigaretta ecc.)

Trattamento e conservazione dei campioni biologici

La correttezza del risultato analitico dipende dal mantenimento delle peculiarità chimiche e biologiche del campione stesso.

La qualità più elevata di DNA/RNA si ottiene da materiale fresco. Se ciò non è possibile i campioni vanno conservati a basse temperature.

DNA:

Conservare i campioni biologici a 2–8 °C per 24-48 ore.

Congelarli a –20/ -70 °C per periodi più lunghi. Non congelare e scongelare i campioni più volte: causa frammentazione del DNA.

RNA:

Conservare i campioni biologici a –20/ -70 °C anche per brevi periodi.

Utilizzare stabilizzanti che contengono di inibitori dell'enzima RNasi .

Trattamento dei campioni

Campioni di sangue:

Prelevare il sangue in presenza di anticoagulante.

Se va congelato lisare prima i globuli rossi (RBCs). Un fondello con i leucociti può essere congelato per un anno.

Sistemi di estrazione degli acidi nucleici.

Obiettivo: ottenere campioni di DNA/RNA privi di molecole contaminanti che possono alterare od inibire le successive fasi dell'analisi.

Numerosi sono i metodi per isolare il DNA/RNA. Principi generali per la purificazione degli acidi nucleici sono:

- Lisi delle cellule (o delle pareti) e rilascio del contenuto.
- Separazione del DNA/RNA dal contenuto cellulare in particolare dalle proteine (enzimi) contaminanti.
- Recupero (e concentrazione) del DNA/RNA purificato.

Fase di preparazione del campione

- **Scopo:** ottenere materiale in condizioni ottimali per indagini di tipo molecolare
- **Requisiti:**
 - Non danneggiare gli acidi nucleici
 - Rilasciare acidi nucleici
 - Concentrare gli acidi nucleici
 - Eliminare inibitori
 - **Stabilizzare il campione:** tempo, temperatura, luce
deteriorano gli acidi nucleici

Purificazione acidi nucleici

I protocolli sperimentali variano a seconda del materiale di partenza, del tipo di acido nucleico che si vuole separare, del tipo di esperimento che si deve effettuare.

I passi principali della purificazione degli acidi nucleici sono

- 1. Rompere la parete e/o la membrana cellulare**
- 2. Allontanamento delle membrane**
- 3. Separare gli acidi nucleici dagli altri componenti cellulari (lipidi, proteine e carboidrati)**
- 4. Separare gli acidi nucleici tra loro (per es. il DNA dall'RNA)**
- 5. Precipitazione alcolica e purificazione**
- 6. Dosaggio**

Metodi di lisi cellulare

Tecnica	Applicazione
Metodi non meccanici	
Shock osmotico	Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
Congelamento/scongelamento	Tessuti animali molli, alcuni batteri
Enzimi litici	Cellule animali e vegetali
Soluzioni con Detergenti (NP40, SDS)	Cellule in coltura, batteri
Metodi meccanici	
Pestello e mortaio	Tessuti resistenti
Sfere di vetro	Batteri e funghi
Omogenizzatore a motore	Tessuti vegetali e animali
Omogenizzatore a mano	Tessuti molli delicati
Estrusione solida (Hughes press)	Materiale vegetale resistente
Estrusione liquida (French press)	Microorganismi
Ultrasonificazione	Microorganismi

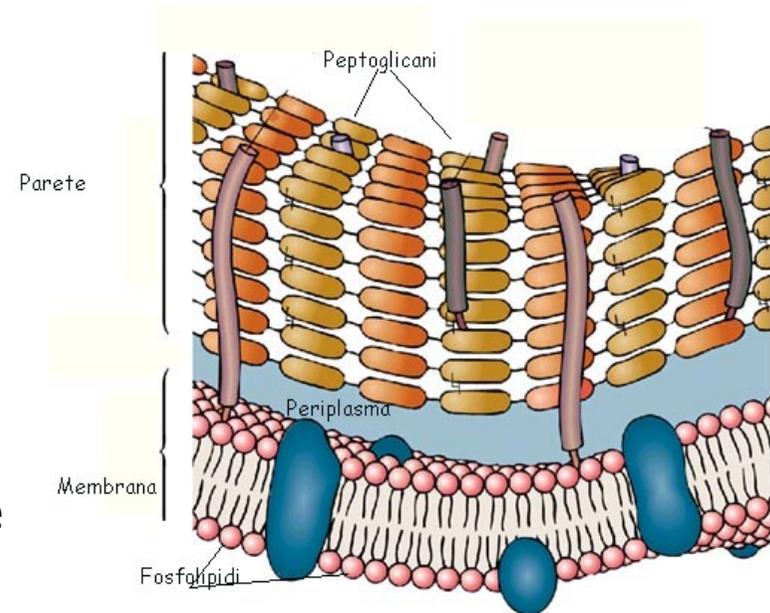
Rottura della parete e della membrana cellulare delle cellule batteriche

Nelle cellule procariotiche oltre alla membrana cellulare bisogna distruggere la parete cellulare costituita da un componente rigido (**peptidoglicano**), che è un eteropolimero .

Questi polimeri lineari sono disposti l'uno accanto all'altro e sono uniti da piccoli peptidi, la cui struttura dipende dalla specie batterica.

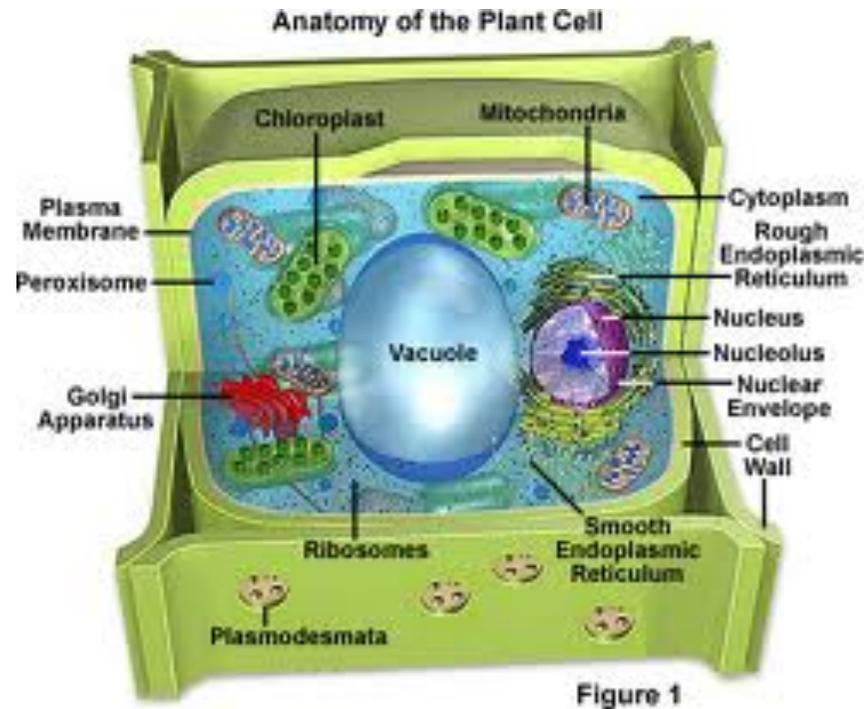
La rottura della parete batterica è effettuata mediante trattamento con una miscela contenente:

- Il **lisozima** che idrolizza il legame glicosidico del peptidoglicano (è presente nell'albume dell'uovo, nelle lacrime, come difesa degli occhi contro le infezioni batteriche)
- l'**EDTA** che è un agente chelante che sequestra i cationi bivalenti necessari per la stabilizzazione delle membrane (e per l'attività di molti enzimi tra cui la DNasi)
- l'**SDS** (detergente anionico) che solubilizza i lipidi delle membrane e lega le proteine alterandone la struttura secondaria



Rottura della parete e/o membrana cellulare cellule eucariotiche vegetali

Per le cellule vegetali e i funghi, che possiedono una parete cellulare più resistente rispetto ai batteri, è necessario rompere la parete con metodi fisici (cicli ripetuti di congelamento-scongelamento, biglie di vetro, sonicazione, utilizzo di mortaio e pestello, ecc.) oppure metodi enzimatici capaci di digerire la parete cellulare.



Rottura della parete e/o membrana cellulare cellule eucariotiche animali

Le membrane delle cellule animali sono solubilizzate con detergenti blandi quali SDS

Per un campione di tessuto è necessaria un'iniziale omogenizzazione che è realizzata mediante:

- Metodi meccanici: omogeneizzatore a pestello (potter).
- Vibrazioni ultrasoniche
- Congelamento/scongelamento



OMOGENIZZATORE



SONICATORE

La deproteinizzazione del lisato e un passaggio fondamentale prima di procedere alla estrazione degli acidi nucleici

La rimozione delle proteine dal lisato cellulare è particolarmente importante sia perché tra le proteine sono presenti enzimi capaci di degradare gli acidi nucleici, sia per la presenza di proteine capaci di legarsi agli acidi nucleici impedendone la funzione e/o la purificazione.

Uso di enzimi proteolitici, tipo pronasi e proteinasi K.

- la Pronasi: miscela di almeno 4 enzimi proteolitici di cui due endopeptidasi (serina- e metallo-proteasi) e due esopeptidasi (carbossi e ammino-petidasi).

- la Proteinasi K, così detta per il suo potere di idrolizzare la cheratina, è una endopeptidasi di origine fungina. La rimozione degli ioni Ca^{++} determina la perdita dell'80% della sua attività enzimatica, ma l'attività residua è comunque sufficiente a degradare le proteine che contaminano gli acidi nucleici.

Pertanto la digestione può essere condotta in presenza di EDTA, necessario per inattivare le DNasi.

Gli enzimi proteolitici andranno poi eliminati.

- Per le preparazioni di DNA, per eliminare l'RNA si usa la *ribonucleasi A (RNasi)*;

- Per le preparazioni di RNA, per eliminare contaminazioni di DNA invece è utilizzata la *desossiribonucleasi (DNasi)*.

Anche queste attività enzimatiche vanno poi eliminate

Estrazione con fenolo

(miscela di fenolo: cloroformio: alcool isoamilico (25:24:1))

E' la tecnica comunemente utilizzata per rimuovere le proteine dagli acidi nucleici, e consiste nel trattare la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici con una miscela fenolo/cloroformio, immiscibile (quasi) in acqua.

Tale procedura può essere usata da sola o dopo la digestione con enzimi proteolitici, al fine di rimuoverli.

Fenolo

E' un forte denaturante delle proteine che le lega mediante legami H, alterandone la struttura.

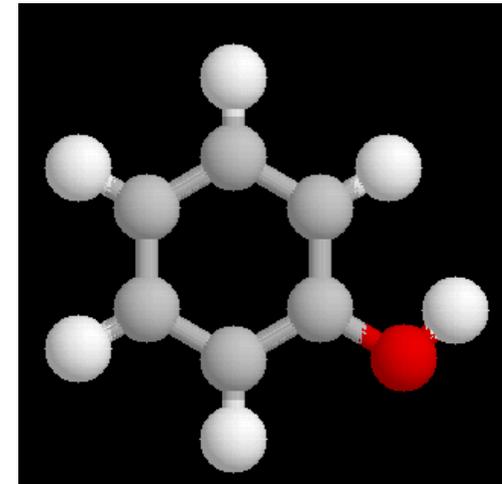
Le proteine denaturate, con i gruppi idrofobici esposti, diventano solubili nella fase fenolica o precipitano all'interfase fenolo-acqua.

E' un solvente dei lipidi e delle molecole di RNA contenenti lunghi tratti di poli(A).

Cloroformio

- completa la denaturazione delle proteine
- rimuove i lipidi
- grazie alla sua elevata densità facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica) stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi.

Alcol isoamilico: riduce la schiuma che si forma nel corso dell'estrazione.



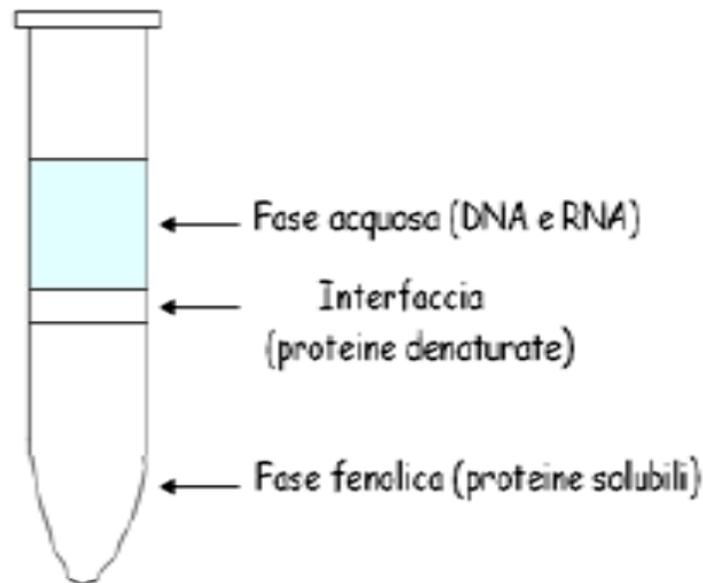
Dopo centrifugazione si ottengono tre fasi:

- 1) superiore, che contiene la soluzione di acidi nucleici;
- 2) interfase, di proteine denaturate;
- 3) inferiore, fase fenolica contenente lipidi e proteine ricche di aminoacidi idrofobici.

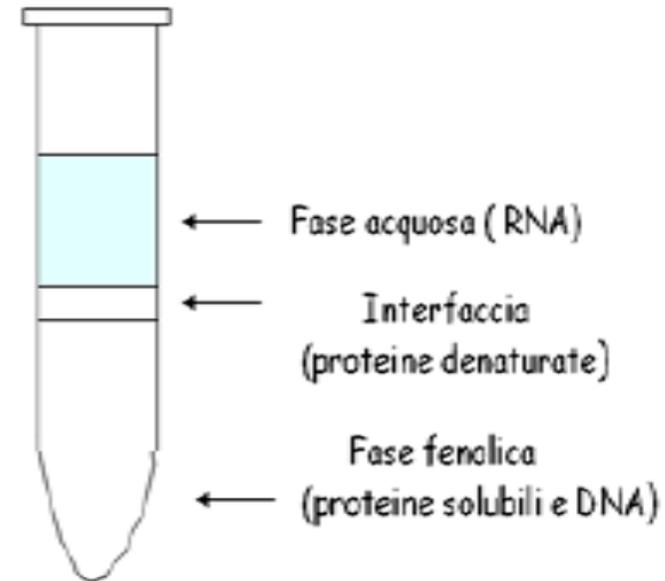


Il fenolo è fortemente igroscopico e deve essere sempre equilibrato con una soluzione tampone perché altrimenti assorbirebbe la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici.

pH neutro o alcalino



pH acido



Il fenolo tende ad ossidarsi facilmente assumendo un colore rossastro per la presenza di chinoni.

Al fenolo è aggiunta la 8-idrossichinolina (antiossidante, parziale inibitore delle RNasi e un debole chelante di ioni metallici)

Precipitazione con alcol per concentrare gli acidi nucleici

le proteine sono insolubili in alcol e co-precipiterebbero in larga misura con gli acidi nucleici se non fossero preventivamente rimosse



La soluzione acquosa contenente l'acido nucleico è miscelata con 2 volumi di etanolo assoluto, in presenza di cationi monovalenti (Na^+ , K^+ , NH_4^+) e viene lasciata precipitare a -80°C .

L'alcool etilico determina modificazioni strutturali degli acidi nucleici che ne inducono l'aggregazione e quindi la precipitazione

Uso dell'isopropanolo per la precipitazione vantaggio: uso di volumi inferiori (0,7 volumi per volume di soluzione)
svantaggio: meno volatile dell'etanolo e quindi di più difficile rimozione

La precipitazione è fortemente dipendente dal raggiungimento di una **massa critica** (per concentrazioni $<10\text{mg/ml}$ uso di carrier: tRNA di lievito, o glicogeno)

Precipitazione DNA

Lo scopo di questa fase è di concentrare, desalificare e recuperare il DNA in forma solida permettendone il successivo ridiscioglimento nella soluzione desiderata

- **Trattamento con alcoli**
 - **etanolo**: in presenza di alte concentrazioni di sali monovalenti (sodio acetato, ammonio acetato)
 - **isopropanolo**: non richiede alte concentrazioni saline ma è meno facilmente eliminabile dell'etanolo
- Il DNA non si scioglie nell'alcool e la sua aggiunta come soluzione fredda fa aggregare rapidamente insieme le molecole di DNA che così possono precipitare
- L'aggiunta di NaCl fa avvicinare tra di loro le molecole di DNA diminuendo la repulsione tra di loro dovuta alla schermatura delle cariche negative dello scheletro zucchero-fosfato da parte degli ioni Na⁺ rendendo così più facile la loro precipitazione con gli alcoli.

Fasi finali

- **Lavaggio del pellet**

Dopo centrifugazione, il pellet di acido nucleico è “lavato” in etanolo 70% e ricentrifugato. Tale lavaggio rimuove i sali precipitati.

- **Risospensione del DNA**

Il pellet dopo essiccazione è risospeso in adeguato tampone a bassa forza ionica, in genere TE (Tris-EDTA) a pH 7.6-8.0, alla concentrazione desiderata

Frammentazione del DNA

- **Danneggiamento a causa sollecitazioni meccaniche**
 - maneggiare con delicatezza
 - no vortex a velocità elevata
 - no pipettamento eccessivo e vigoroso
- **Digestione da parte di nucleasi cellulari**
 - lavorare con i guanti
 - soluzioni e materiali sterili
 - soluzioni contenenti EDTA
- **Azione metalli pesanti (rottura legami fosfodiesterici)**
 - soluzioni contenenti EDTA

Kit di purificazione degli acidi nucleici

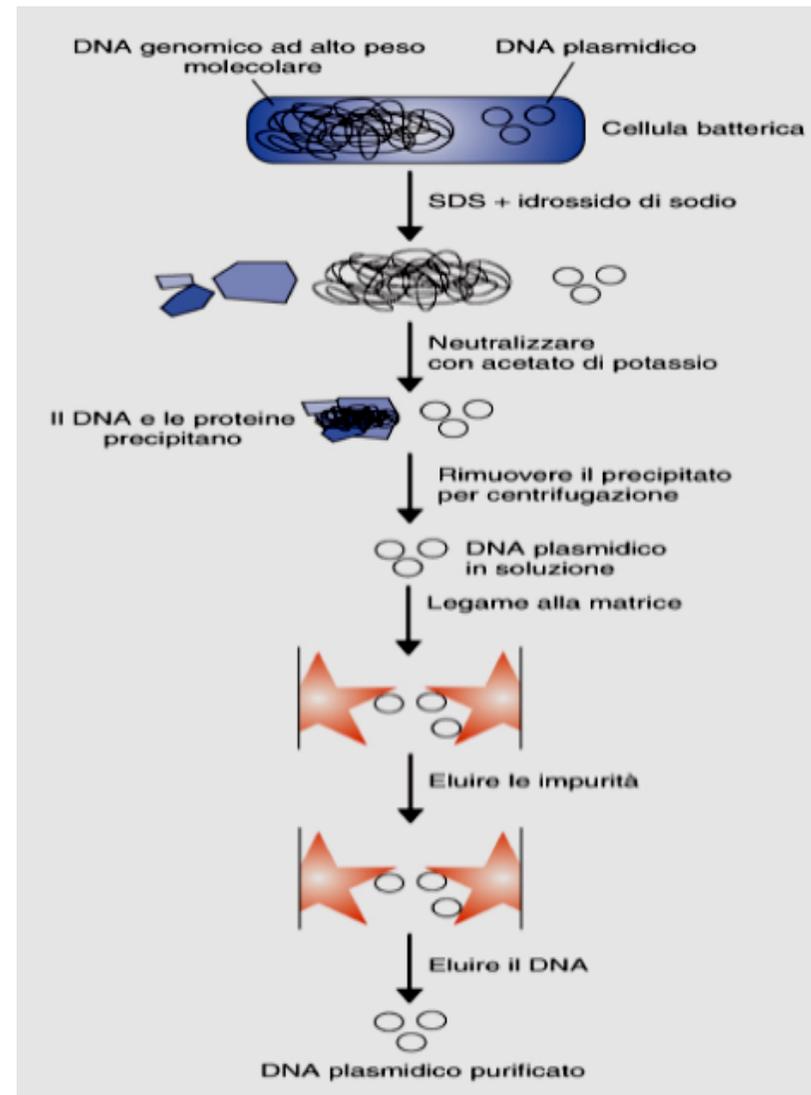
I kit piu' utilizzati si basano sull'utilizzo di:

Matrici silicee: gli acidi nucleici si legano alle particelle della matrice in presenza di sali caotropici (idrocloruro (GuHCl) e isotiocianato (GuSCn) di guanidina).

Differenti tipi di acido nucleico adsorbono più o meno bene alla matrice di silice, a seconda della forza ionica e del pH della soluzione.

Dopo avere lavato la matrice silicea, gli acidi nucleici sono eluiti con un tampone a bassa concentrazione salina o con acqua e sono pronti per le successive reazioni

Resine a scambio ionico cariche positivamente (anioniche): legame del DNA alla DEAE (dietilaminoetano) in tampone contenente 1M NaCl. Eluizione del DNA in tampone 1,6 M.



Nota: il DNA ottenuto è molto puro ma la resa è inferiore rispetto al metodo classico con solventi

Metodi di isolamento del DNA

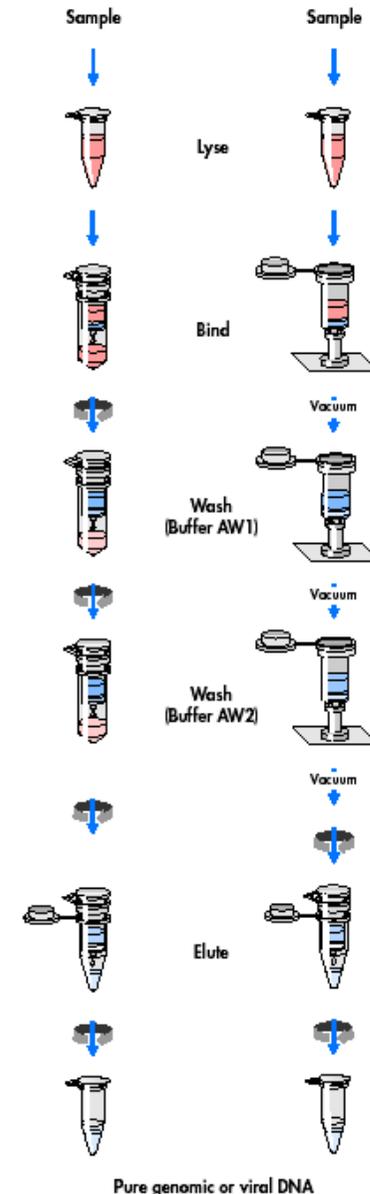
Procedure in fase solida

La separazione del DNA dagli altri componenti cellulari può avvenire anche in fase solida. Principali passaggi:

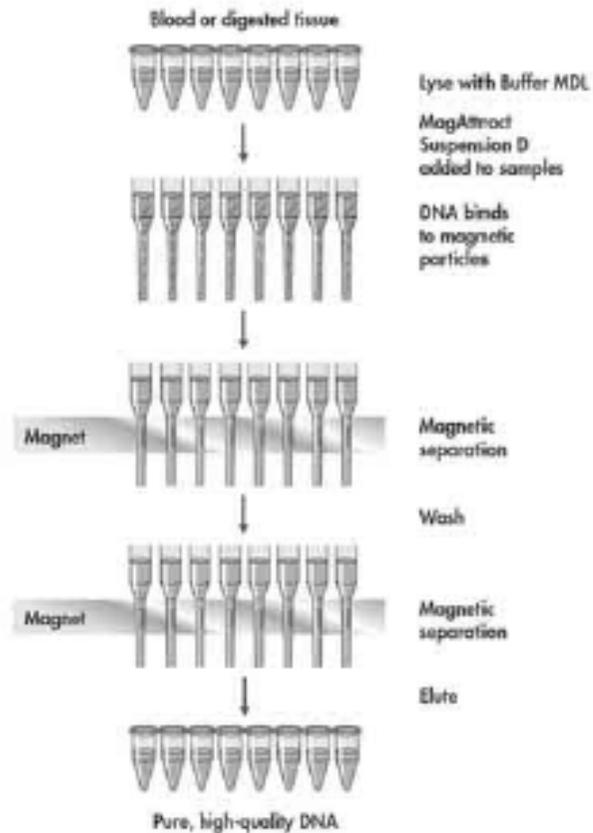
- Lisi delle cellule. (vedi protocolli in fase liquida)
- Passaggio su di una resina insolubile (**resine di silice**) che lega in maniera specifica il DNA in presenza di sali
- Lavaggio della resina con tamponi che permettono la separazione dai contaminanti (etanolo 70%)
- Eluizione del DNA dalla resina con acqua o soluzioni a bassa concentrazione di sali che ne facilitano il distacco

In alternativa: **resine a scambio anionico** con gruppi **DEAE (dietilaminoetil)** per legare il DNA (eluizione con sali e precipitazione).

Procedure in fase solida: veloci, facili da usare, possono essere adoperate con sistemi automatizzati.



Sistema di estrazione automatizzato con utilizzo di sferette magnetiche



DNA purificato

1. Lisi delle cellule (sangue o tessuti)

2. Trasferimento in colonnine contenenti particelle magnetiche rivestite di resina di silice a cui il DNA si lega

3. Aggiunta di un magnete che trattiene il DNA legato alle particelle

4. Apertura dell'estremità inferiore della colonna e aggiunta di tamponi per poter allontanare i contaminanti (mentre il DNA è trattenuto)

5. Allontanamento del magnete ed eluizione del DNA (purificato) dalla colonna in TE o acqua (le particelle magnetiche sono trattenute nella colonna).

Purificazione dell'RNA

Particolarità nei protocolli di estrazione dell'RNA:

- L'estrazione dei campioni deve avvenire in tamponi di lisi contenenti inibitori delle RNasi (guanidinio tiocianato).
- Per evitare contaminazioni di DNA genomico nella preparazione dell' RNA ai tamponi di lisi sono aggiunte DNasi RNasi-free.
- Per estrarre l'RNA virale si parte da siero o plasma privo di cellule.
- L'RNA è una molecola che viene facilmente degradata dalle ribonucleasi (RNasi), per minimizzare la loro azione occorre:
 - Prestare attenzione a non introdurre RNasi esogene (indossare i guanti).
 - Utilizzare solo soluzioni e materiali sterili o trattati con DEPC (dietilpirocarbonato).
 - Conservare i campioni di RNA in ghiaccio durante la loro manipolazione.
 - Riportare sui materiali (provette, puntali, filtri etc) da utilizzare per la manipolazione dell'RNA l'indicazione **“Solo per RNA”**.

Estrazione e analisi dell'RNA

Una tipica cellula di mammifero contiene circa 20-30 picogrammi di RNA.

La popolazione di RNA cellulari è molto eterogenea

RNA totale :

- **RNA codificante proteine (~4%)**

Comprende le molecole di mRNA citoplasmatico e i precursori nucleari (*hnRNA: heterogeneous nuclear RNA*)

- **RNA non codificante proteine (~96%)**

- RNA ribosomiali: 28S, 18S, 5,8S e 5S, con i relativi precursori, che costituiscono fino all'80% dell'RNA totale

- tRNA e altri piccoli RNA a localizzazione nucleare, nucleolare o citoplasmatica (es. snRNA, snoRNA, scRNA)

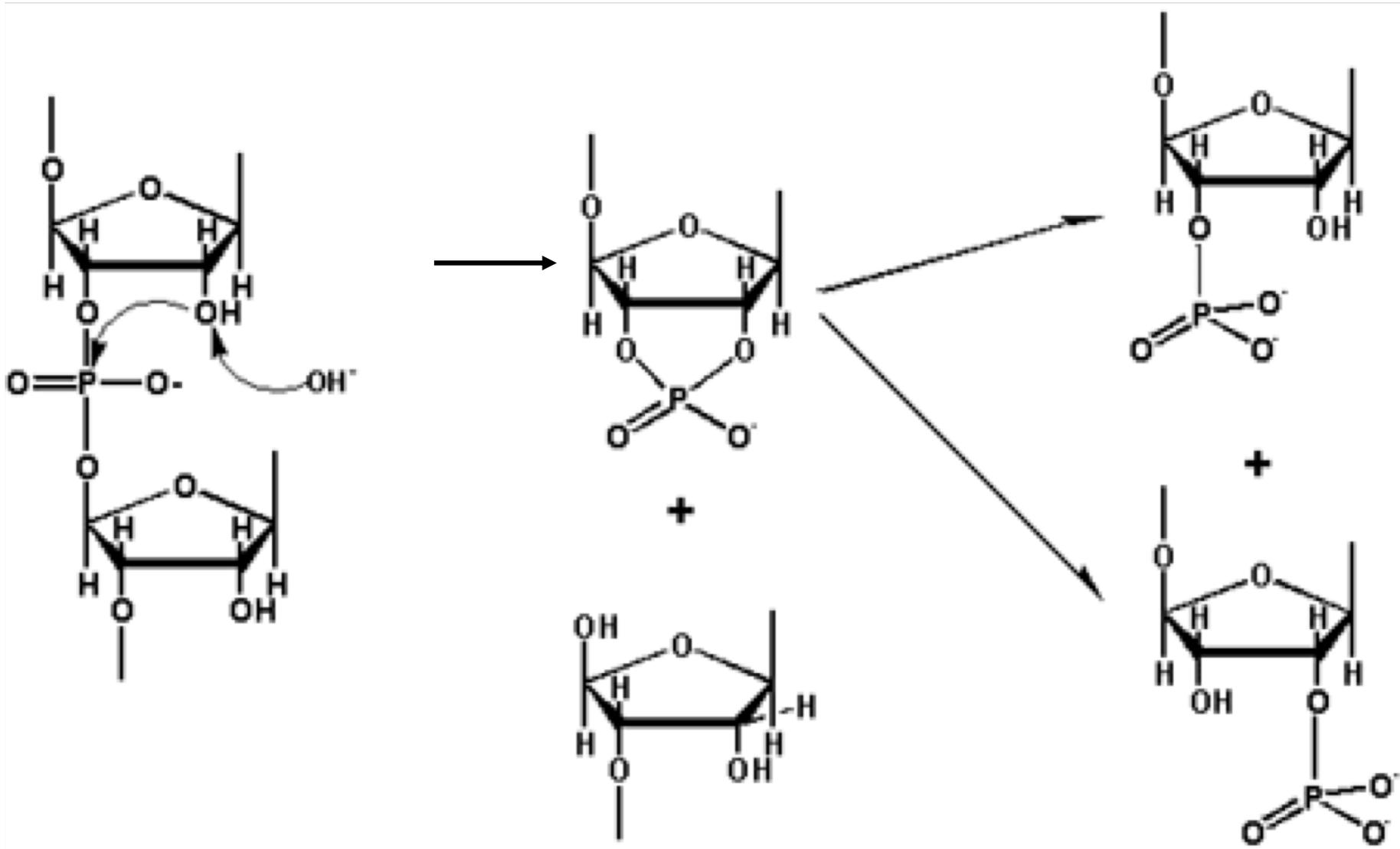
Estrazione dell'RNA

Vincere la battaglia con le RNasi

- Le DNasi richiedono ioni metallici per la loro attività e sono termolabili, per cui sono facilmente inattivate da agenti chelanti e dalla sterilizzazione in autoclave
- Le RNasi non hanno bisogno di cofattori, resistono a trattamenti drastici (ebollizione prolungata, sterilizzazione in autoclave) e sono attive entro un ampio range di pH.

Manipolazione RNA: precauzioni

- **Molecola instabile**
 - presenza ossidrile libero in posizione 2' sul ribosio
 - idrolisi in soluzione acquosa alcalina
- **Particolarmente suscettibile azione RNasi**
- **RNasi estremamente attive**
 - non necessitano di alcun cofattore
 - molto resistenti alle alte temperature (autoclavaggio)
 - presenti ovunque (operatore, ambiente lavoro, soluzioni)



L'idrolisi alcalina dell'RNA è facilitata dalla presenza dell'ossidrile 2' del ribosio, che consente l'intermedio fosfodiesterico ciclico, impossibile nel caso del DNA.

Fonti di RNasi in laboratorio

- Tamponi e soluzioni di uso comune che se utilizzati senza opportune precauzioni, possono ospitare batteri o altri microrganismi che rilasciano i loro enzimi; autoclavarli **non inattiva le RNasi, anzi può introdurle nei reagenti, per es. liberandole dai corpi batterici contaminanti.**
- Lavorare senza guanti può introdurre nelle soluzioni RNasi batteriche e cellulari
- Batteri veicolati dall'aria possono sedimentare sulla superficie delle soluzioni, portando con sè RNasi
- Pipette che possono essere contaminate con RNasi ambientali

E' importante quindi :

- Dividere tutte le soluzioni per lavorare con RNA in aliquote
- Utilizzare plastica garantita RNasi-free
- Trattare la vetreria per almeno 4 ore a 200°C
- Indossare sempre guanti e cambiarli spesso
- Mantenere un'area di lavoro separata, dedicata all'RNA, con dotazione di pipette, puntali, provette, reagenti e tamponi esclusivi. Ciò è importante particolarmente, se nello stesso laboratorio si usa RNasiA per estrazione di DNA.

Come proteggere l'RNA dalla degradazione da parte delle RNasi

- **Potenti agenti denaturanti:**

- **Sali di guanidinio (guanidinio cloruro, guanidinio tiocianato)**

Il guanidinio cloruro è un elettrolita forte; le proteine si dissolvono in soluzioni concentrate (4M e non 2M) perdendo la loro struttura secondaria e attività biologica.

- **2-mercaptoetanololo**, un agente riducente in grado di rompere i ponti disolfuro delle proteine

- **Temperatura:** lavorare mantenendo le provette in ghiaccio è un modo di inibire le ribonucleasi

- **Sostanze deproteineizzanti: fenolo, cloroformio, SDS, proteinasi K**

Come proteggere l'RNA dalla degradazione da parte delle RNasi

RNase inhibitor: proteine di origine umana (placenta) o non umana (E. coli ricombinante), che si legano in modo non covalente alle RNasi e ne inibiscono così più del 90% dell'attività. Il legame è però reversibile e l'inibitore deve essere mantenuto attivo, evitando soluzioni contenenti agenti fortemente denaturanti, come SDS o urea, mantenendo un ambiente riducente (presenza di DTT) e la temperatura < 65°C.

DEPC (dietilpirocarbonato): un agente alchilante molto reattivo che reagisce con le proteine attaccando gli azoti imidazolici dei residui istidinici, determinando la perdita dell'attività enzimatica. Si usa alla concentrazione finale dello 0,1% per inattivare le RNasi contaminanti presenti nelle soluzioni.

Al termine del trattamento deve essere inattivato in autoclave (è idrolizzato in etanolo e CO₂).

Composti contenenti gruppi amminici primari, come il Tris reagiscono con il DEPC; di conseguenza, le soluzioni devono essere preparate sciogliendo il Tris in acqua DEPC già trattata ed autoclavata.

Manipolazione RNA: precauzioni

- **Inattivazione RNasi endogene**
(utilizzo inibitori, denaturanti)
 - Sali di vanadio complessati con ribonucleosidi: inibitore
 - Rnasina: inibitore specifico
 - Guanidina isotiocianato: agente denaturante
- **Prevenzione contaminazione RNasi endogene**
(ambiente RNasi-free)
 - Aree lavoro separate con materiali, soluzioni, pipette dedicate
 - Materiale plastico monouso RNasi-free
 - Vetreria:
 - temperatura > 180°C
 - trattamento con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1%
 - autoclavaggio
 - prodotti commerciali per decontaminazione
 - Soluzioni:
 - DEPC 1 mL/L e autoclavaggio
 - Soluzioni e Kit pronto uso

Estrazione e purificazione RNA

L'RNA deve essere estratto il più rapidamente possibile subito dopo la raccolta del campione

- **Lisi cellulare**

- In presenza di guanidina isotiocianato (agente caotropico) e β -mercaptoetanololo (agente riducente)

- **Purificazione**

- Trattamento con fenolo-cloroformio pH 5-6
- 3 fasi:- fase acquosa contenente RNA
 - interfaccia contenente proteine denaturate
 - fase organica contenente DNA e lipidi

- **Precipitazione**

- Con isopropanolo, lavaggi con etanolo 75%

- **Risospensione**

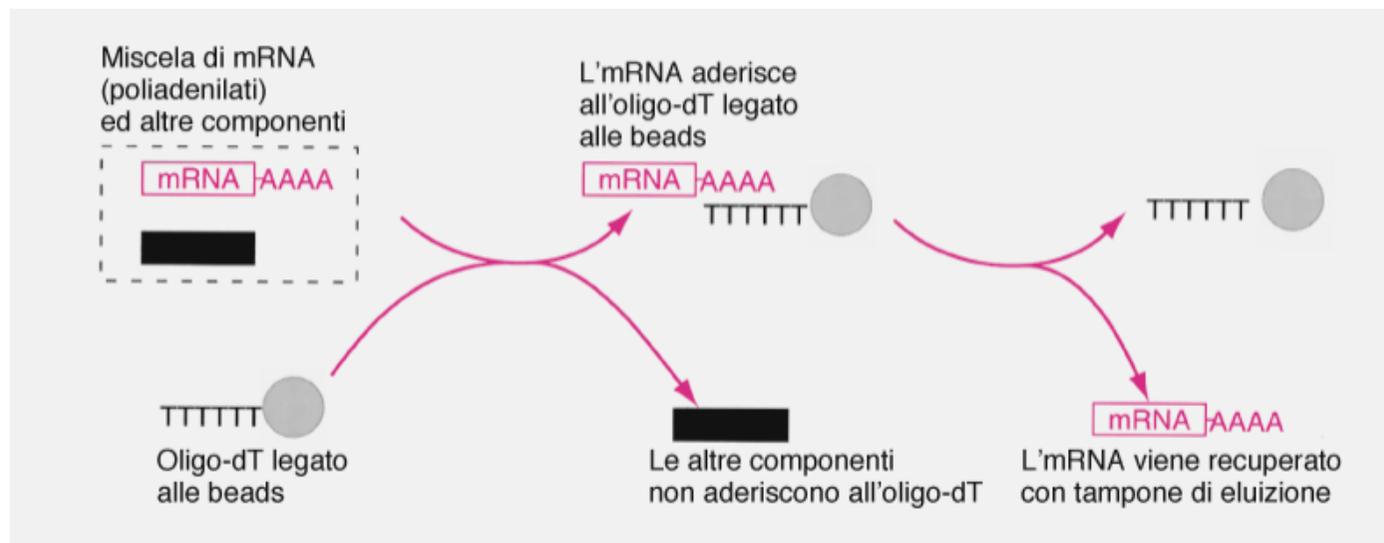
- Con H₂O o tampone a bassa forza ionica, conservare a -80°C

Isolamento dell'mRNA

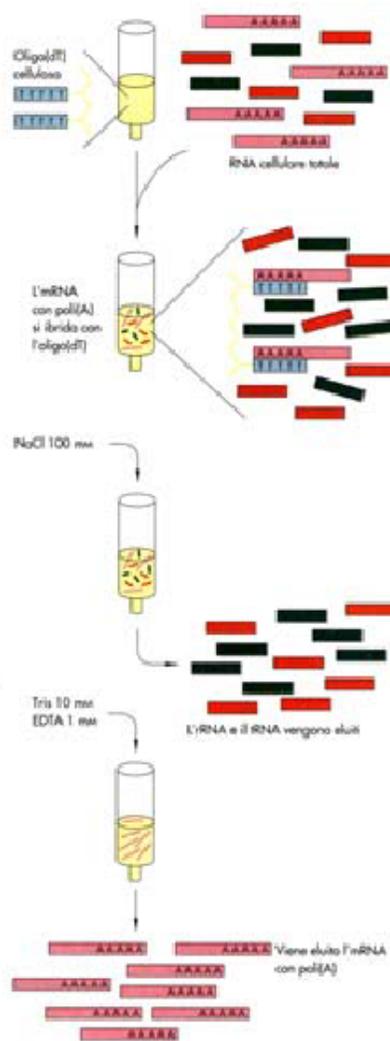
La maggior parte degli mRNA eucariotici presentano la coda di poliA all'estremità 3'.

L'mRNA poliadenilato può quindi ibridare con sequenze sintetiche di oligo (dT) (corti polimeri di desossitimidina), mentre le altre specie di RNA che non ibridano con l'oligo(dT) possono essere eliminate.

Questo metodo non è adatto per gli mRNA batterici, perché solo una piccola percentuale degli mRNA è poliadenilato con code di poliA piuttosto corte.



Isolamento dell' mRNA



Solo gli mRNA possiedono "code" di poli(A) lunghe 30-150 residui. Le sequenze di oligo(dT) sono immobilizzate su supporti solidi, in genere di cellulosa.

L'RNA totale viene denaturato e quindi applicato alla colonna in una soluzione salina concentrata (NaCl 500 mM).

Si effettuano molti lavaggi con una soluzione salina meno concentrata (NaCl 100 mM), per rendere più selettivo il legame tra RNA e l'oligo(dT).

Aggiungendo una soluzione di TE (Tris/EDTA) si recupera l'RNA messaggero legato alla colonna.

Eventualmente si ripete il ciclo applicazione-lavaggi-eluzione.

La frazione poli(A)+ RNA contiene sempre una minima parte di RNA non poliadenilato.

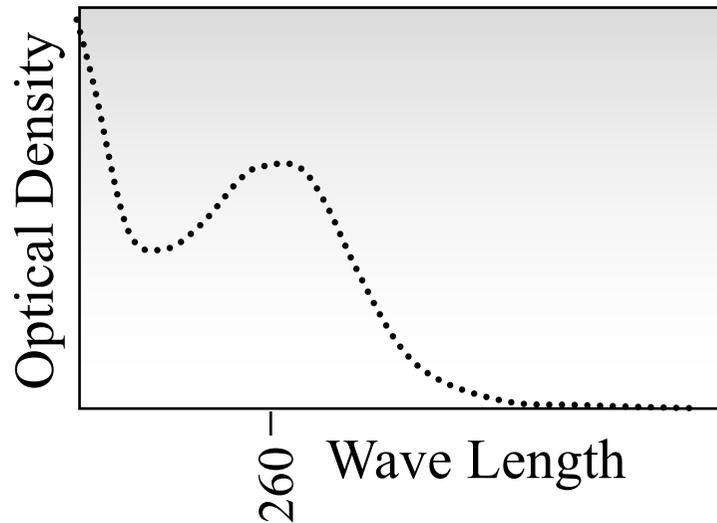
- La preparazione di RNA totale è fatta passare attraverso una colonna costituita da un polimero ricoperto con oligo(dT).
- Solo l'mRNA poliadenilato ibriderà con l'oligo(dT), mentre le altre specie verranno eliminate mediante lavaggi con tamponi a bassa concentrazione salina.
- L'eluato finale sarà costituito dalla miscela di tutte le specie di mRNA presenti nella cellula al momento dell'estrazione.

Analisi degli acidi nucleici

La qualità e la quantità del DNA o dell' RNA ottenuto possono essere determinati attraverso diversi metodi analitici

- ❖ Spettrofotometria UV (spettrofluorimetria)
- ❖ Elettroforesi su gel di agarosio

Using Spectroscopy to analyze DNA



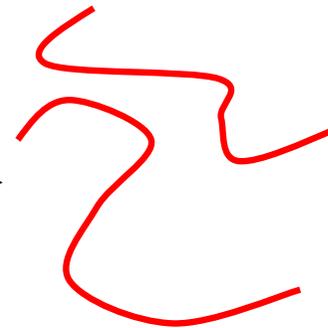
This absorption is useful because it varies with the structure of DNA (&RNA)

i.e. extinction coefficient depends on the structure



dsDNA

Low extinction coefficient

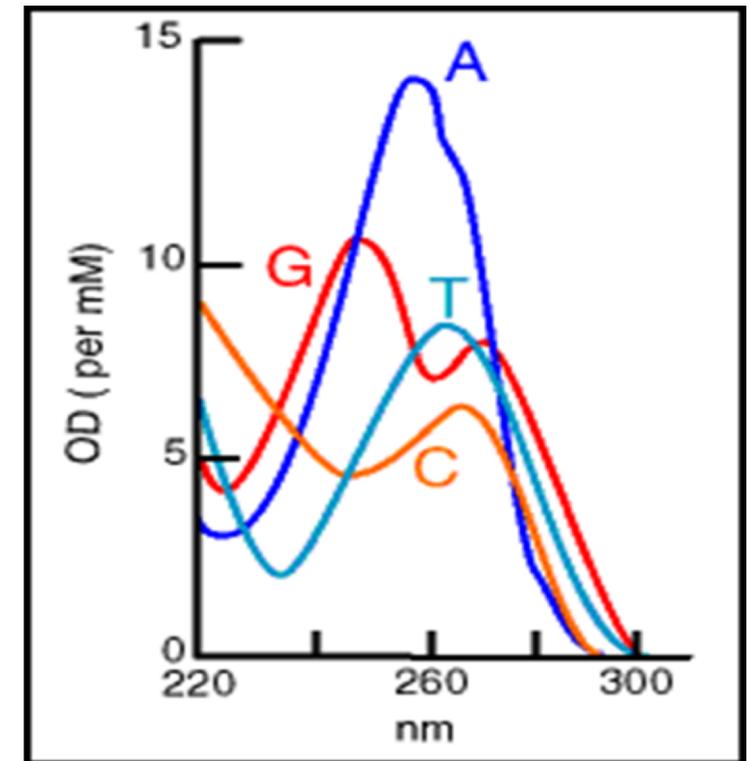


ssDNA

Higher extinction coefficient

Nucleic acids

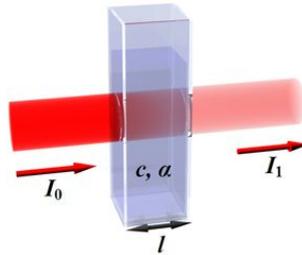
- The rings of the bases (A, C, G, T, U) are made up of alternating single and double bonds.
- Such ring structures absorb in the U.V.
- Each of the four nucleotide bases has a slightly different absorption spectrum, and the spectrum of DNA is the average of them.



Determination of Concentration by Spectroscopic Methods

- Beer's Law

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = A = \epsilon l c$$



- I_0 = Intensity of incident light
- I = Intensity of transmitted light
- ϵ = molar extinction coefficient
- l = path length of cell
- c = concentration of sample

Beer's Law

The Beer-Lambert Law (λ specific):

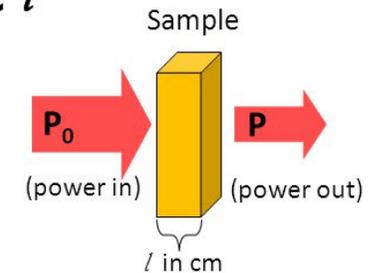
$$A = \epsilon c l$$

A = absorbance (unitless, $A = \log_{10} P_0/P$)

ϵ = molar absorptivity ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = path length of the sample (cm)

c = concentration (mol/L or M)



Concentration	↑	Absorbance	↑
Path length	↑	Absorbance	↑
Molar Abs.	↑	Absorbance	↑

Valutazione quantitativa acidi nucleici estratti

- **Concentrazione**

- Diluizione in tampone
- Assorbanza 260 nm
- DNA, RNA $\mu\text{g/mL} = A_{260} \times \text{f.dil} \times 50/40/33$

dsDNA: 1.0 A = 50 $\mu\text{g/mL}$
ssDNA: 1.0 A = 33 $\mu\text{g/mL}$
RNA: 1.0 A = 40 $\mu\text{g/mL}$
oligo: 1.0 A = 33 $\mu\text{g/mL}$

- **Purezza (contaminazione da proteine)**

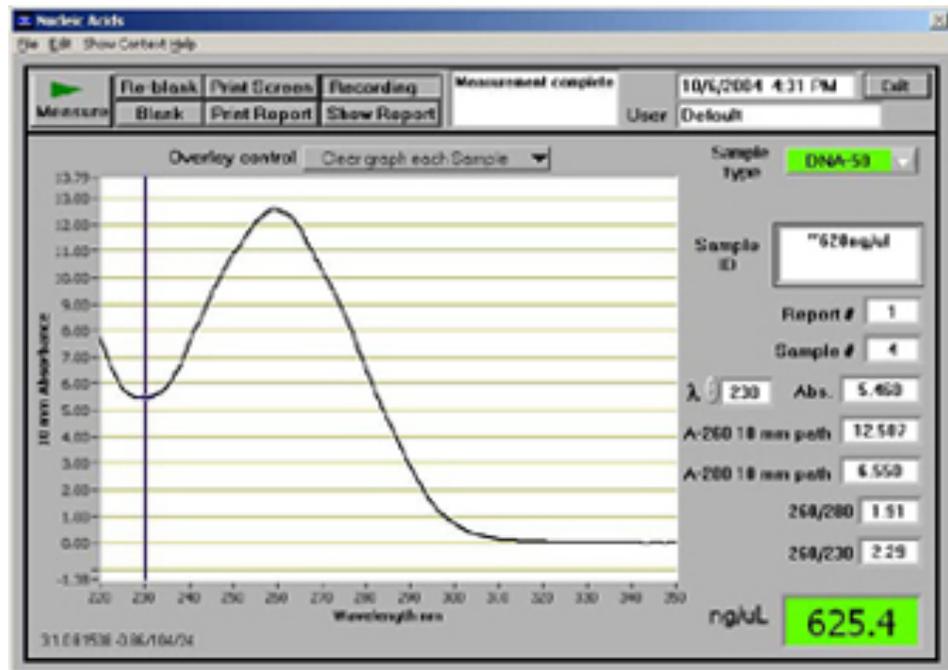
- Rapporto A_{260}/A_{280}

rapporto A_{260}/A_{280} = indice della contaminazione da proteine

Per in DNA il rapporto deve essere 1.6-1.8 mentre per l'RNA 1.8-2.0, rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine.

rapporto A_{260}/A_{230} = indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi)

il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi



L'RNA ha il suo max di assorbimento a 260 nm e la sua assorbanza non è influenzata dal valore di pH della soluzione.

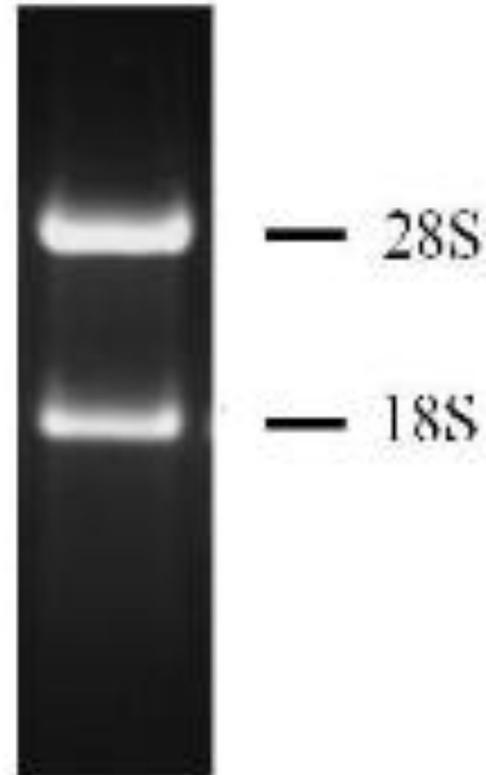
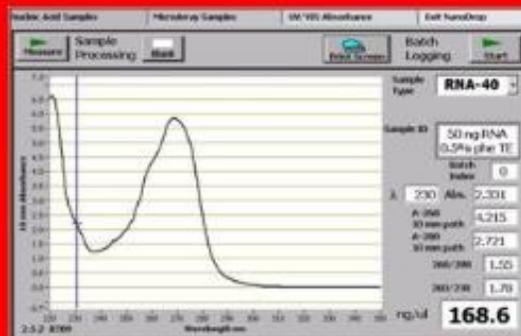
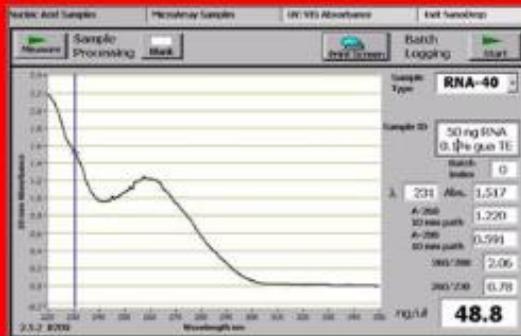
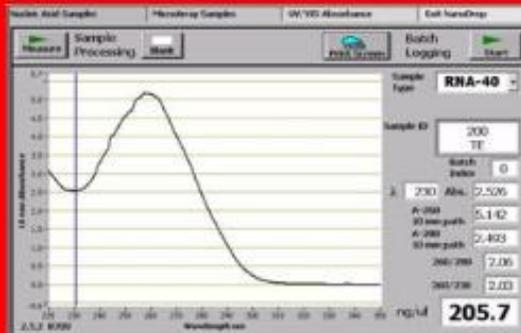
Al contrario, l'assorbanza di contaminanti presenti nella soluzione può dipendere dal valore di pH. Questo significa che la determinazione del grado di purezza dell'RNA (260/280) può essere imprecisa.

Ad esempio l'assorbanza delle proteine cambia a pH acidi, ma non a quelli alcalini.

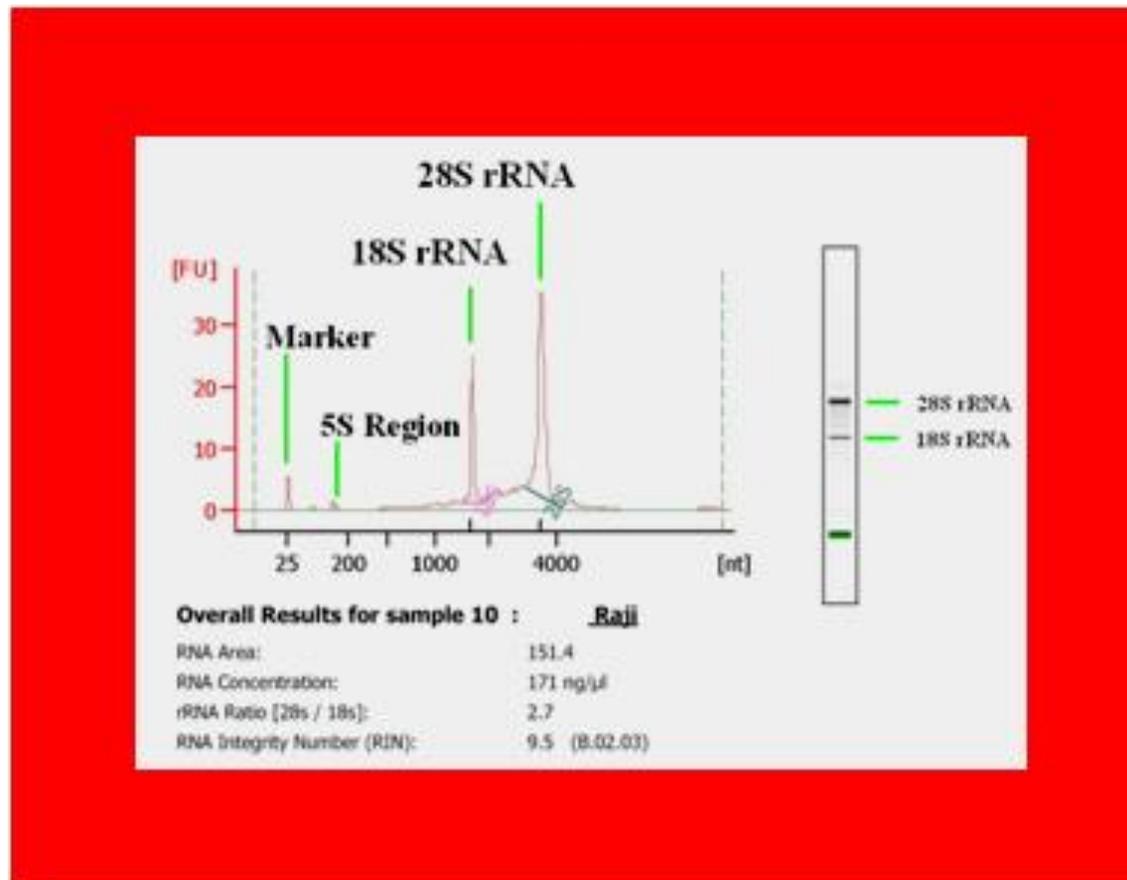
Pertanto la valutazione della qualità dell'RNA va fatta in tamponi a pH basico (TE, pH8.0)

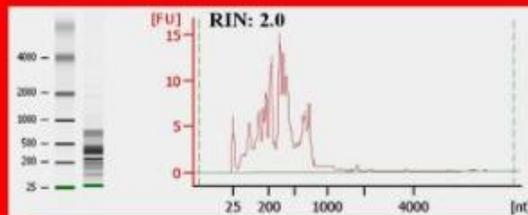
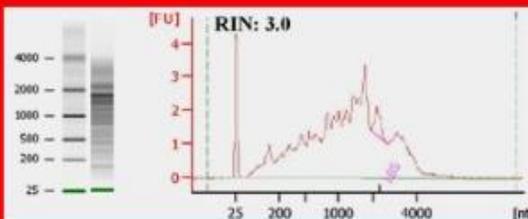
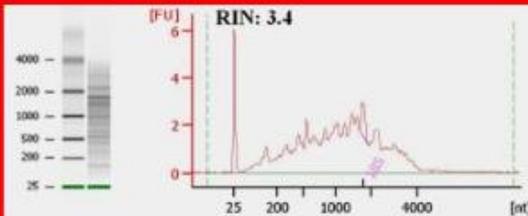
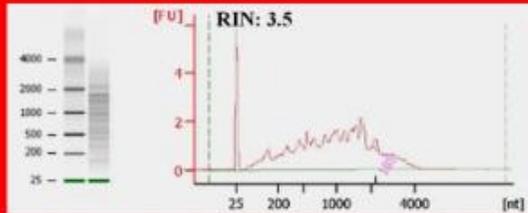
Allo spettrofotometro si possono misurare anche contaminanti che assorbono nel range 220-230 nm (proteine, sali caotropici e fenolo).

Per un RNA di buona qualità $260/280 = 2.0$ e $260/230 = 2.0$



Bioanalyzer electropherogram of total RNA





Valutare la qualità dell'RNA con un algoritmo

Nel caso di analisi di RNA, lo strumento fornisce il R.I.N. (RNA Integrity Number) che attribuisce al campione esaminato un indice qualitativo che va da 10 (RNA di ottima qualità) a 0 (RNA completamente degradato).

Qubit

La quantizzazione fluorometrica Invitrogen Qubit comprende il Fluorometro Invitrogen Qubit 4 di facile utilizzo e saggi di quantificazione Invitrogen Qubit sensibili e specifici per misurare la qualità e quantità di RNA, quantità di RNA, ssDNA, dsDNA e proteine per applicazioni che richiedono misurazioni sensibili, specifiche e accurate.

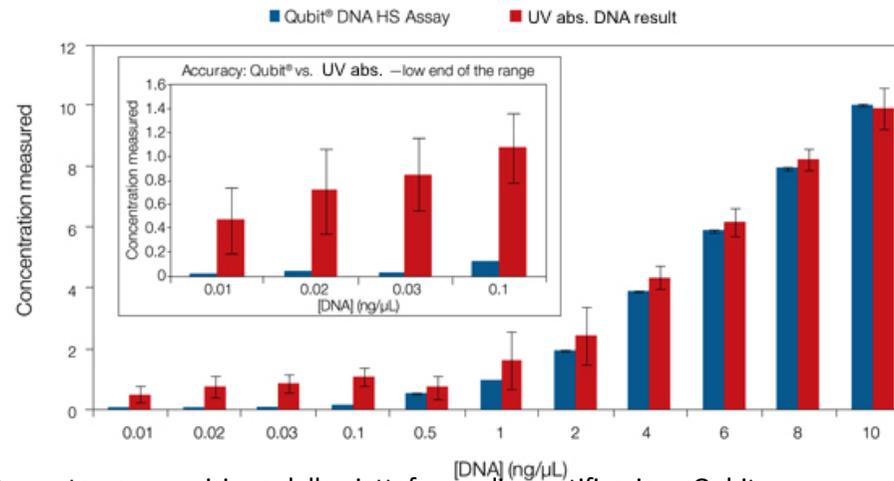
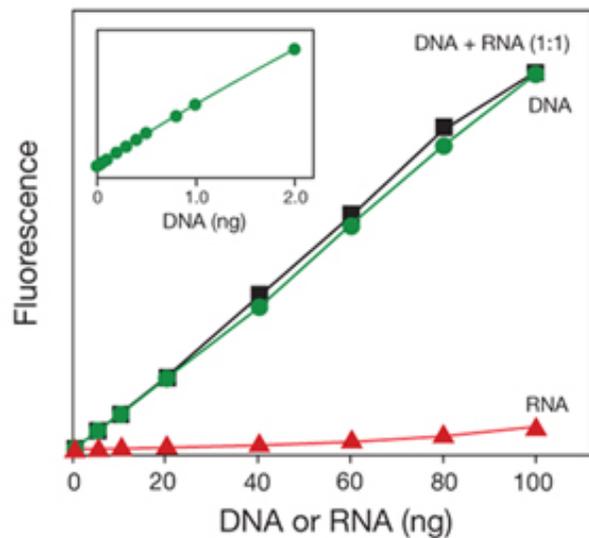
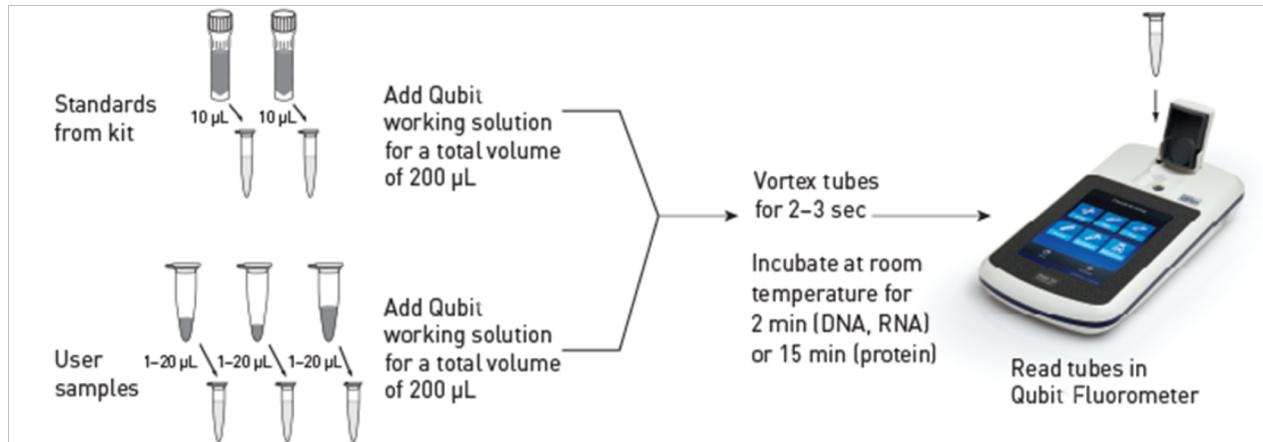
Basato sul rilevamento della fluorescenza «target-specific», questo sistema integrato è più sensibile della quantificazione basata sull'assorbanza UV, rendendolo ideale per campioni preziosi e applicazioni esigenti.



Le caratteristiche principali del Fluorimetro Qubit 4 includono:

- Quantificazione rapida e altamente accurata di DNA, RNA e proteine in meno di tre secondi per campione
- Misura l'RNA intatto in meno di 5 secondi per campione
- Elevati livelli di precisione utilizzando solo 1-20 μ l di campione, anche con campioni molto diluiti
- Il calcolatore di reagenti di bordo genera rapidamente le istruzioni per la preparazione della soluzione di lavoro Qubit
- Memorizza risultati da un massimo di 1000 campioni
- Ampio touch screen a colori da 5,7 pollici, all'avanguardia per una facile navigazione del flusso di lavoro
- Il display grafico indica quando i campioni sono nella gamma estesa o fuori gamma
- L'ingombro ridotto consente di risparmiare spazio sulla panca
- Esporta i dati su un'unità USB o direttamente sul computer tramite un cavo USB
- Possibilità di personalizzare il tuo fluorometro Qubit con i dosaggi che esegui di più, aggiungere nuovi test o persino creare i tuoi test con il software MyQubit e lo strumento web
- Lingua a scelta tra cui inglese, francese, spagnolo, italiano, tedesco, cinese semplificato e giapponese

Qubit



Il dosaggio Invitrogen Qubit dsDNA HS ha un intervallo di rilevamento lineare di 0,2-100 ng ed è selettivo per dsDNA, anche in presenza di una massa uguale di RNA.

Accuratezza e precisione della piattaforma di quantificazione Qubit.

Dieci replicati di DNA lambda a concentrazioni da 0,01 a 10 ng / µL sono stati saggiati utilizzando il test Qubit dsDNA HS sul Fluorometro Qubit secondo il protocollo del kit standard. Le stesse concentrazioni di DNA sono state misurate in 10 replicati utilizzando uno spettrofotometro a microvolumi, ei risultati sono stati confrontati sia per precisione che per precisione. Ogni barra rappresenta la media di 10 repliche. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard dei 10 replicati. Le concentrazioni indicate sono le concentrazioni di DNA nei campioni iniziali, prima della diluizione nelle provette di saggio Qubit.

Bioanalyzer 2100

1. Fast and easy operation

Add sample



- Ready-to-use reagent kits
- Quick-start instructions
- Chip preparation in less than five minutes
- Minimal use of hazardous chemicals and waste disposal
- Sample volumes in the μL range

2. Automation

Start chip run



- Start analysis by simply pressing a single button
- Predefined methods
- System uses internal standards to calculate results
- Unattended analysis of up to 12 samples

3. Digital data in 30 minutes

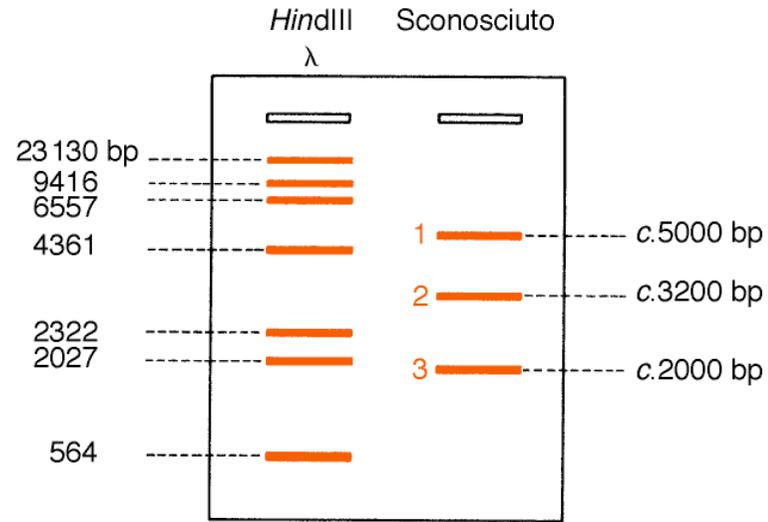
Watch real-time data display



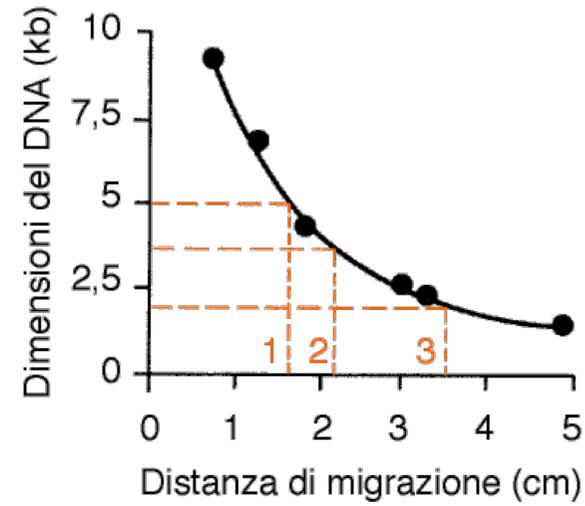
- Automated data analysis
- Digital data can be shared with other applications or programs
- No user-dependent data interpretation
- RIN algorithm for RNA QC applications

	NanoDrop 2000™	Qubit 2.0® fluorometer	Bioanalyzer 2100®
Quantification method	UV absorbance measurements	Fluorescence-based dye that binds specifically to DNA, RNA or protein	Fluorescence-based dye that binds specifically to DNA, RNA or protein
Specificity for DNA or RNA	Non-discriminatory – cannot distinguish between nucleic acid species	Accurately quantifies DNA and RNA independently. Accurately quantifies dsDNA in the presence of ssDNA	Accurately quantifies DNA and RNA independently
Accuracy at low concentrations	Significantly overestimates concentration	Sufficiently sensitive to accurately quantify 10 pg/μl	Sufficiently sensitive to accurately quantify 5 pg/μl
Sensitivity and range	2-15,000 ng/μl	Effective sample concentration range of 1-500 ng/ml	Listed as 5-500 pg/μl but up to 5 ng/μl for fragmented DNA
Additional data generated	Purity indication from 260:280 nm ratio	None	Qualitative information about fragment sizes and concentration within a specific size range
Standard curve	Not required. Beer-Lambert equation used	Single-point standard curve	Ladder and upper and lower markers included in each run
Unit	Requires PC with software	Standalone	Requires PC with software
Footprint/weight	14 cm x 20 cm / 2.1 kg	13 cm x 21 cm / 0.3 kg	16 cm x 41 cm / 10 kg

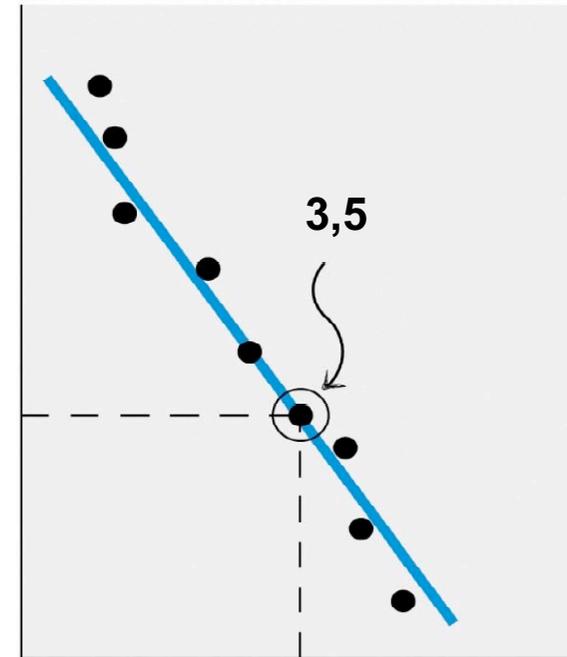
(a) Stima approssimativa a occhio



(b) Stima grafica accurata

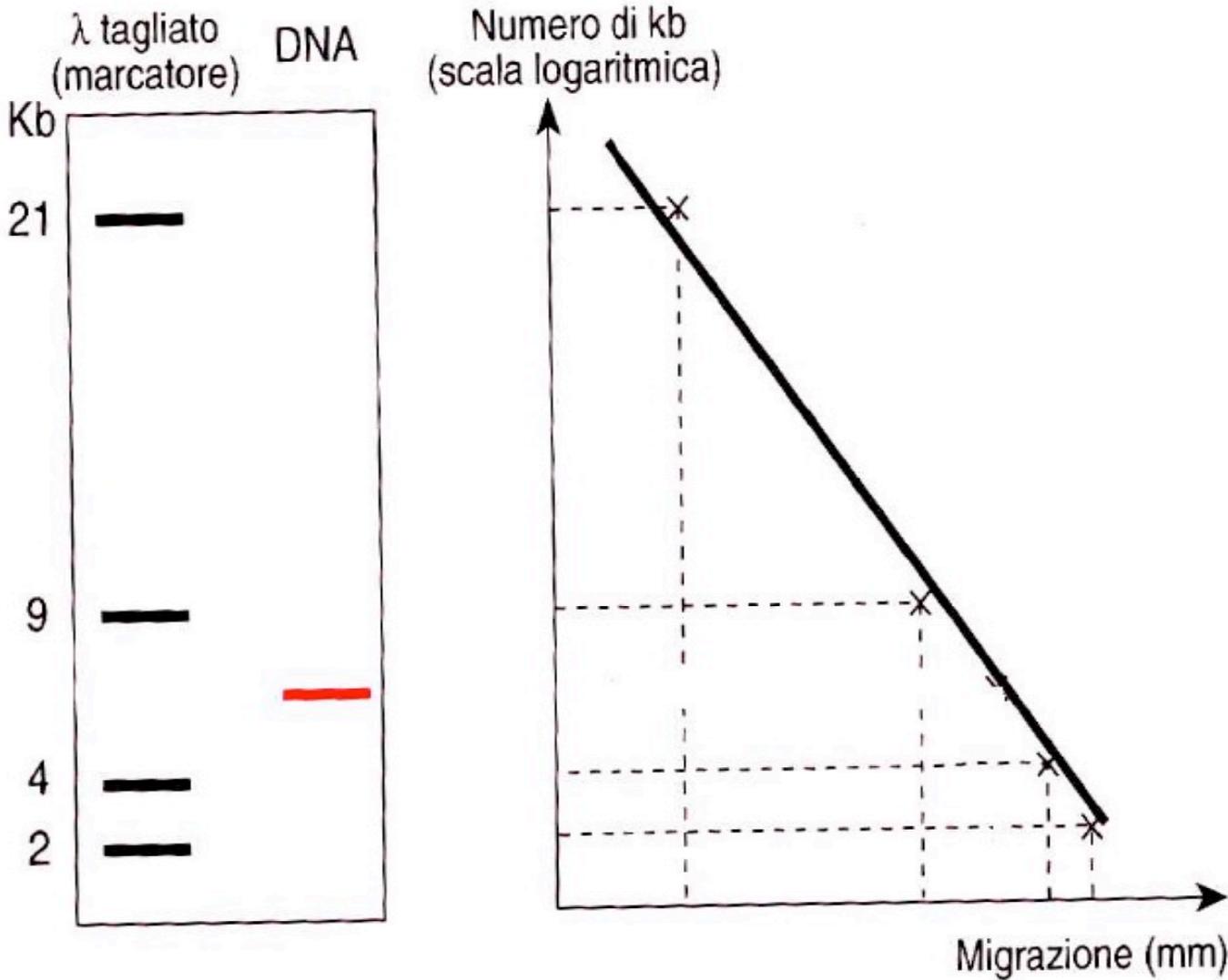


$\log M_r$



Relative migration

La mobilità elettroforetica è inversamente proporzionale al log del peso molecolare.



**GeneRuler™
100bp DNA Ladder Plus**

Fragment Sizes

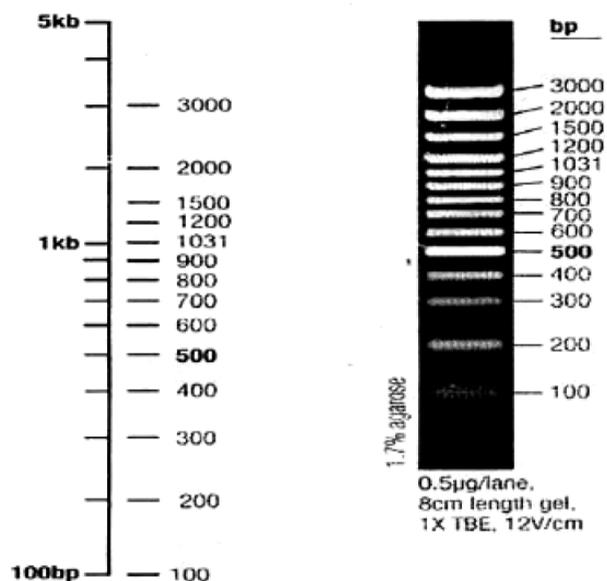


Table. The percent and ng quantities of DNA fragments in 1µg of GeneRuler™ 100bp DNA Ladder on agarose gel.

	Fragment, bp	%	DNA quantity in band, (ng)
1	1031	16.9	169
2	900	14.7	147
3	800	13.1	131
4	700	11.5	115
5	600	9.8	98
6	500	16.4	164
7	400	6.5	65
8	300	4.9	49
9	200	3.3	33
10	100	1.6	16
11	80	1.3	13
	TOTAL:	100.0	1000

Conservazione degli acidi nucleici

Il DNA estratto e purificato è in genere risospeso in H₂O distillata sterile ultrapura o in soluzioni a bassa concentrazione salina a pH 7.4.

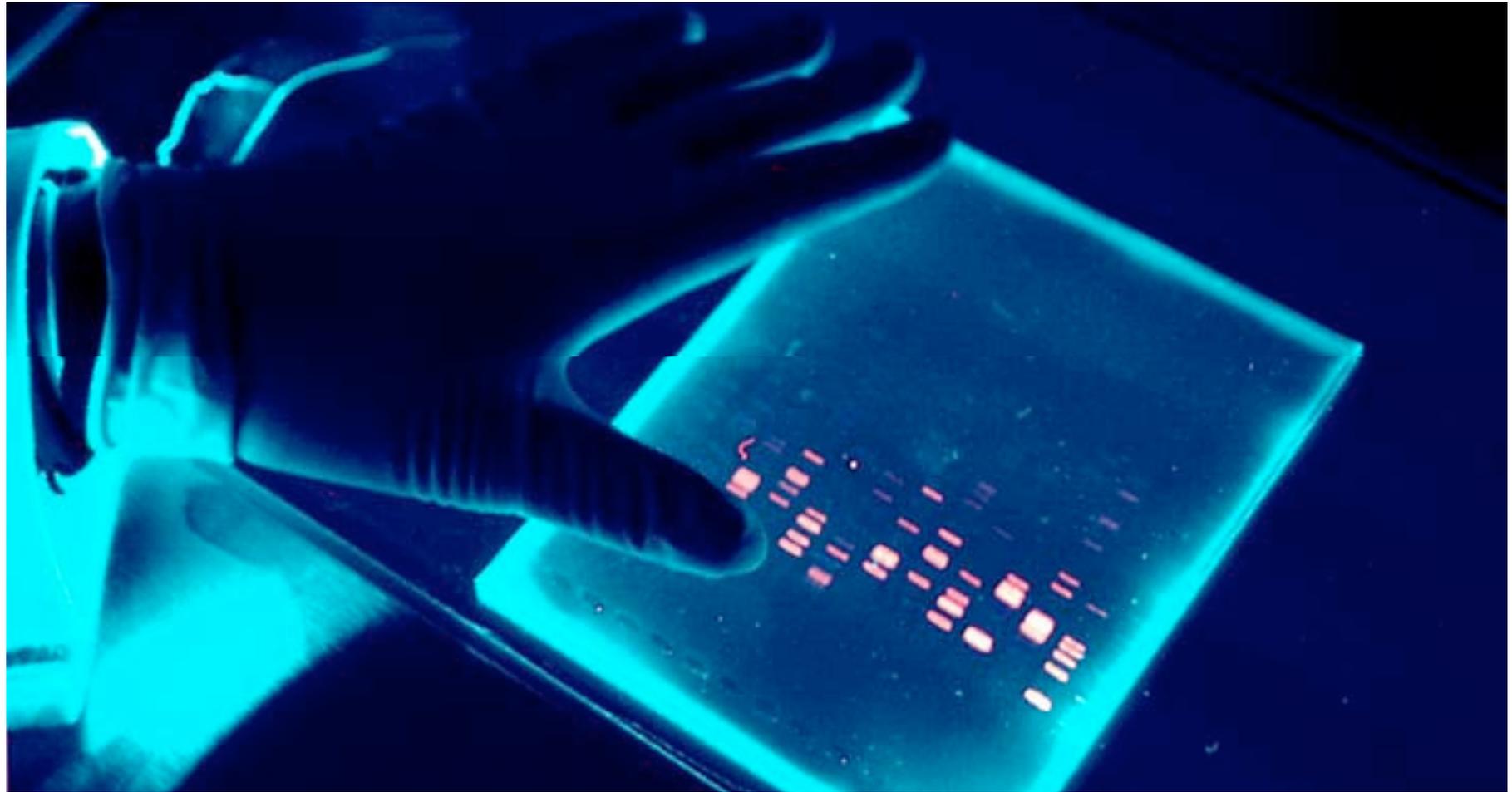
+4°C: stabile per alcune settimane

-20°C: stabile più a lungo

(evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento che possono danneggiare il DNA)

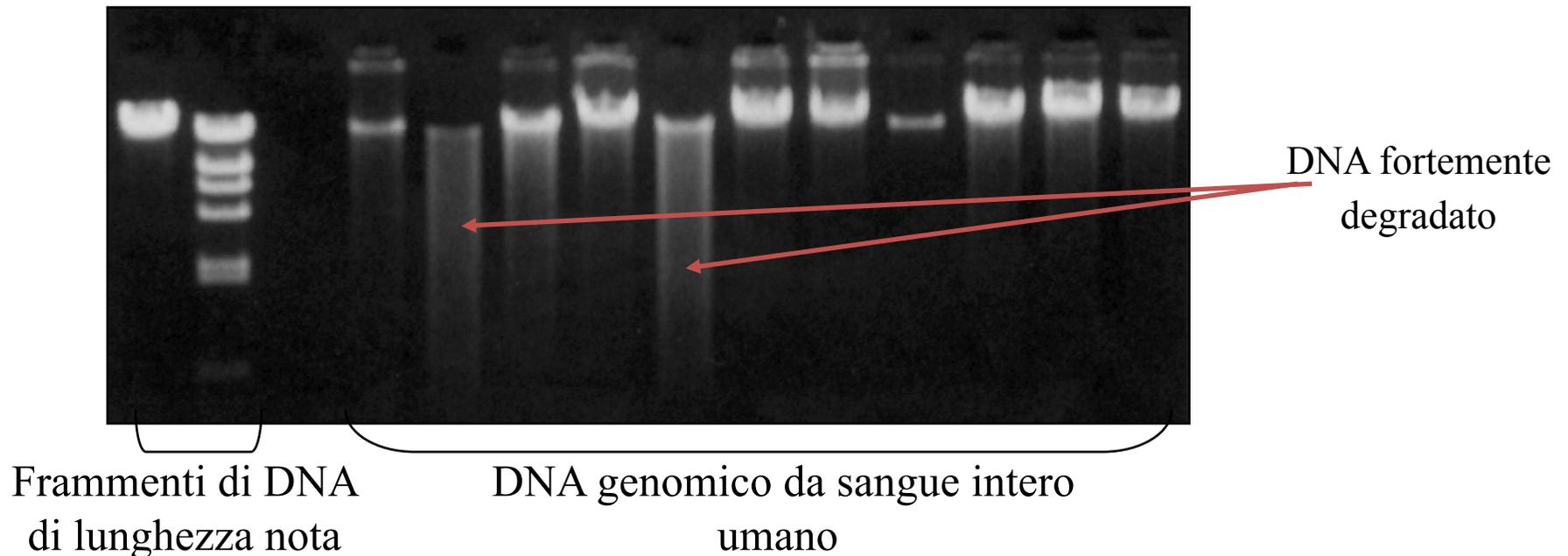
-80°C: stabile per molti anni

• RNA sempre a -80°C

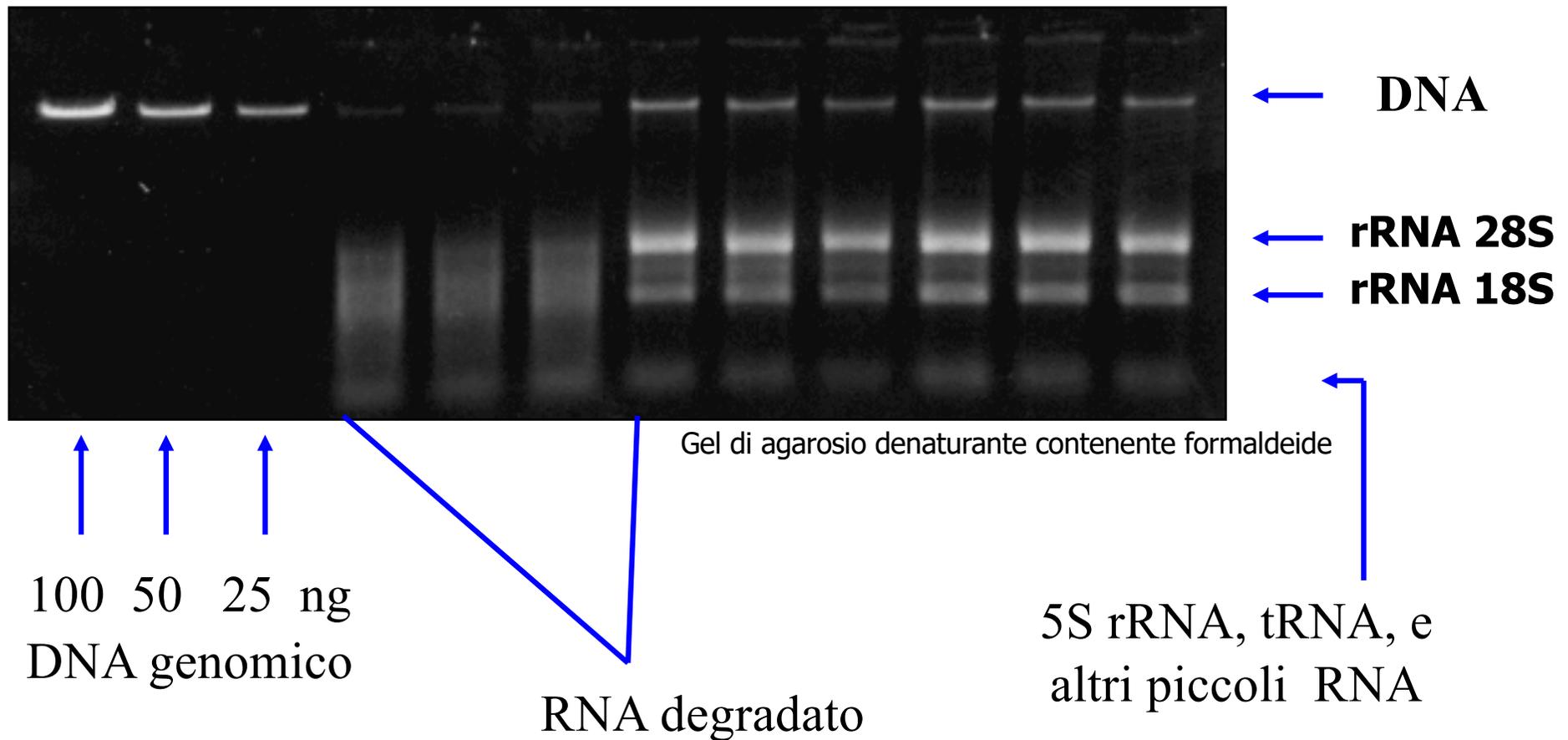


Analisi di DNA mediante elettroforesi su gel di agarosio

Gel di agarosio, le bande di DNA sono state messe in evidenza introducendo nel gel **etidio bromuro** una sostanza che si inserisce tra le basi del DNA diventando fluorescente.



Analisi di RNA mediante elettroforesi su gel di agarosio



Attenzione: Se si è purificato mRNA, esso appare come una scia