



Tecnologia del DNA e la genomica

DNA ricombinante

- La tecnologia del DNA ricombinante permette di unire in laboratorio il DNA di organismi diversi
- Permette di manipolare il DNA di un organismo allo scopo di produrre nuovi geni con nuove caratteristiche
- Sono numerose le applicazioni pratiche della tecnologia del DNA ricombinante

Tecnologie del DNA

- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Generazione del DNA ricombinante
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Formazione del cDNA
- PCR
- Elettroforesi su gel
- Souther Blotting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray

Taglio del DNA con enzimi di restrizione

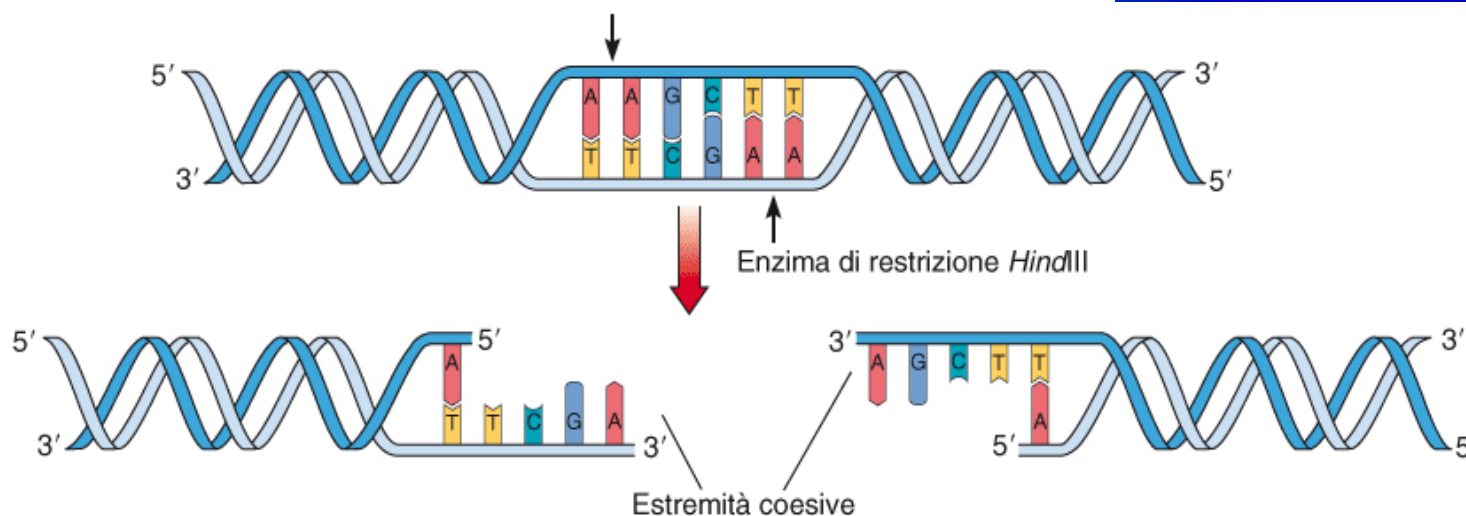


FIGURA 15-1 Taglio del DNA con un enzima di restrizione

Molti enzimi di restrizione, come *HindIII*, tagliano il DNA a livello di sequenze di basi palindromiche, producendo due estremità complementari, dette "sticky ends" o "estremità coesive". Le frecce nere indicano i siti di taglio dell'enzima.

1 *EcoRi* taglia i due filamenti di un DNA in due punti diversi, a livello di una sequenza di riconoscimento palindroma.

DNA

5' **CGATCCAGGAATTCATCCAGCC** 3'
3' **GCTAGGTCCTTAAGTAGGTCGG** 5'

EcoRi taglia a livello delle due frecce rosse

AGGCTCTAGAATTCCTTAGCT
TCCGAGATCTTAAGAAGATCGA

CGATCCAGG **AATTCATCCAGCC**
GCTAGGTCCTTAA **GTAGGTCGG**

AGGCTCTAG **AATTCCTTAGCT**
TCCGAGATCTTAA **GAAGATCGA**

CGATCCAGGAATTCCTTAGCT
GCTAGGTCCTTAAGAAGATCGA

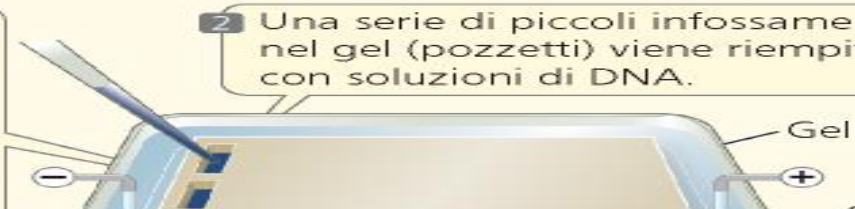
3 Le estremità adesive possono unirsi mediante legami idrogeno con estremità adesive complementari derivanti da altri DNA; il **DNA ricombinante** che ne risulta può essere saldato dall'azione della DNA ligasi.

2 I due frammenti separati del DNA portano appendici di basi non appaiate, che costituiscono "estremità adesive".

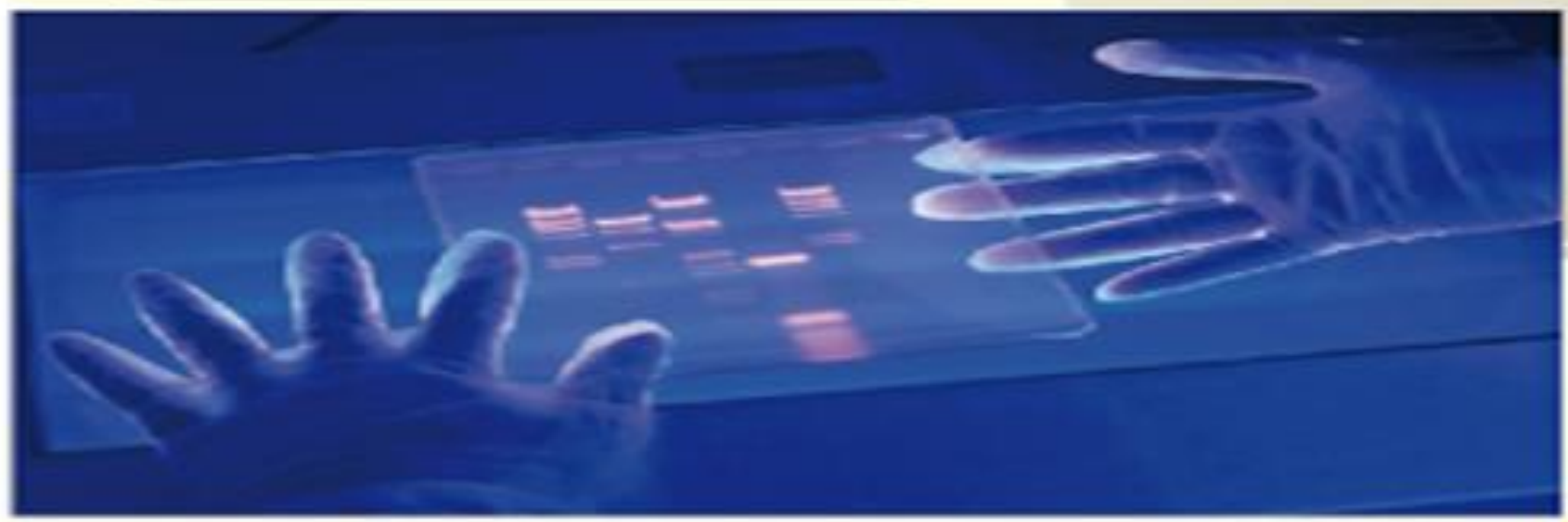
Digestione con
enzimi di
Restrizione

1 In una vaschetta per elettroforesi, nello spazio compreso fra due elettrodi si prepara un gel di agarosio

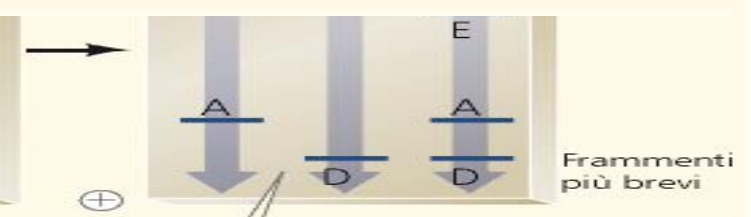
2 Una serie di piccoli infossamenti nel gel (pozzetti) viene riempita con soluzioni di DNA.



del gel.



in un diverso
pozzetto
del gel.



7 Nel migrare verso l'elettrodo positivo, i frammenti di DNA più brevi si muovono più velocemente (quindi arrivano più lontano) di quelli più lunghi.



Generazione del DNA ricombinante

Perché si usa?

Un plasmide trasporta DNA estraneo in una cellula ospite batterica, dove sono fatte molte copie del gene di interesse, quando la cellula batterica divide. Queste copie vengono utilizzate in molti tipi di ricerca, per esempio, per ottenere il prodotto genico codificato dal DNA estraneo.

Come funziona?

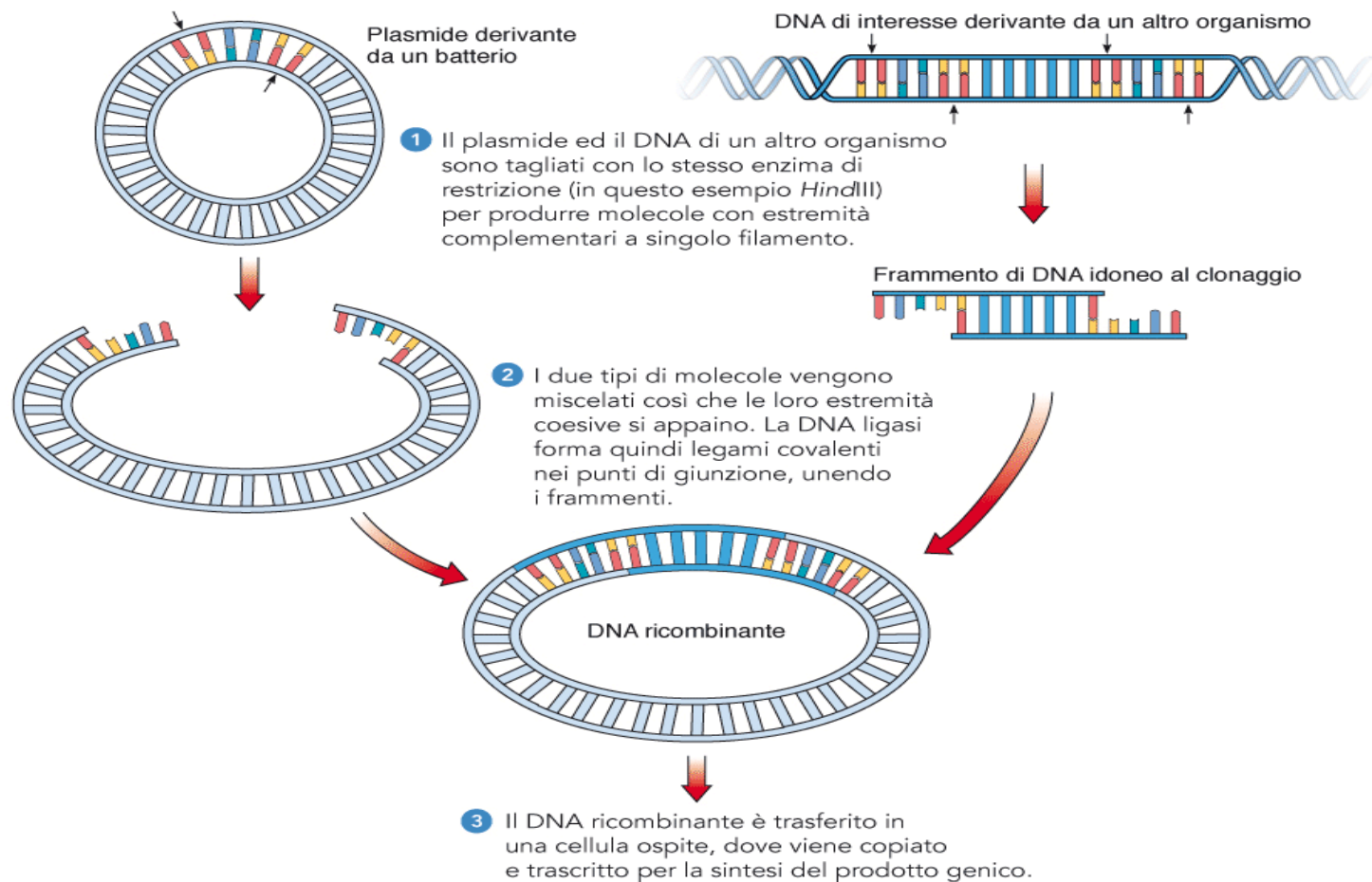
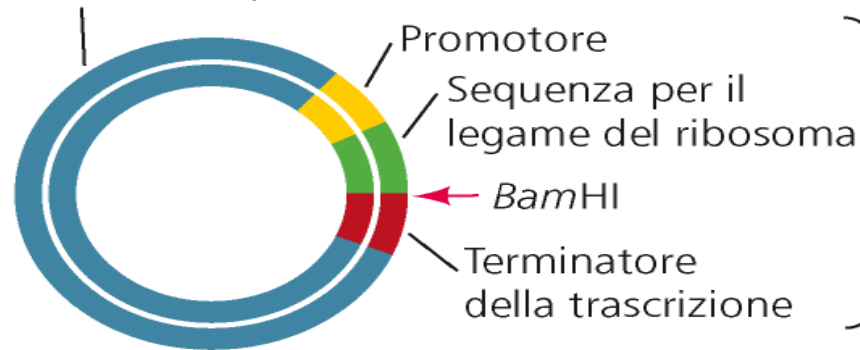


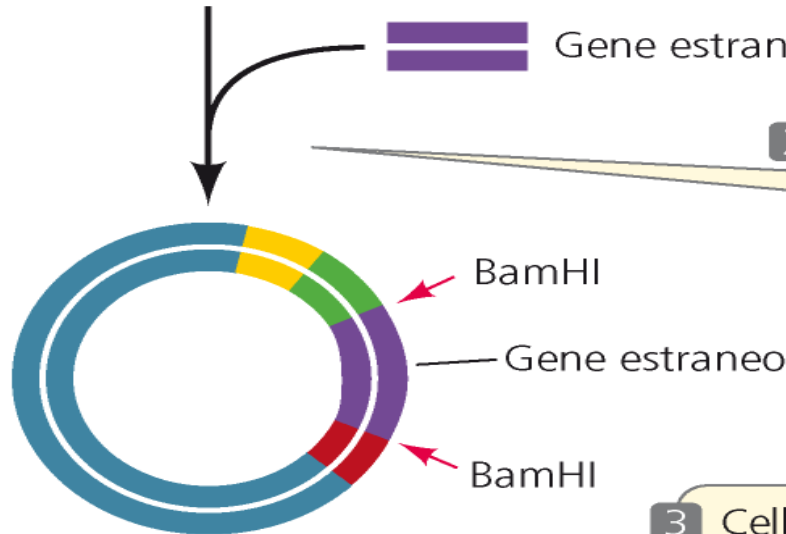
FIGURA 15-2 Inserimento di DNA estraneo (gene di interesse) in un vettore di clonaggio (in questo esempio, un plasmide batterico) per generare DNA ricombinante

Vettore di espressione



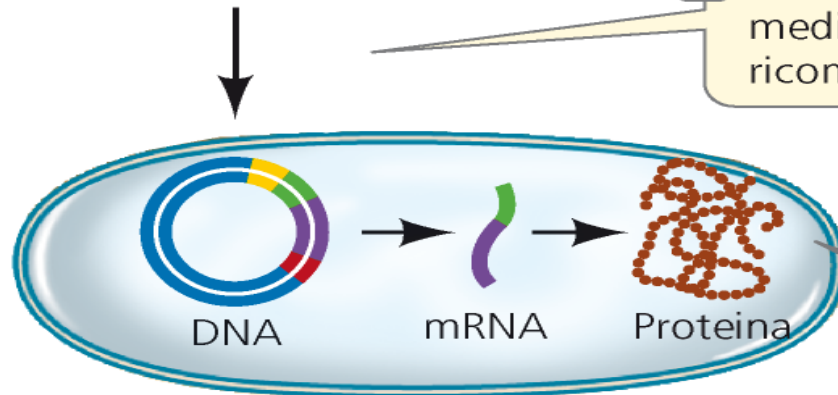
1 Un vettore di espressione comprende anche le sequenze appropriate per ottenere la trascrizione e la traduzione entro la cellula ospite.

Gene estraneo



2 Un gene estraneo è inserito a livello di un sito di restrizione.

3 Cellule di *E. coli* vengono trasformate mediante un vettore di espressione ricombinante.



4 Il gene estraneo viene espresso in *E. coli* grazie alla presenza del vettore di espressione.

Il primo farmaco da biotecnologie è stato l'insulina umana ricombinante.
La principale attività dell'insulina è la regolazione del metabolismo glucidico.

Nel batterio *Escherichia coli* è stato introdotto un gene codificante per l'insulina, isolato a partire da cellule umane. Dopo questa manipolazione, il batterio ricombinante produce un'insulina assolutamente identica a quella secreta dalle cellule del pancreas umano.

Categoria farmacoterapeutica:

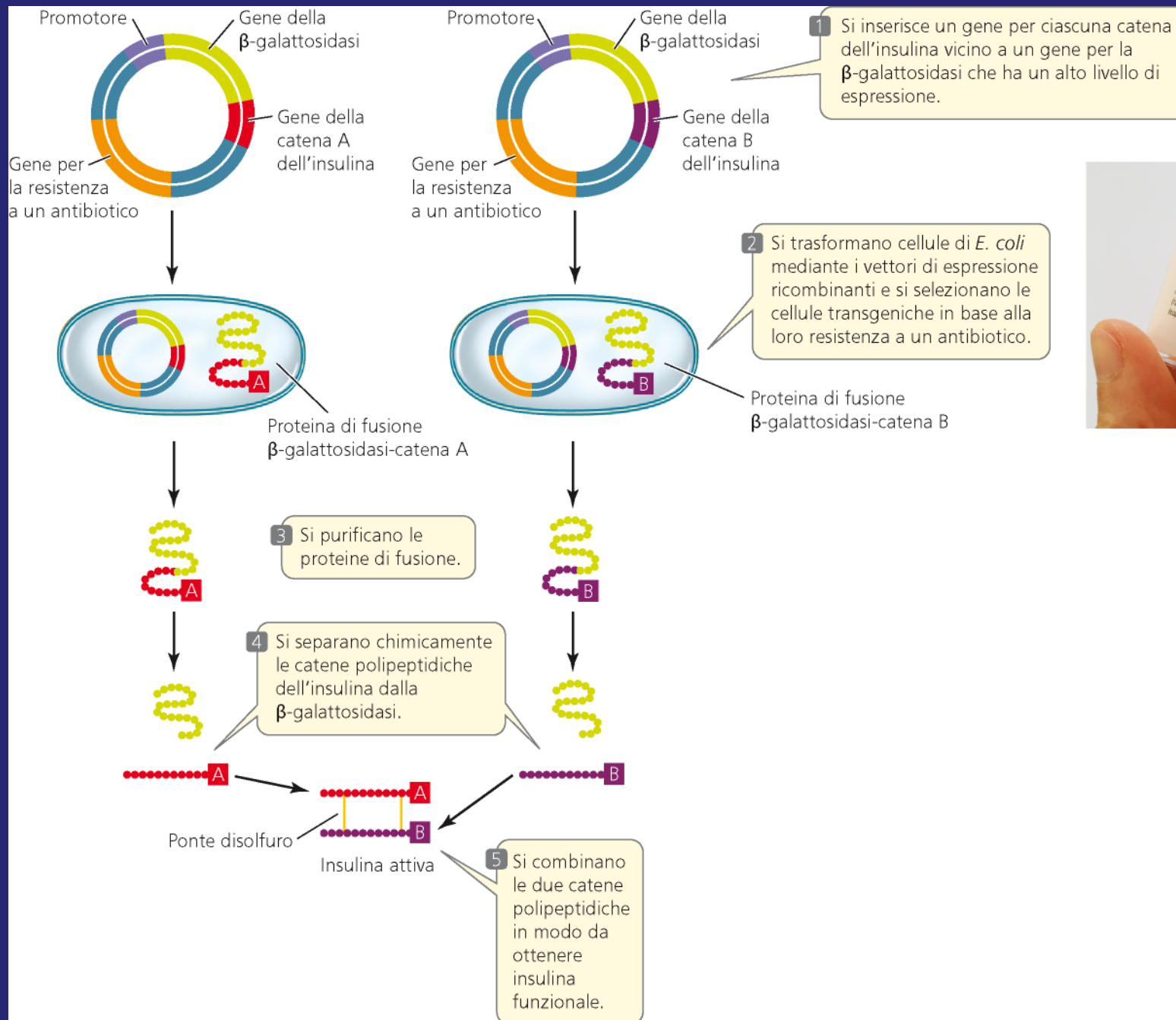
Humulin R (Regolare) A10A B01

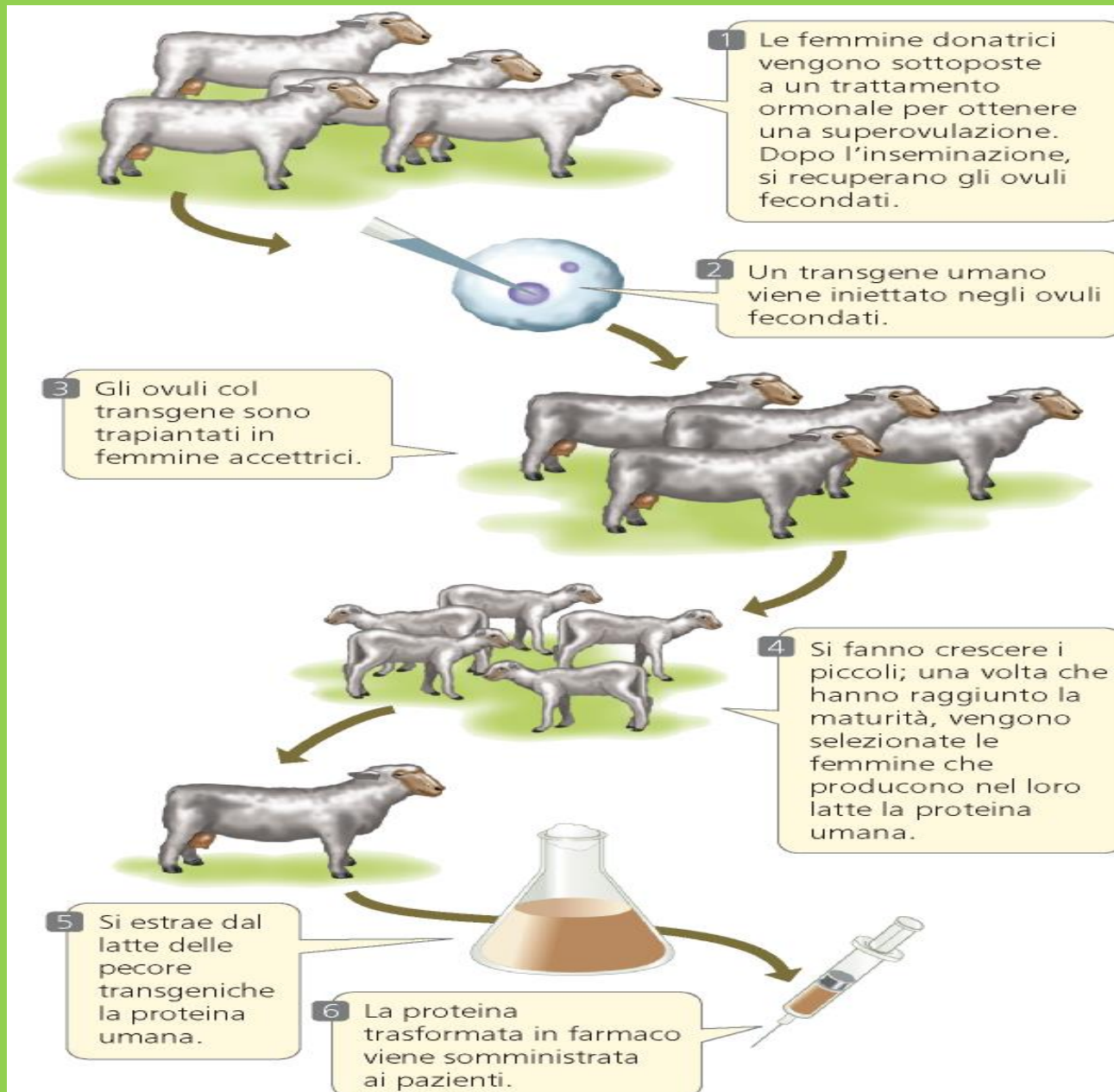
Humulin I (Isofano) A10A C01

Humulin 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (Miscele) A10A D01

Humulin L (Lenta) A10A E01

Humulin U (Ultralenta) A10A E01







Queste piante transgeniche crescono bene in acqua salata.



Le piante normali nell'acqua salata appassiscono.

Costruzione di libreria genomica



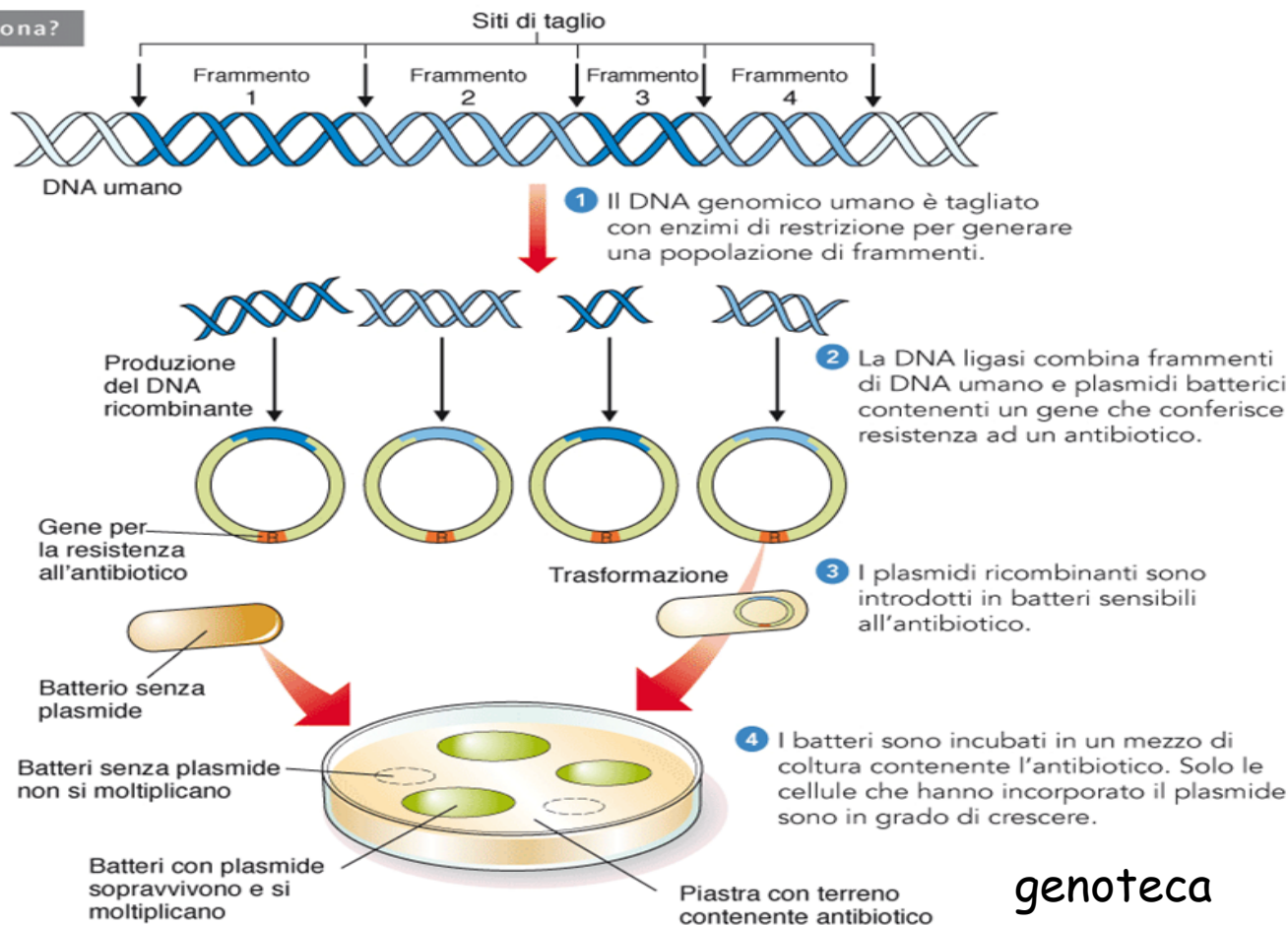
Costruzione libreria genomica

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Una libreria genomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA del genoma di un organismo; una libreria cromosomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA di un cromosoma specifico. Ciascun frammento di DNA viene "conservato" in un clone di cellule batteriche ricombinanti. Gli scienziati usano librerie genomiche e cromosomiche per isolare e studiare geni.

Come funziona?



genoteca

FIGURA 15-4 Costruzione di una libreria genomica o di una cromosomica

A

DNA genomico

Per genoteca di DNA

B

mRNA

Per genoteca di mRNA

1a Il DNA genomico viene tagliato in piccoli frammenti.

1b Gli RNA messaggeri sono copiati in cDNA mediante la trascrittasi inversa.

cDNA

Plasmidi

2 Un vettore plasmidico si unisce a un frammento, formando un DNA ricombinante.

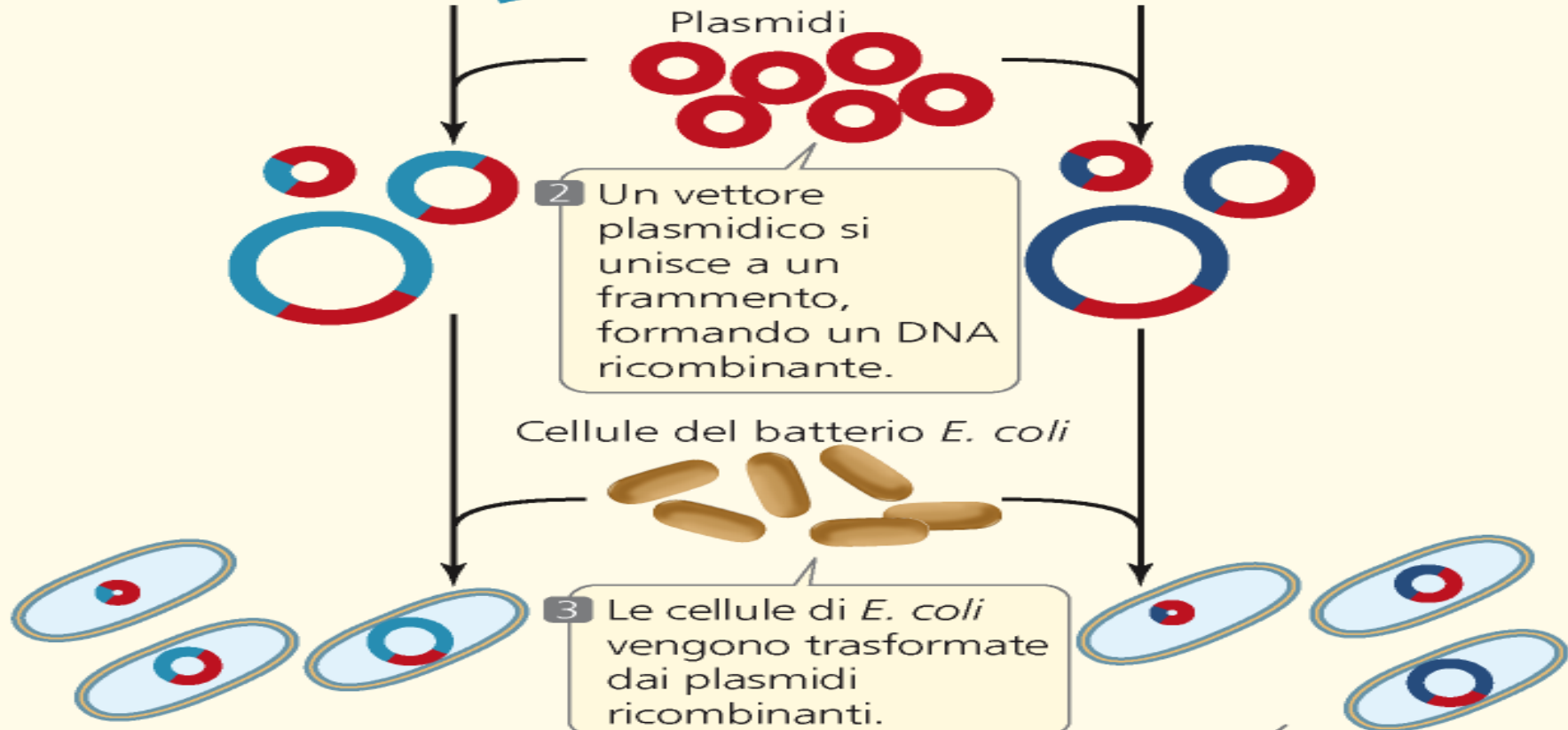
Cellule del batterio *E. coli*

3 Le cellule di *E. coli* vengono trasformate dai plasmidi ricombinanti.

4 Ogni colonia della genoteca contiene un frammento del DNA genomico originale, o un cDNA derivato da un mRNA.

Genoteca

Genoteca di cDNA



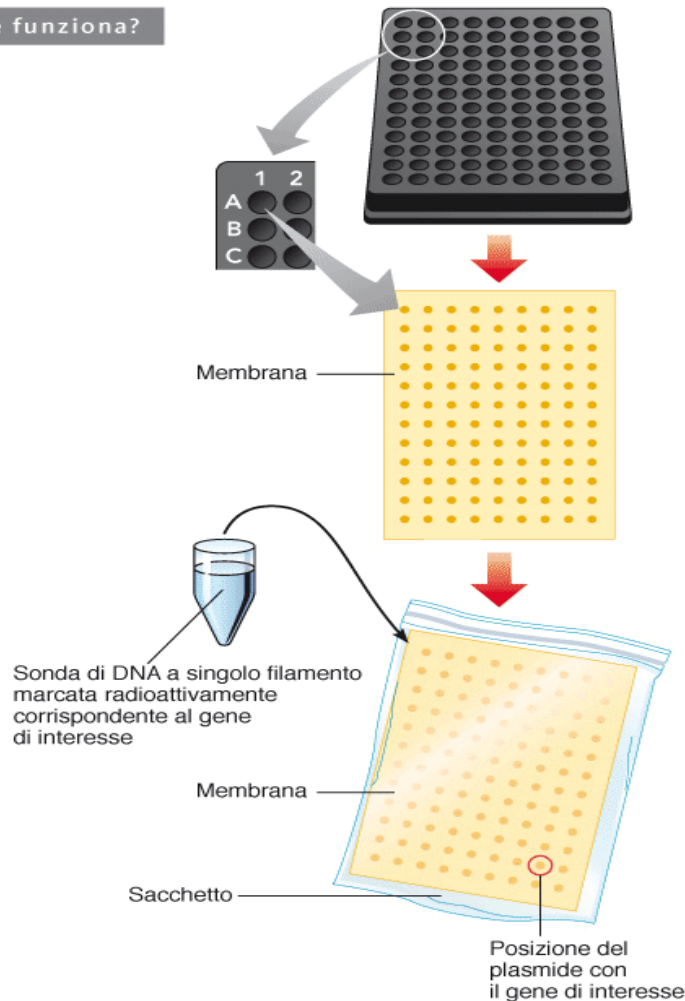
Impiego di sonde di acido nucleico

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Una sonda radioattiva di acido nucleico rivela la presenza di sequenze complementari di DNA in una libreria genomica.

Come funziona?



1 I cloni di una libreria genomica sono conservati nei pozzetti di una piastra come quella mostrata a lato. Una libreria costituita dall'intero genoma di un organismo occupa molte di queste piastre, che sono chiuse con un coperchio e conservate impilate una sull'altra.

2 Le cellule di ciascun clone sono trasferite in una posizione specifica di una membrana di nylon o di nitrocellulosa. La membrana è quindi trattata con agenti che provocano la lisi delle cellule batteriche per rilasciare i plasmidi con i frammenti di DNA genomico.

3 La sonda marcata con traccianti radioattivi è aggiunta alla membrana e si appaia con le sequenze nucleotidiche ad essa complementari (in questo caso, il gene d'interesse).

4 L'ibridazione è rivelata ponendo la membrana contro una lastra per raggi X, che è in seguito sviluppata. Il tracciante radioattivo legato alla sonda produce sulla lastra una macchia scura che rivela la posizione del clone recante il gene d'interesse.

FIGURA 15-5 Uso di una sonda di acido nucleico per identificare una specifica sequenza di DNA in una libreria genomica

- Formazione del cDNA

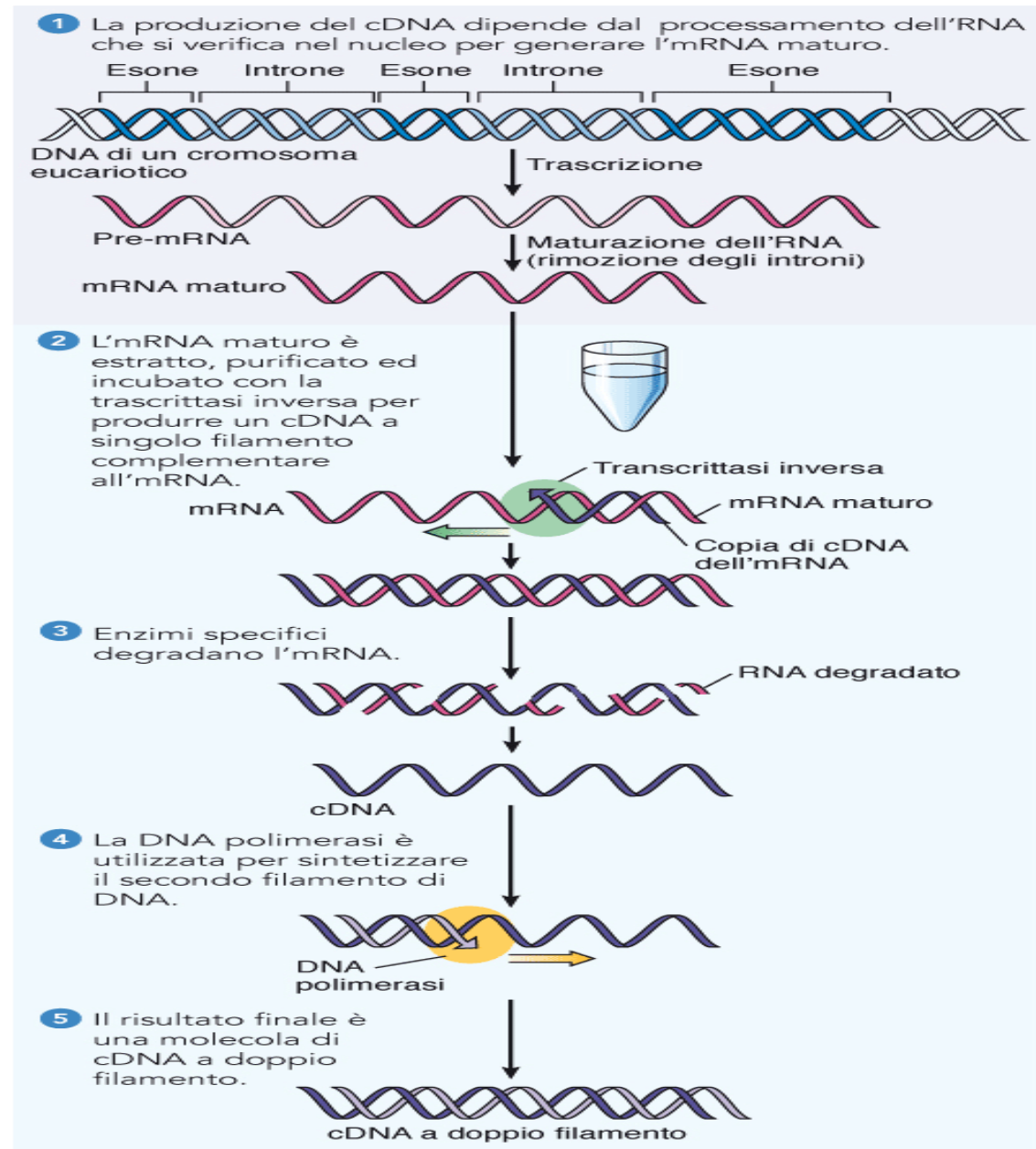


FIGURA 15-6 Formazione del cDNA

PCR

La reazione a catena della polimerasi (in inglese: Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di sequenze di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

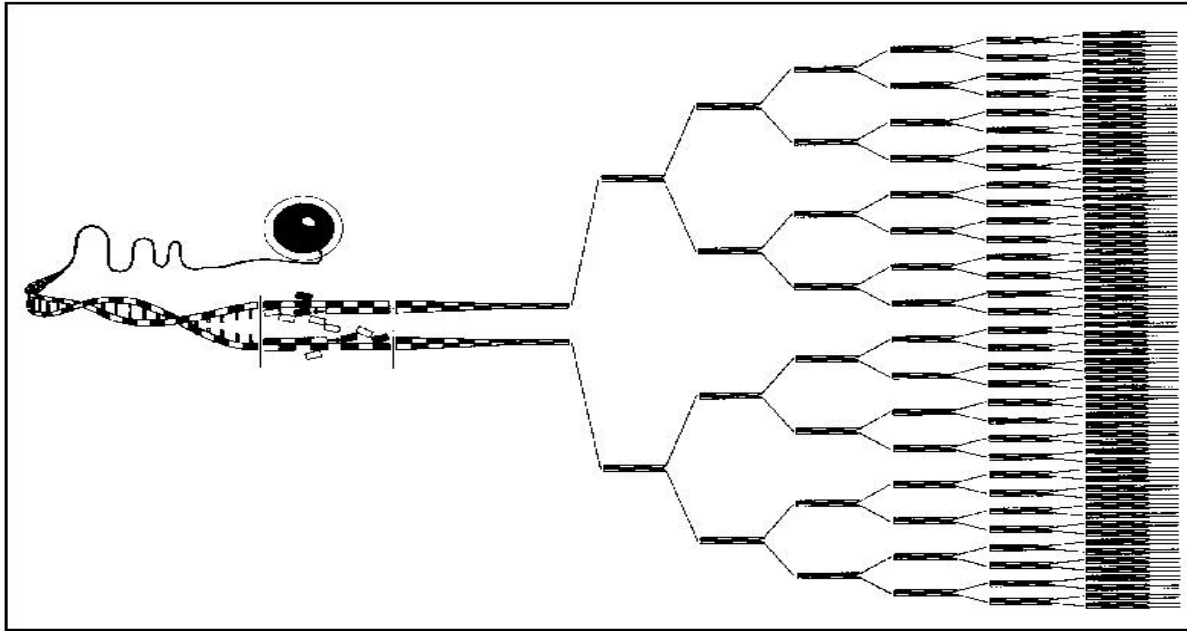
L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

L'invenzione della PCR

- Ideata da Kary Mullis nel 1983
- La prima pubblicazione è apparsa nel 1985
- Premio Nobel per la chimica nel 1993

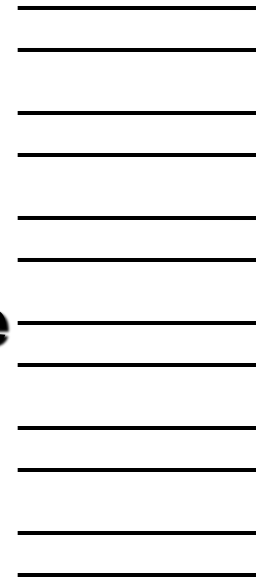


Polymerase Chain Reaction - PCR



DNA
==
(singola molecola)

PCR
→
amplificazione



**Molte
molecole**

Com'era l'analisi genetica prima della PCR?

- Il Southern blotting (1975) permetteva un'analisi approssimativa dei geni (RFLPs, inserzioni & delezioni)
- Il sequenziamento del DNA (1978) richiedeva che i geni venissero prima clonati in appositi vettori (plasmidi o fago λ)
- La costruzione di genoteche e lo screening potevano richiedere molti mesi e le genoteche dovevano essere preparate per ciascun individuo analizzato

DNA polimerasi di *Thermus* *aquaticus*



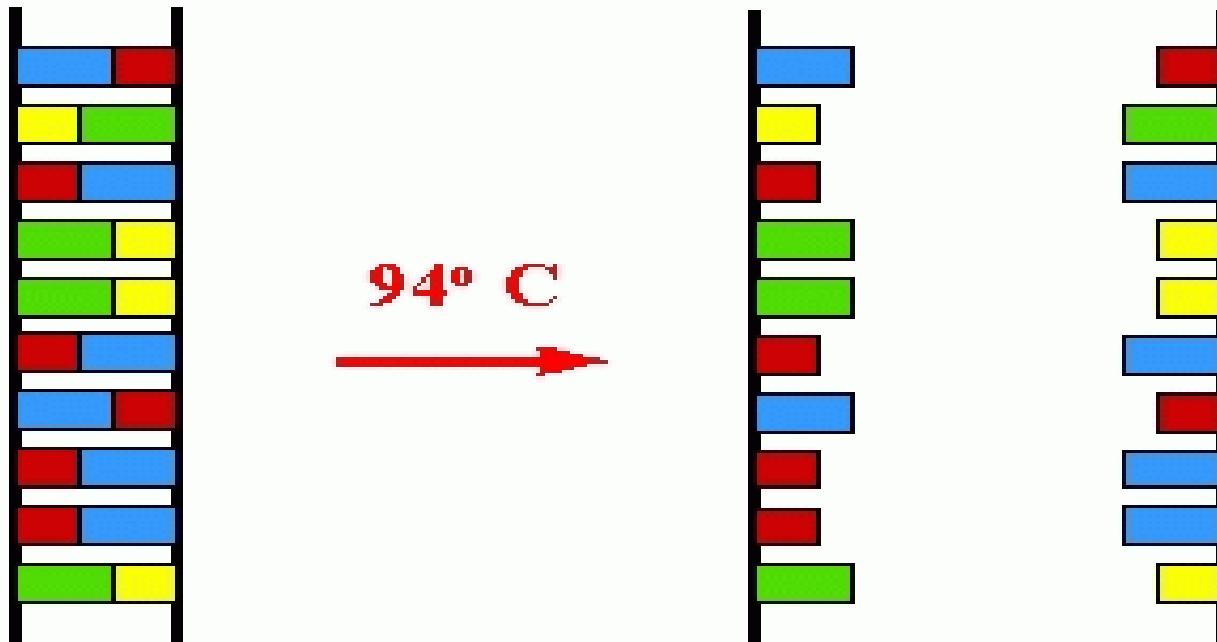
Thermus aquaticus è un batterio termofilo isolato per la prima volta nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli (Stati Uniti). È divenuto famoso nel campo della biologia molecolare dopo la sensazionale invenzione di Kary Mullis, la reazione a catena della polimerasi (PCR), che ha rivoluzionato il modo di fare ricerca in questo ed in molti altri settori e che portò l'eccentrico scienziato al premio Nobel per la chimica nel 1993; la sua notorietà è dovuta alle caratteristiche di estrema termostabilità di un suo enzima, la DNA polimerasi (commercialmente detta Taq polimerasi), componente fondamentale della miscela di reazione nell'amplificazione del DNA per mezzo della PCR (che richiede numerosi cicli di riscaldamento per favorire la denaturazione del DNA).

Prima della sua scoperta, per effettuare l'amplificazione del DNA con tecniche di laboratorio, era necessario aggiungere nuovo enzima dopo ciascun ciclo di riscaldamento, favorendo così la possibilità di inquinamento del campione e non permettendo la completa automazione del processo.

fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore

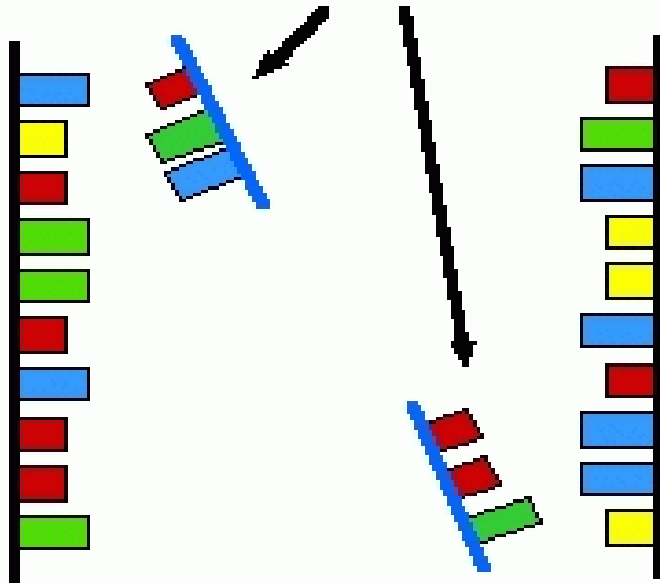
**DNA STRANDS ARE SEPARATED
BY HEATING**



fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

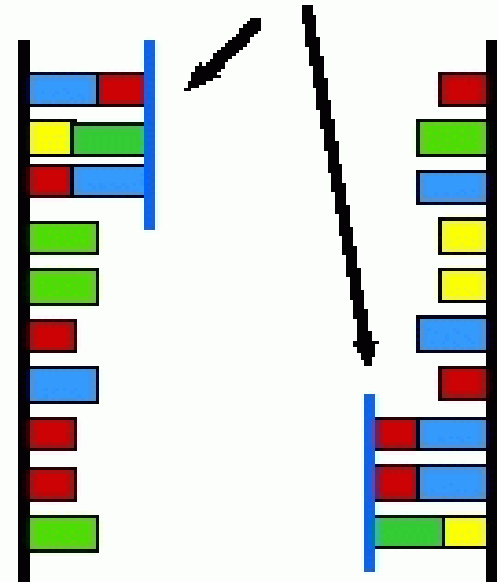
**UNATTACHED
PRIMERS**



55-60°C
54° C

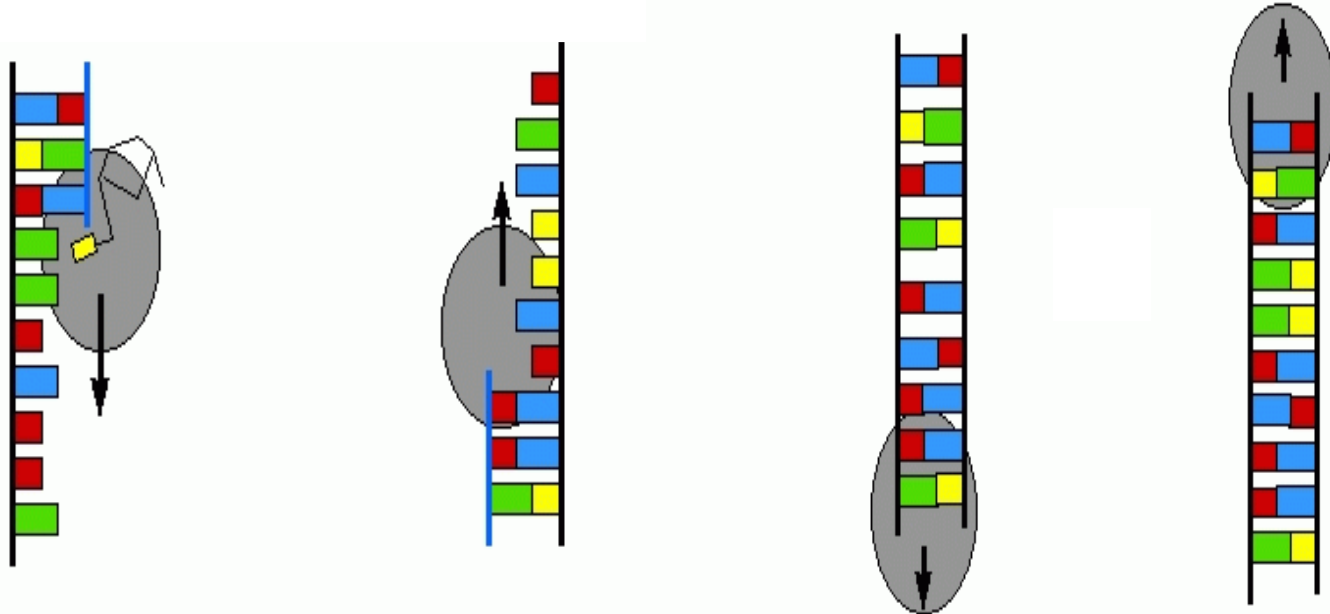


**ANNEALED
PRIMERS**



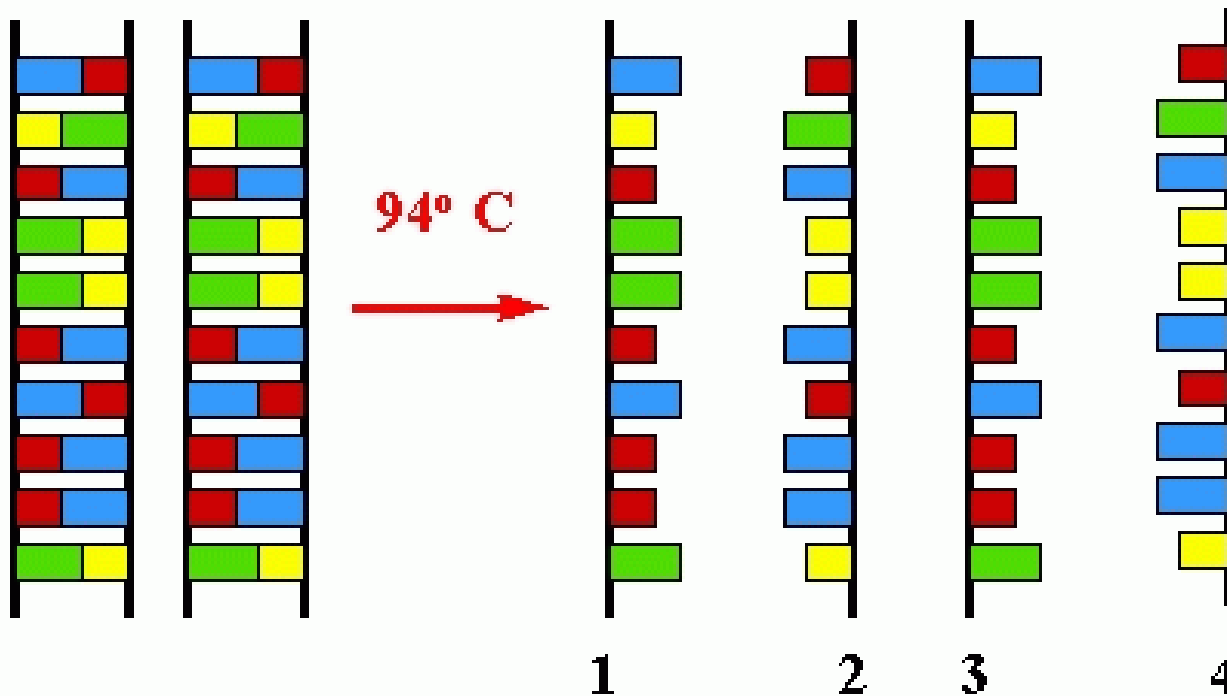
fase 3: ESTENSIONE

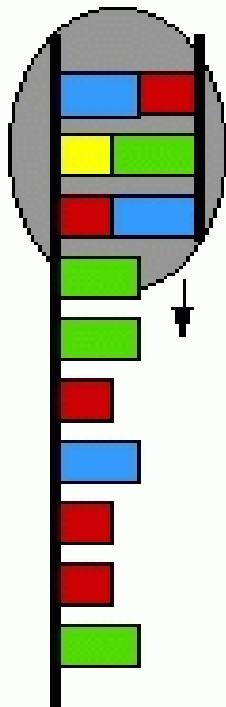
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



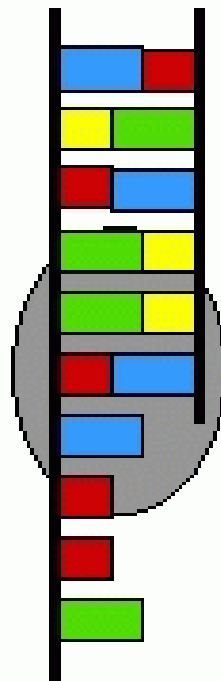
IL PROCESSO SI RIPETE

THE PROCESS IS REPEATED.

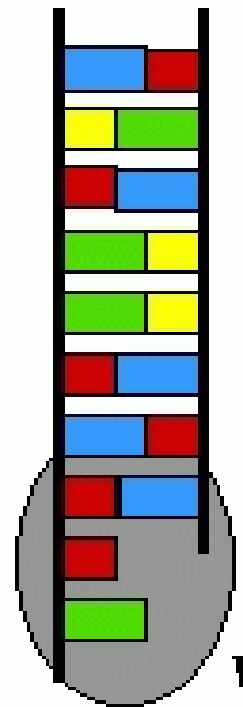




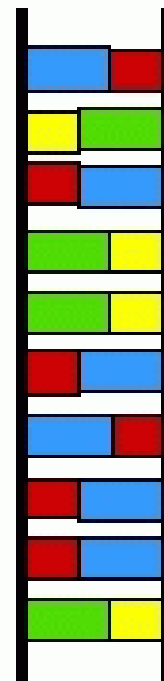
1



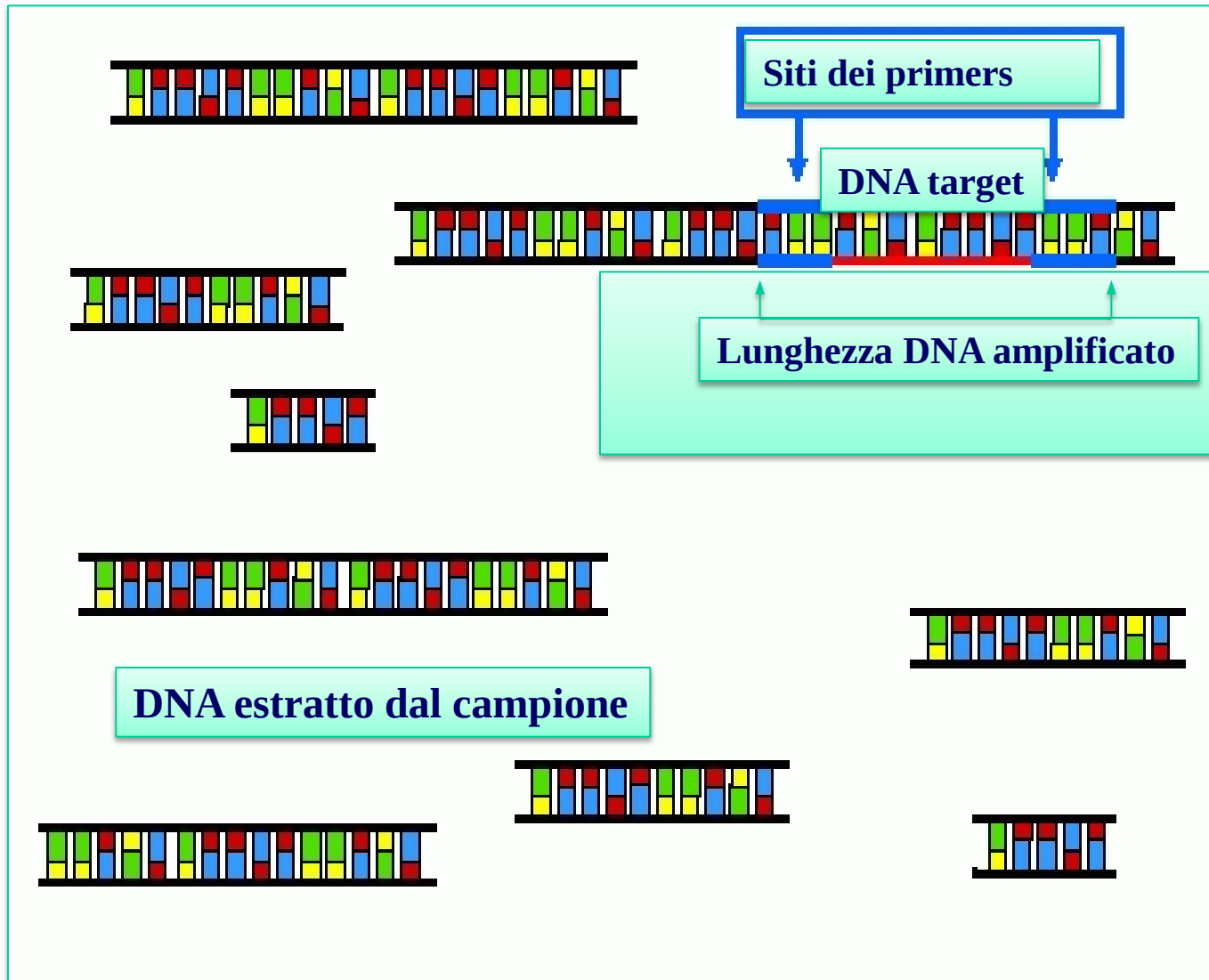
2



3



4



**Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA
“copiato” raddoppia**

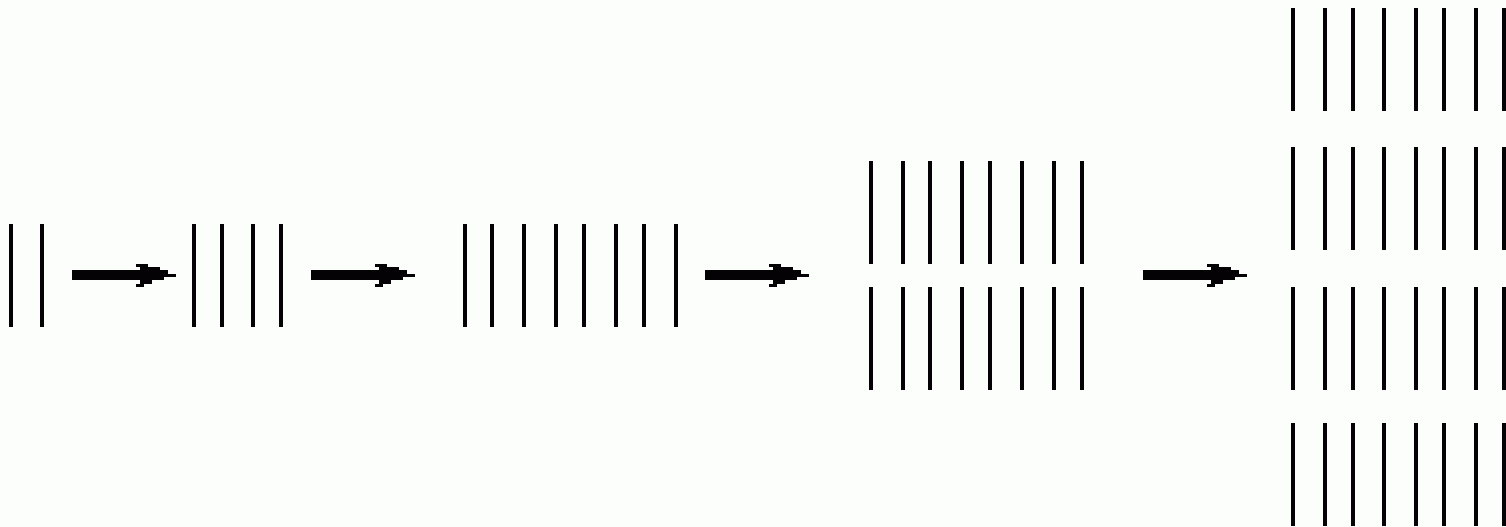
1

2

3

4

5

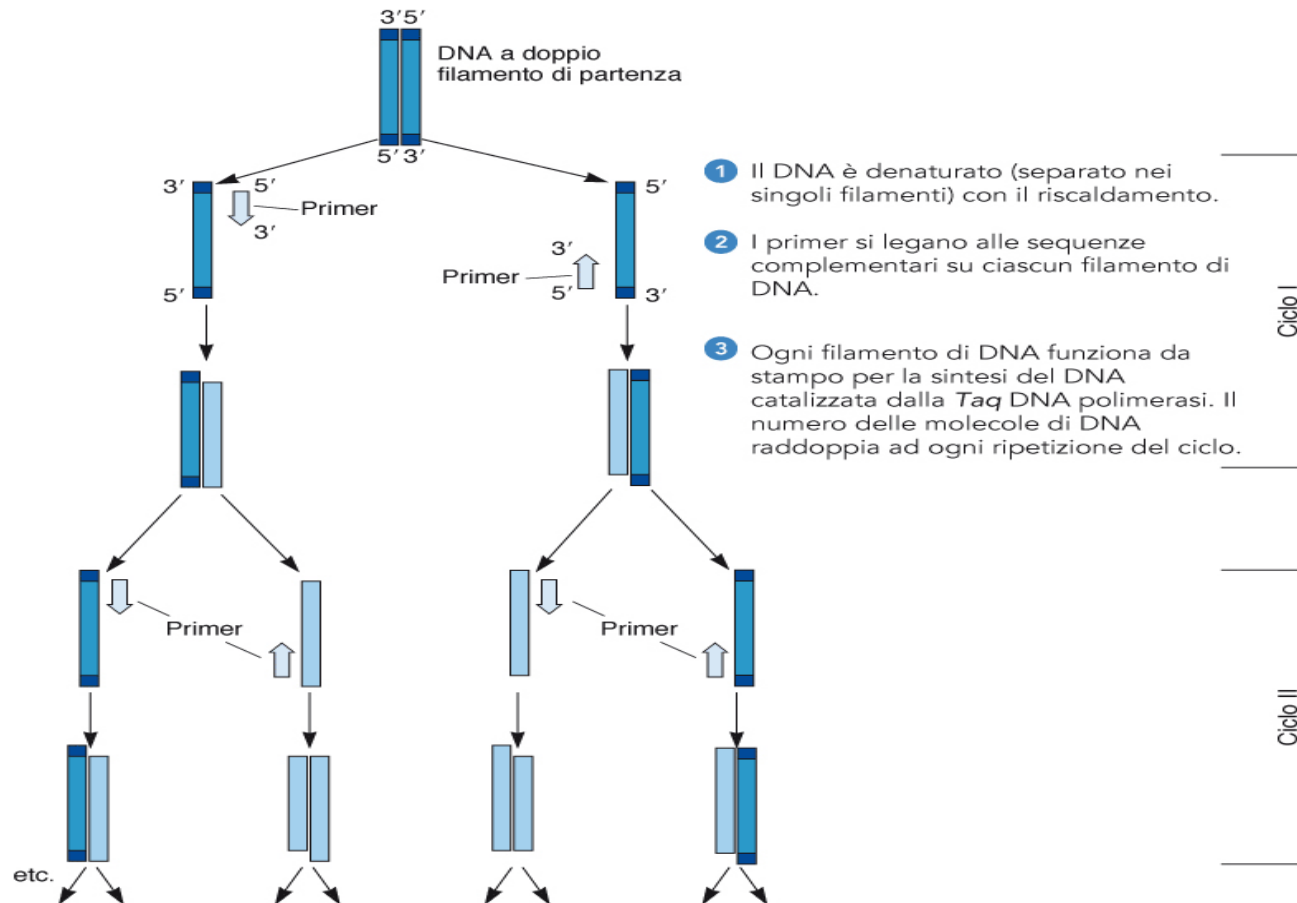


• PCR

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

In poche ore la PCR è in grado di amplificare quantità estremamente piccole di DNA generandone milioni di copie.

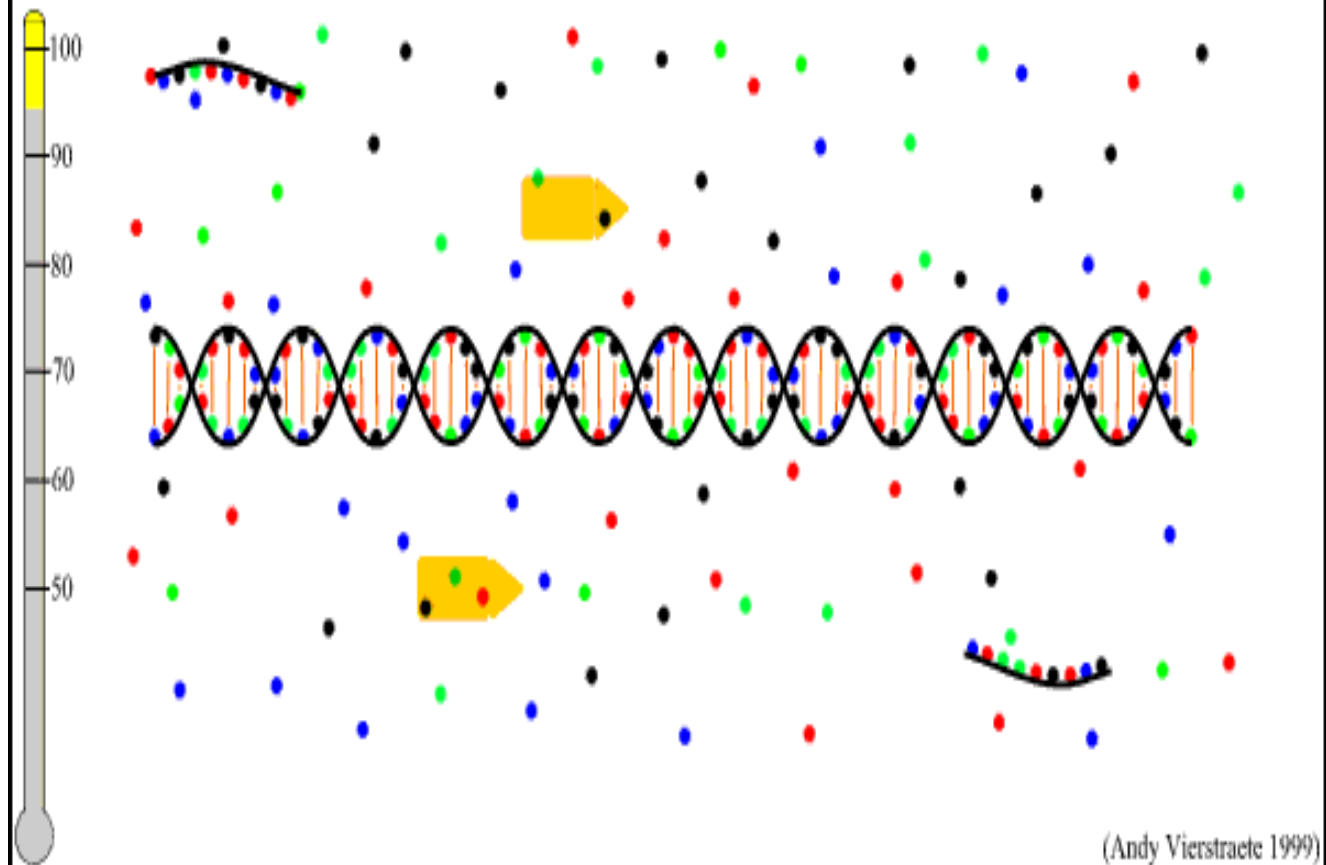


Come funziona?

La miscela di reazione iniziale include una piccolissima quantità di DNA a doppio filamento, i precursori del DNA (deossiribonucleotidi), specifici primer di acido nucleico e la *Taq* DNA polimerasi termostabile. La reazione di PCR coinvolge ripetuti cicli di denaturazione, attacco dei primer ed estensione del filamento, eseguita da enzimi che sfruttano l'appaiamento di basi complementari.

FIGURA 15-7 Amplificazione del DNA tramite la reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

PCR : Denaturation 94°C

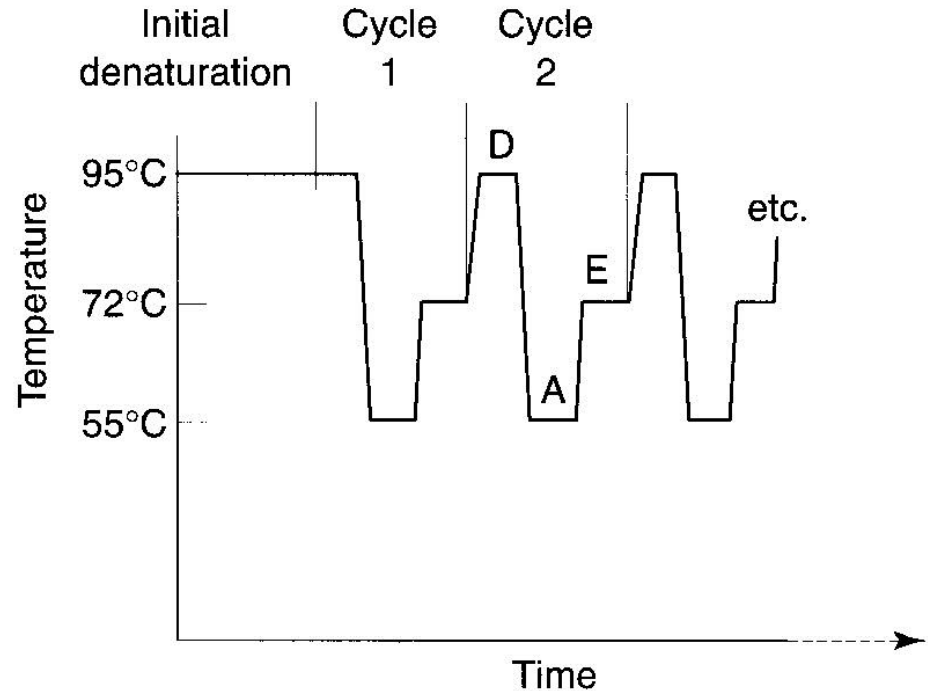


Quanto è potente la PCR?

- La PCR può amplificare fino ad ottenere una quantità utilizzabile di DNA (visibile su gel) in meno di 2 ore
- Lo stampo di DNA non necessita di particolari purificazione se il frammento da amplificare è di dimensioni ridotte (fino a 1000bp)
- Il prodotto della PCR può essere digerito con enzimi di restrizione, sequenziato o clonato
- La PCR può amplificare una singola molecola di DNA (es. uno spermatozoo)

I cicli della PCR

- **30–35 cicli ciascuno comprendente:**
 - **denaturazione (95°C), 10-40 sec**
 - **annealing (50–65°C), 30-120 sec**
 - **polimerizzazione (68-72°C), il tempo dipende dalla lunghezza del frammento**

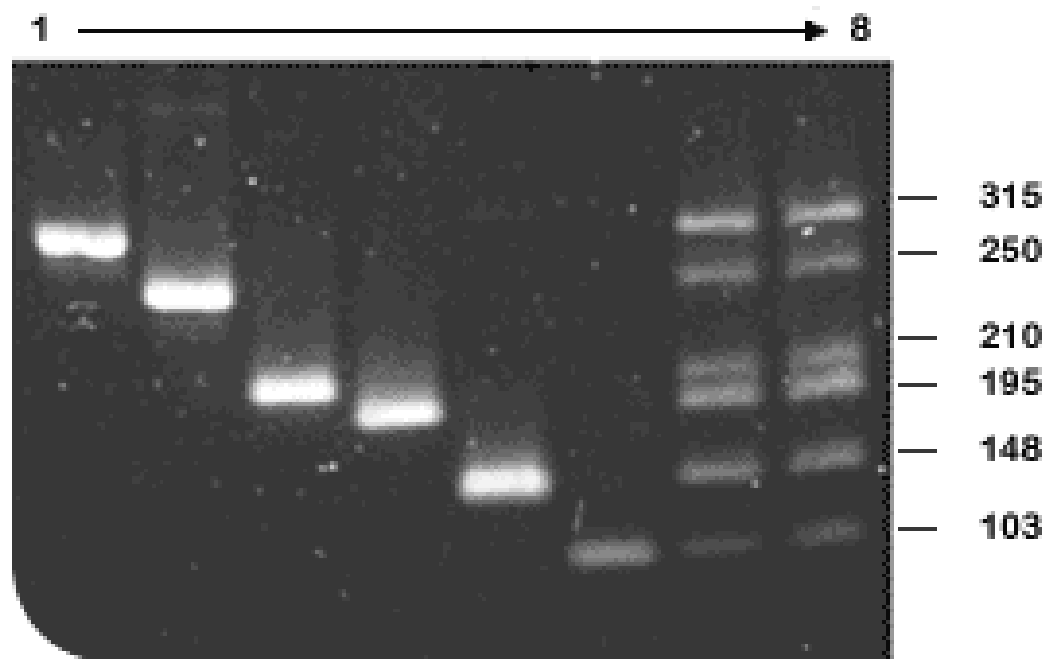


Termociclatori



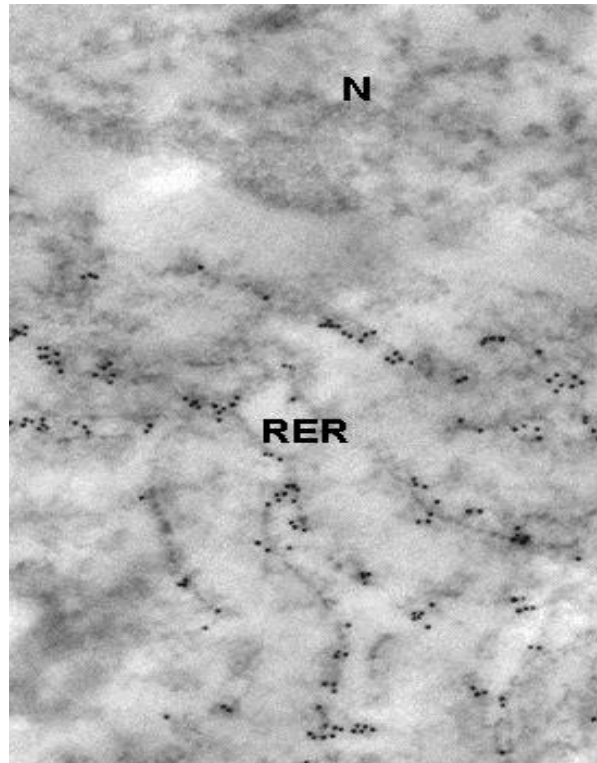
PCR MULTIPLEX

- permette l'analisi di più target contemporaneamente
- vengono usati miscele di primers o primers degenerati



PCR in situ

Il DNA o l'RNA vengono amplificati direttamente nelle cellule e nei tessuti morfologicamente intatti



Real Time PCR

La Real Time PCR permette in tempo reale di monitorare la reazione di PCR mediante emissione di fluorescenza

Viene stimata l'iniziale quantità di template di DNA

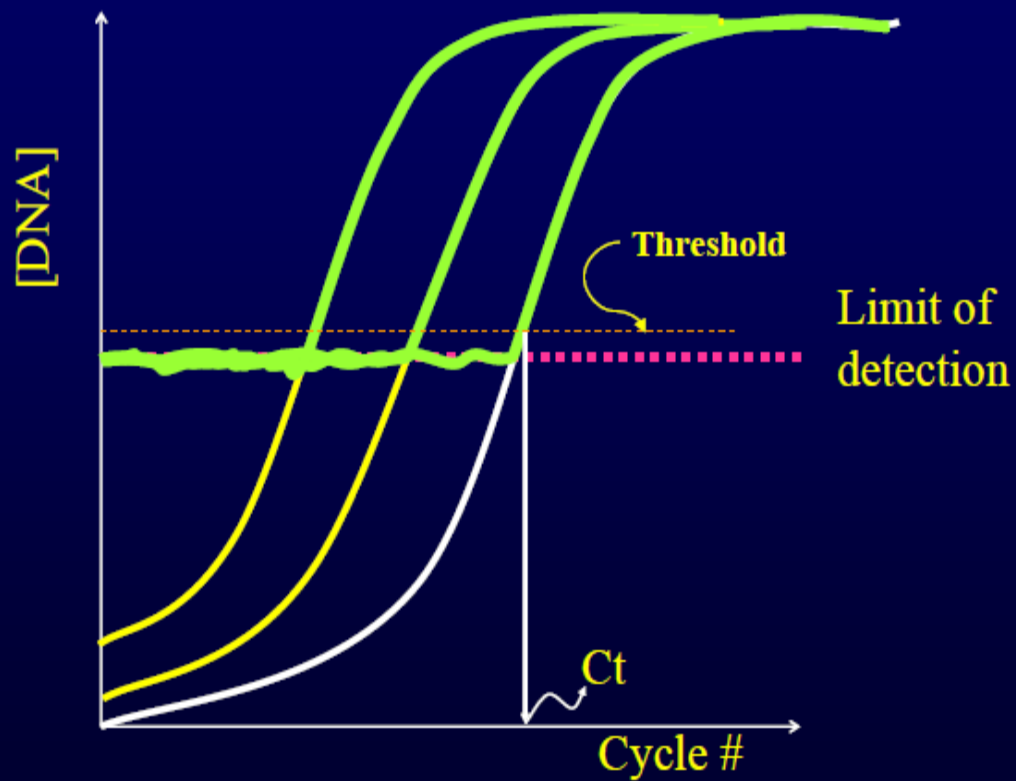
Basata sulla quantificazione di fluorescenza

Ct (ciclo soglia) è il ciclo soglia al di sopra del quale si ha l'esponenziale aumento della quantità di DNA prodotto per PCR.

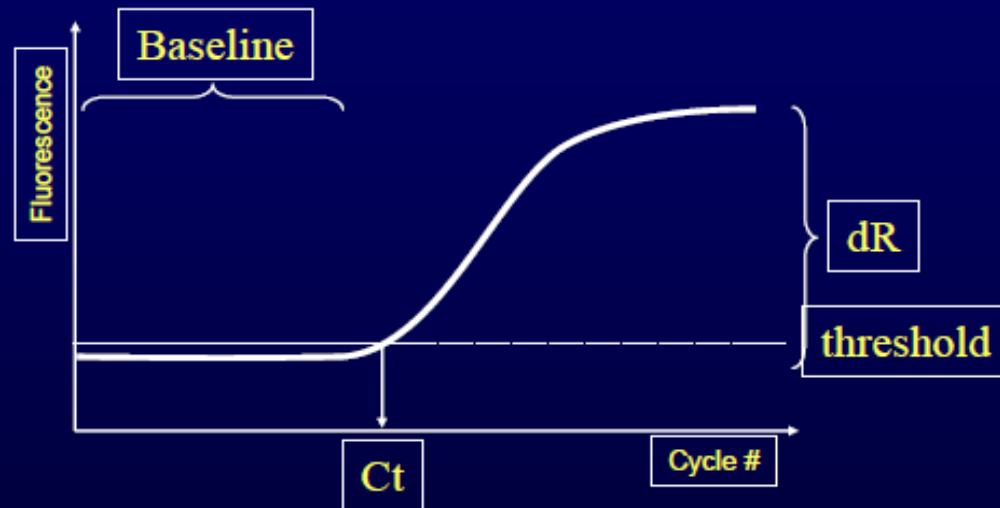
Il ciclo soglia correla con il DNA iniziale

A concentrazione alta di DNA iniziale si un basso ciclo soglia.

Quantitative PCR



Definition: C_t value



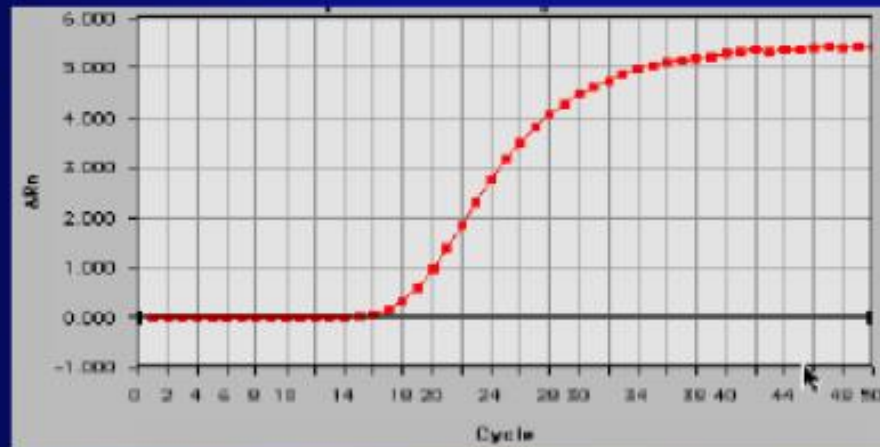
- C_t : Fractional cycle number at which the fluorescence intensity crosses the arbitrary threshold line.
- It is the parameter used for quantitation
 - C_t value of 40 or more means no amplification and cannot be included in the calculations

Real-time PCR is kinetic

- Detection of “amplification-associated fluorescence” at each cycle during PCR
- No gel-based analysis at the end of the PCR reaction
- Computer based analysis of the cycle-fluorescence time course

Increasing
fluorescence

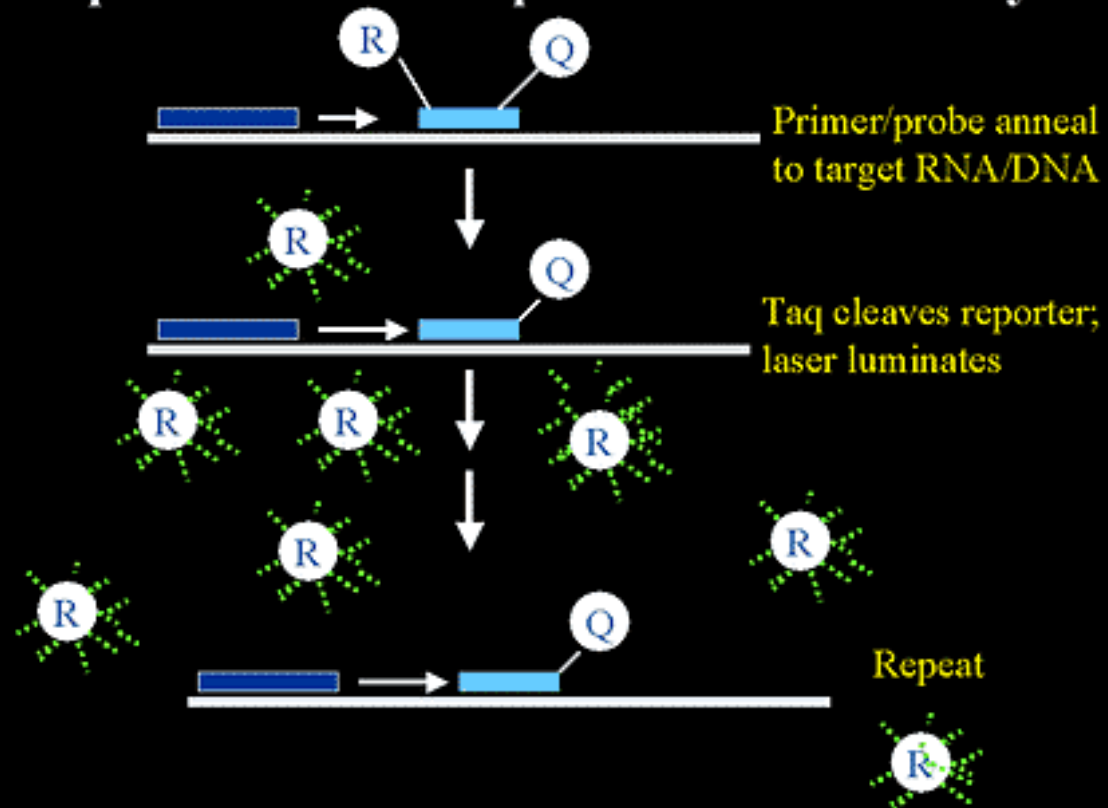
Linear plot



PCR cycle

Real Time PCR

TaqMan “real-time” quantitative PCR assay



Applications

- Gene expression (and microarray validation).
- DNA target quantification (nuclear, mitochondrial, residual DNA in protein preps (QC)).
- SNP detection, Allele discrimination, Genotyping, Haplotyping
- DNA Methylation, Apoptosis
- Viral load assays, pathogen & GMO detection.
- Clinical Diagnostics (Cancer, Therapy Response)
- Static reads (“96-well fluorimeter”).

Real-Time PCR Applications II

- **DNA damage (microsatellite instability) measurement**
- **radiation exposure assessment**
- ***in vivo* imaging of cellular processes**
- **mitochondrial DNA studies**
- **methylation detection**
- **detection of inactivation at X-chromosome**
- **linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: a new method for real-time quantitative analysis of target numbers in small samples, which is adaptable to high throughput applications in clinical diagnostics, biodefense, forensics, and DNA sequencing**

Elettroforesi

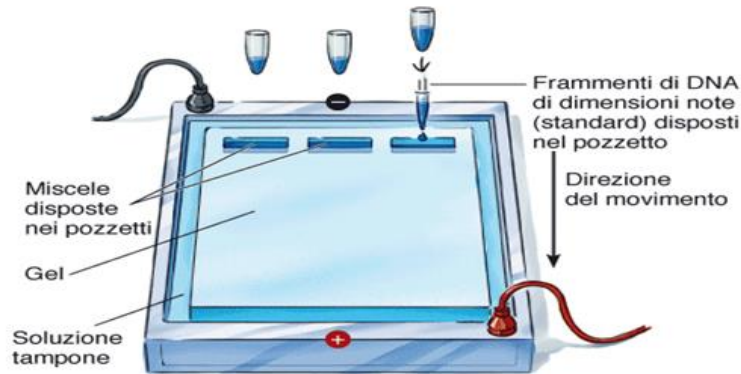
METODO DI RICERCA

Perché si usa?

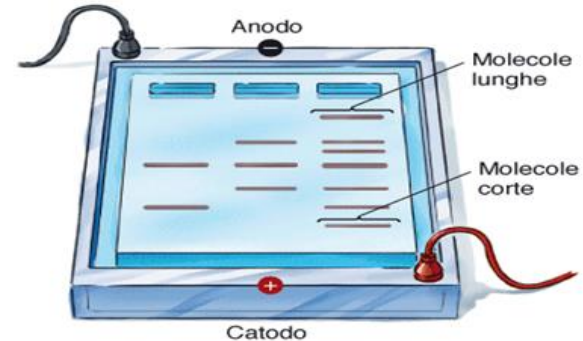
L'elettroforesi su gel separa molecole, come gli acidi nucleici, sulla base della loro dimensione e carica mentre migrano attraverso un campo elettrico.

Come funziona?

- 1 Il gel è preparato versando una soluzione di agarosio o poliacrilamide su un supporto di vetro o di Plexiglas in un modo da formare uno strato sottile. Quando il gel si è solidificato, i campioni, costituiti da una miscela di macromolecole (in questo caso, frammenti di DNA di diversa lunghezza) sono disposti nei pozzetti preparati ad un'estremità del gel.



- 2 Quando al gel è applicata una corrente elettrica, le molecole di DNA, che hanno carica negativa, si muovono dal polo negativo verso il polo positivo. I frammenti più piccoli avanzano più rapidamente e percorrono una distanza maggiore. Le bande di DNA a questo stadio non sono visibili.



- 3 Questo gel contiene frammenti di DNA separati per elettroforesi. Il gel è colorato con bromuro di etidio, un colorante che lega il DNA ed è fluorescente quando esposto a luce UV.



FIGURA 15-8 L'elettroforesi su gel

Elettroforesi di Acidi Nucleici in gel

**Permette la separazione di frammenti di DNA/RNA
da una miscela complessa**

E' una tecnica fondamentale per:

- **l'analisi (elettroforesi *analitica*)***
- **la purificazione degli acidi nucleici (elettroforesi *preparativa*)**

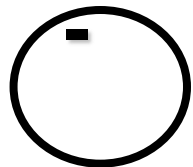
*** La gel elettroforesi analitica analizza la composizione , qualità, quantità
di un campione di acido nucleico**

1. SEPARAZIONE DI MACROMOLECOLE IN BASE ALLA LORO CARICA

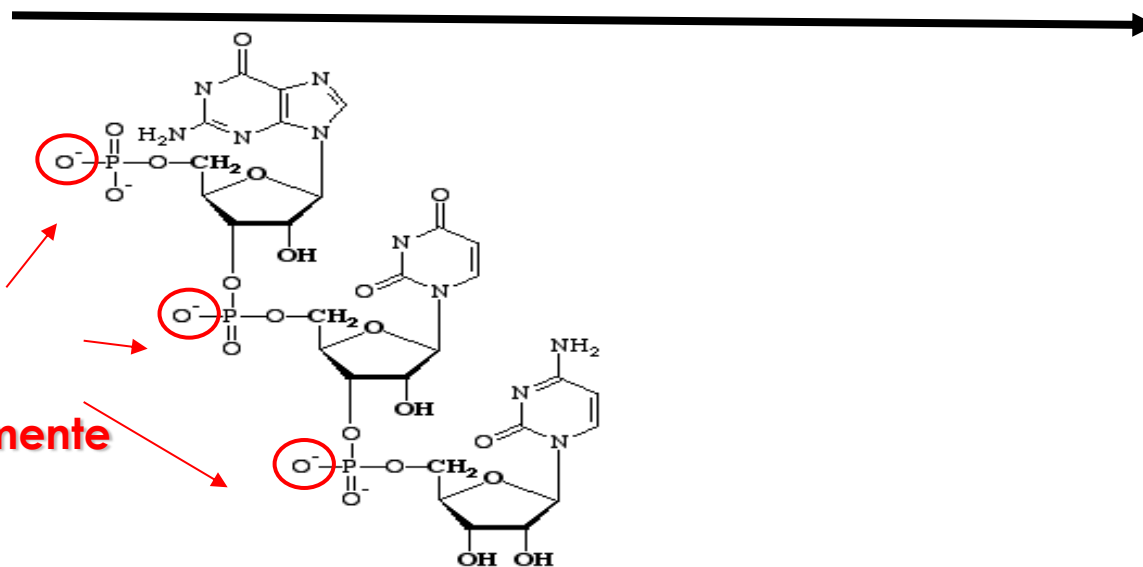
Quando una molecola carica viene posta in un campo elettrico, essa migrerà verso l'elettrodo dotato di carica opposta .

DNA ed RNA essendo carichi negativamente si muoveranno verso il polo positivo (anodo).

catodo



anodo

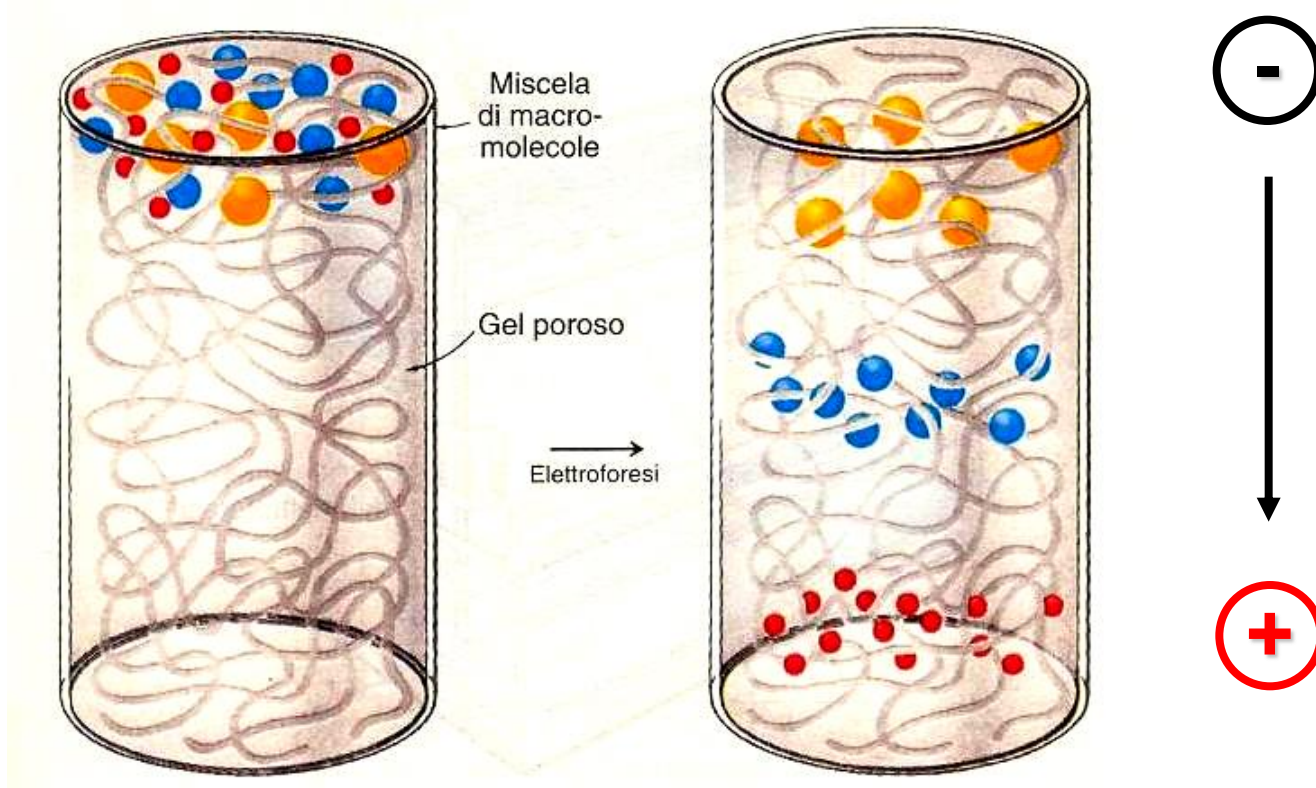


**RNA e DNA sono
carichi negativamente**

2. SEPARAZIONE DI MACROMOLECOLE IN BASE ALLE LORO DIMENSIONI

DNA ed RNA migreranno a seconda del peso molecolare (paia di basi, bp)

Effetto “setaccio” in un gel uniforme (poliacrilamide , agarosio)

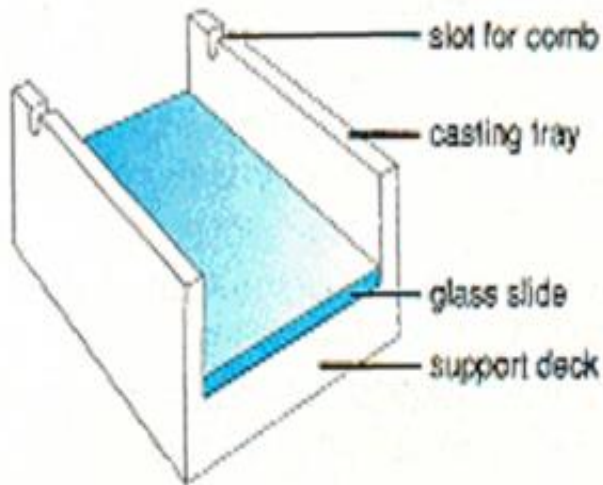


METODO: FOTMAZIONE GEL DI AGAROSIO

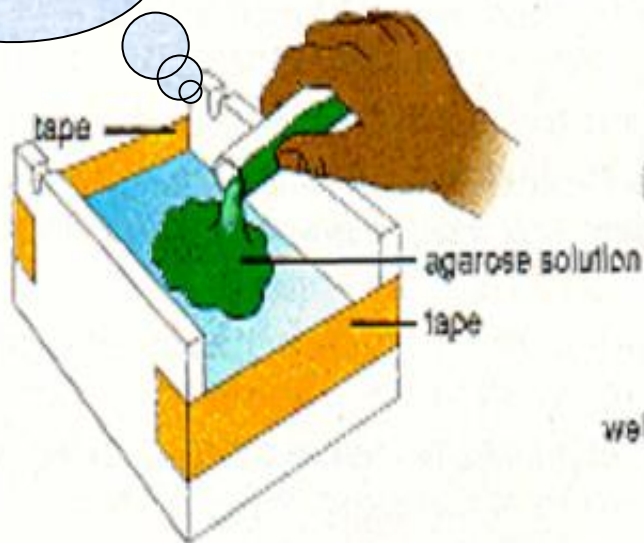
1. Si scioglie l'agarosio in polvere in una soluzione tampone a 100°C
2. Alla soluzione d'agarosio sciolta vi si aggiunge **Etidio Bromuro (EtBr)** o altro intercalante

3. Si versa l'agarosio sciolto nella vaschetta elettroforetica

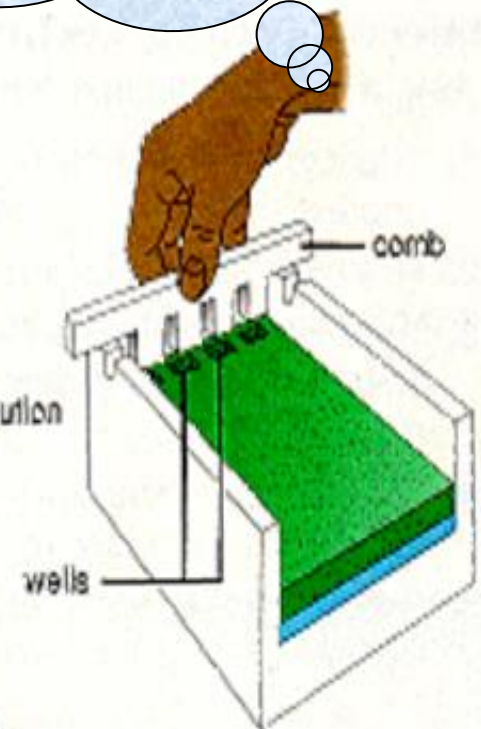
4. Quando il gel è gelificato, Si levano "i pettini"



a. Casting tray for making gel slab



b. Agarose solution poured into casting tray



c. Comb that forms



**Il DNA colorato con bromuro di etidio
emette una fluorescenza di colore rosso-arancio se sottoposto a luce UV**

Etidio Bromuro (EtBr):

Colorante fluorescente
assorbe la luce UV a 300 nm
dando colore giallo-arancio

Permette di
A. visualizzare, il campione

B. quantificare il campione
L'intensità della fluorescenza
è, infatti, proporzionale alla
quantità del campione!!!

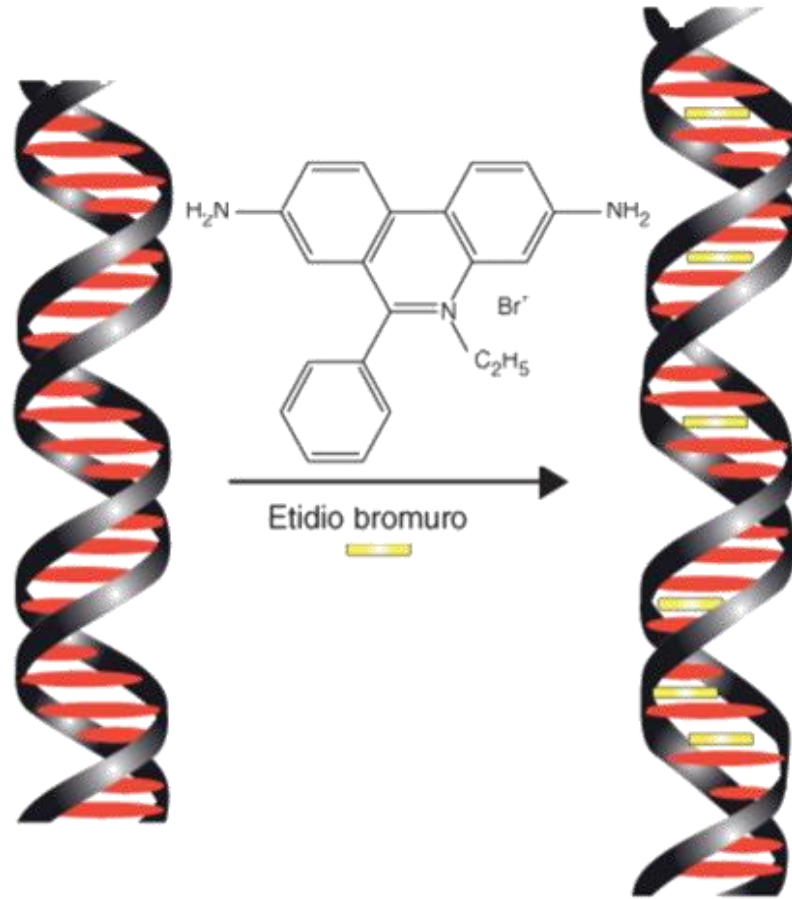


Figura 2.12. Il legame dell'etidio bromuro al DNA. L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il legame distorce la doppia elica ed aumenta la sua lunghezza. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato con luce ultravioletta.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

Consente la separazioni di molecole di grandi dimensioni: 0.1 - 20 kb

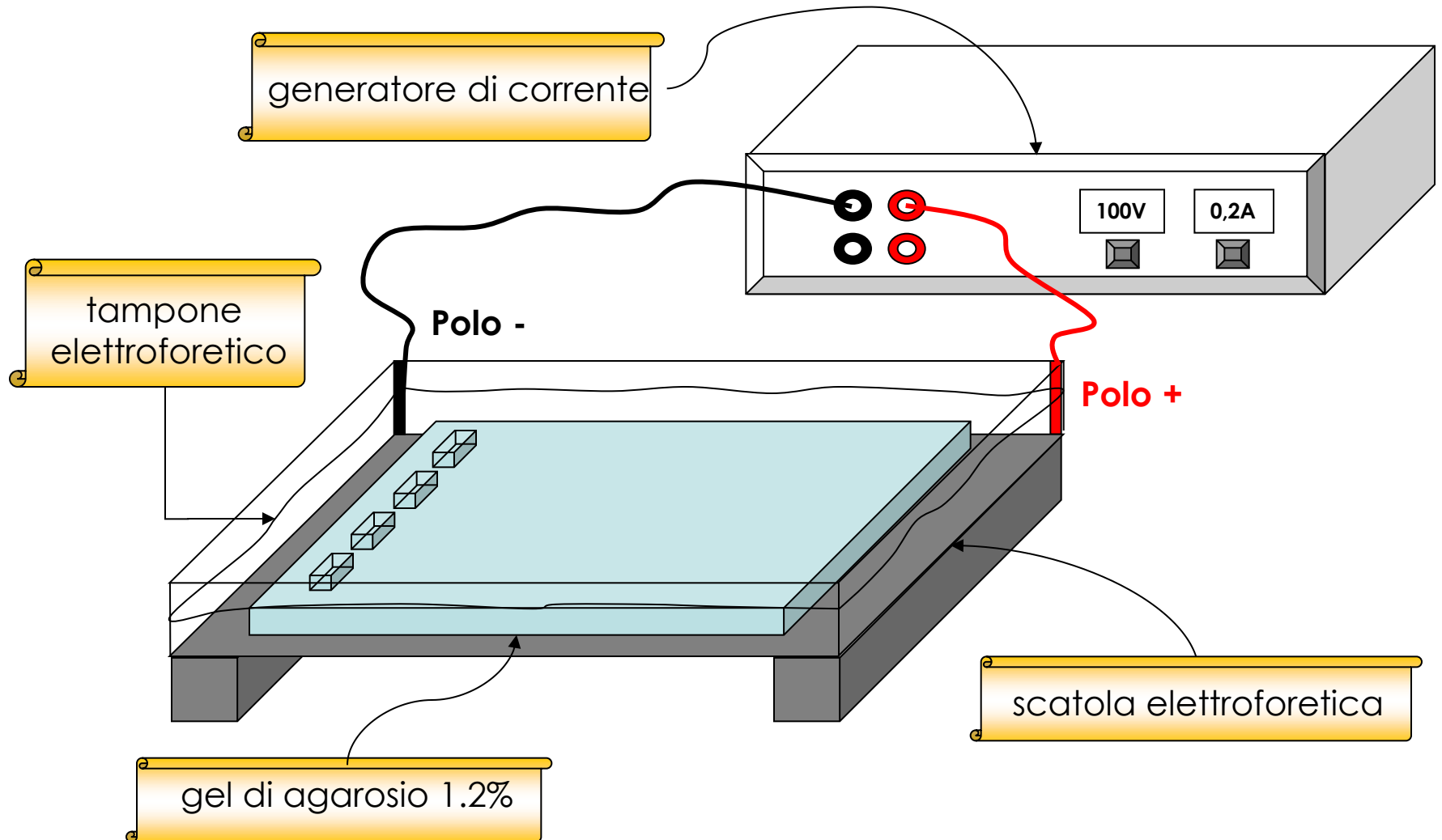
Concentrazione
di agarosio

0.8% : 0.5 – 20 kb

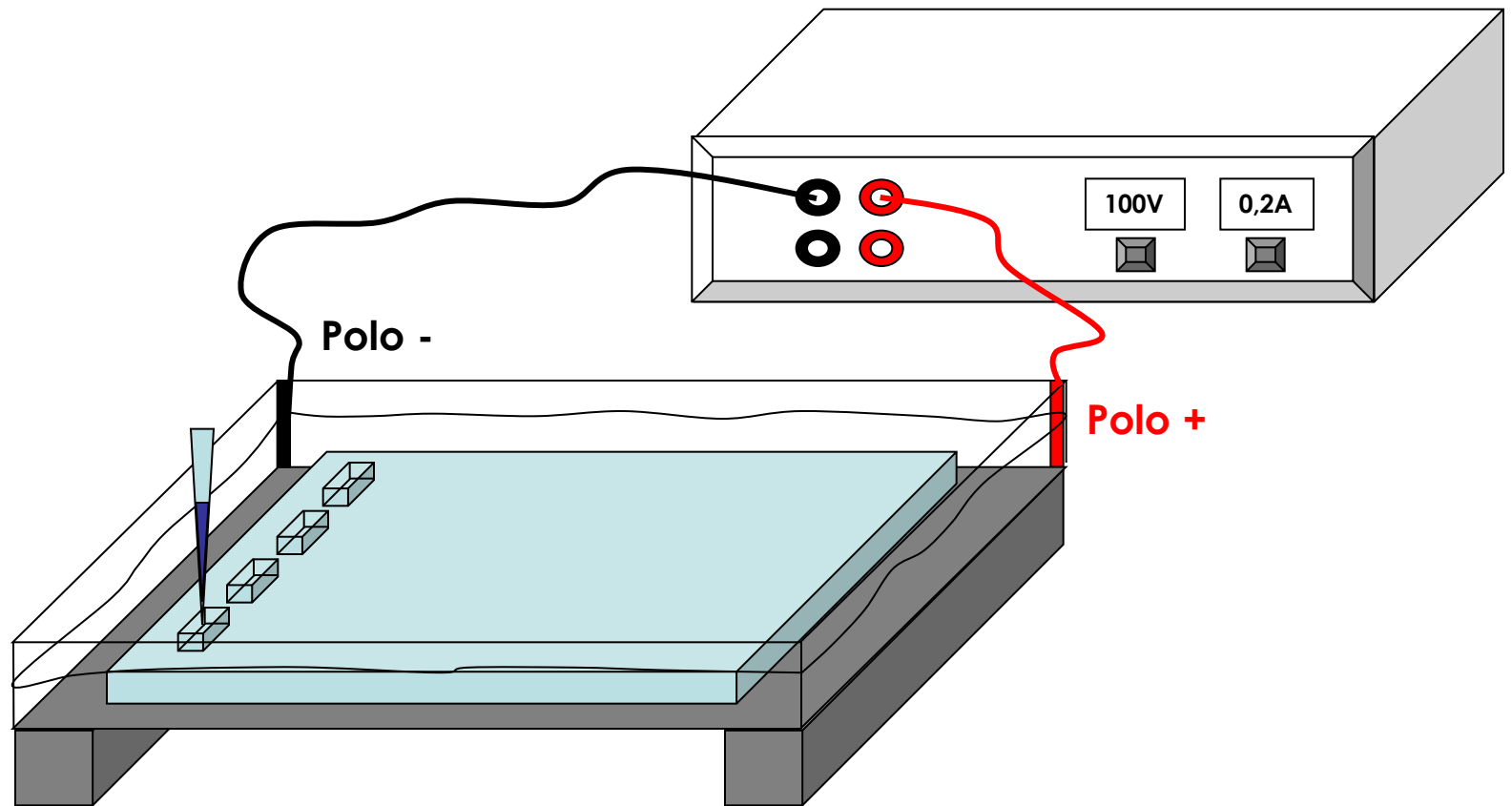
2% : 0.1 – 3 kb

Risoluzione

SCHEMA APPARATO PER ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

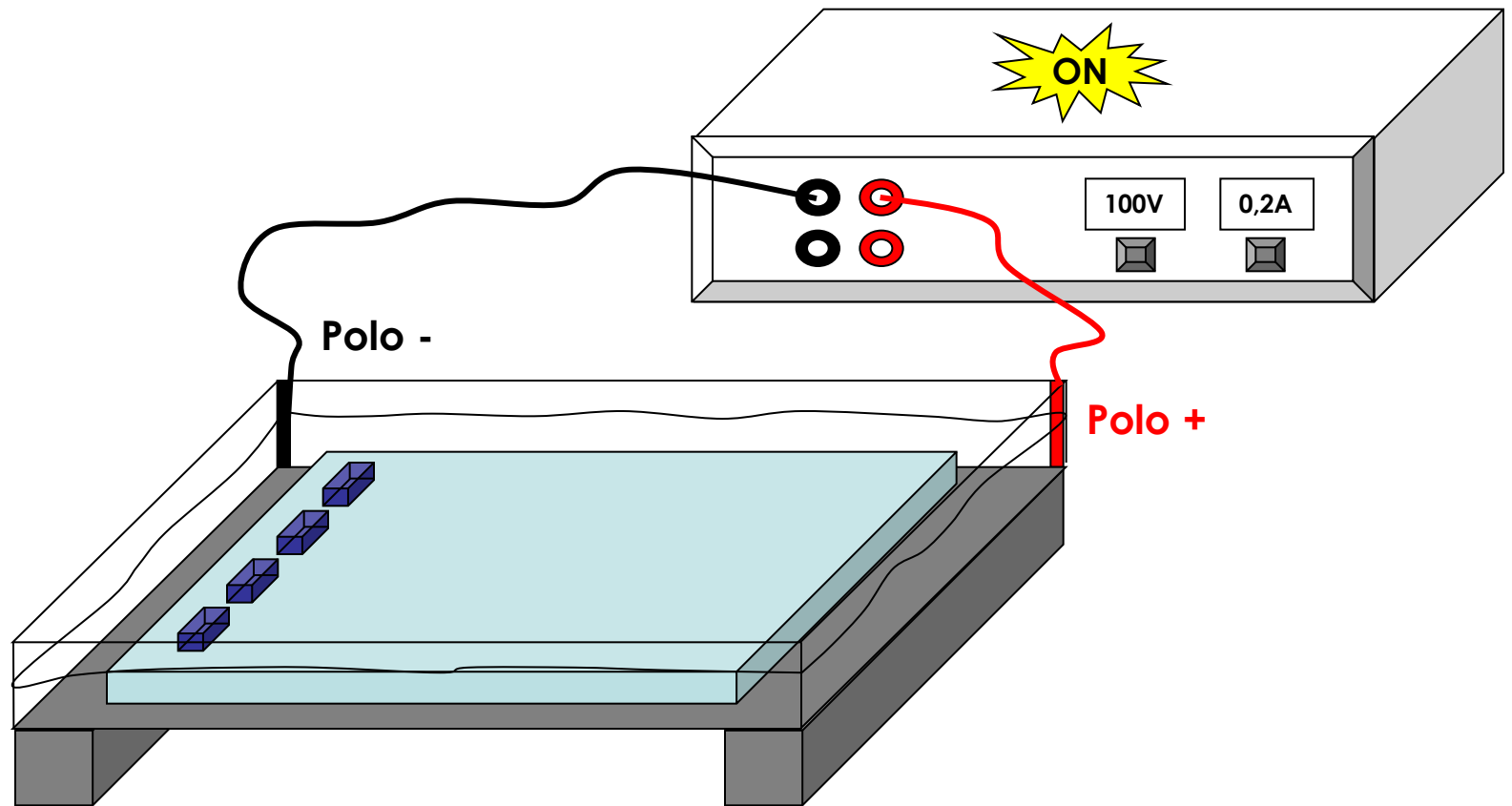


ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



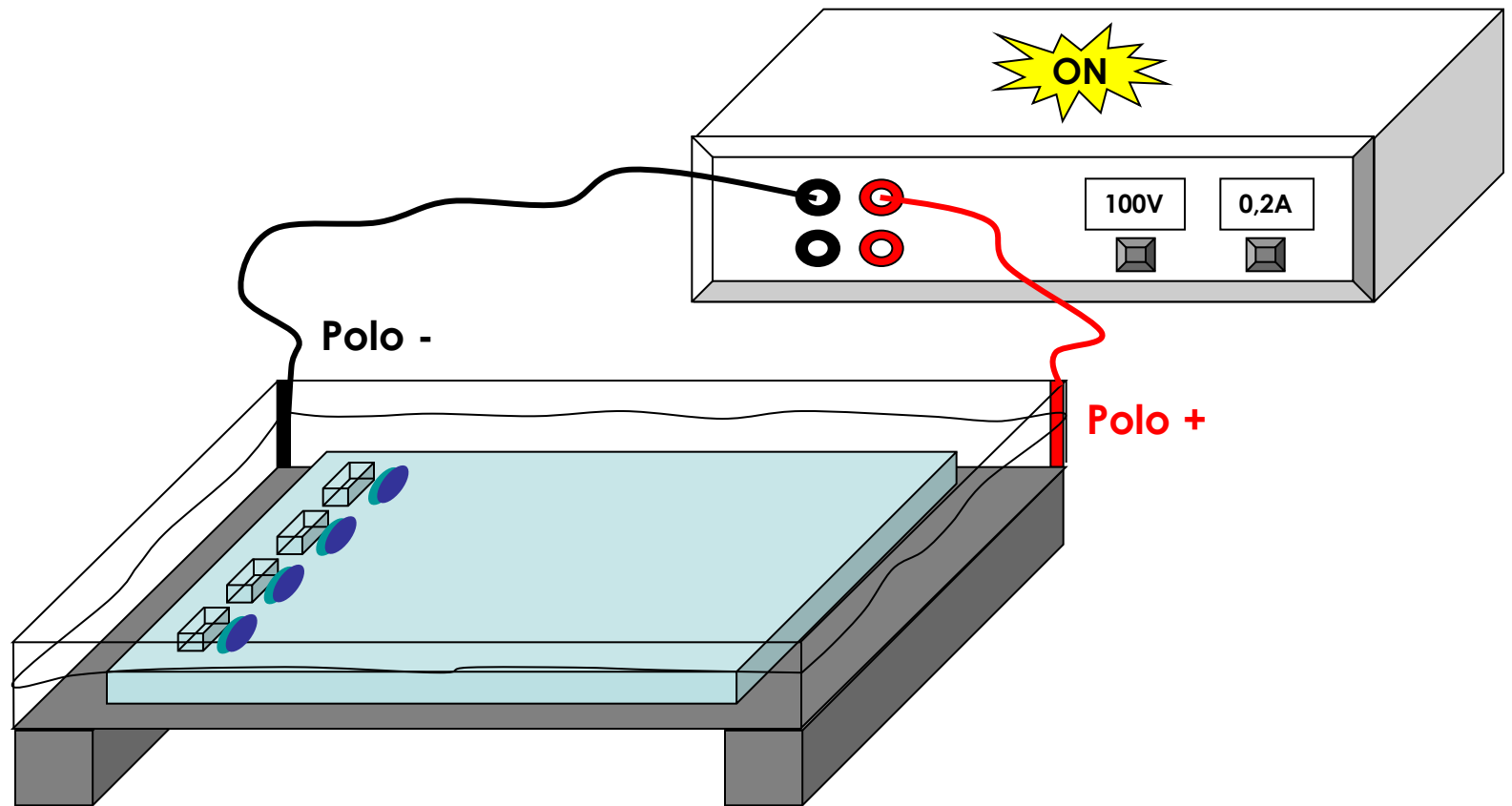
Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



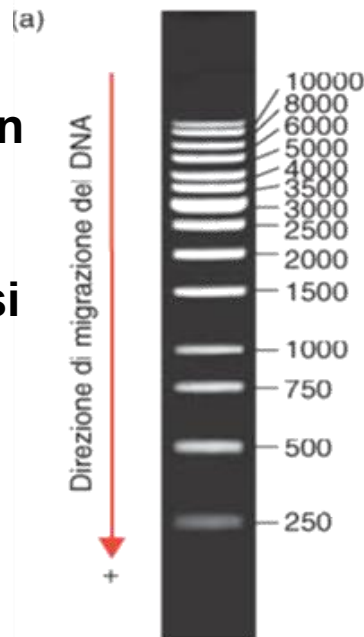
Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

E' necessario avere un marcatore di peso molecolare noto, con frammenti di pesi molecolari noti.



(b)

Taglia (bp)	Distanza di migrazione (mm)
10000	12.00
8000	12.85
6000	14.55
5000	16.12
4000	18.24
3500	19.74
3000	21.86
2500	23.97
2000	27.32
1500	31.72
1000	38.79
750	43.29
500	50.25
250	59.35

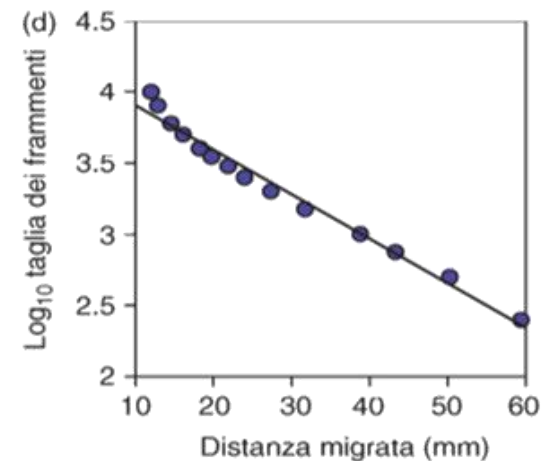
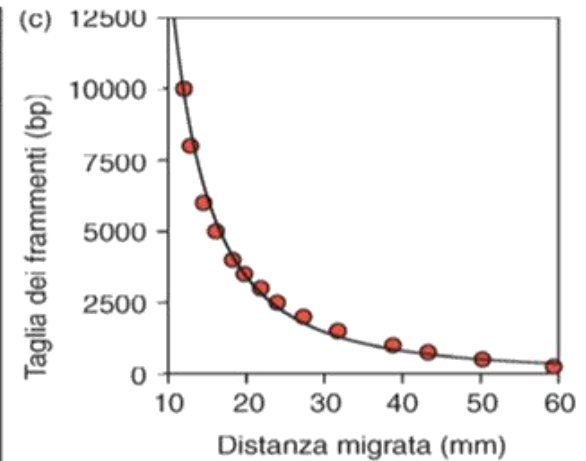
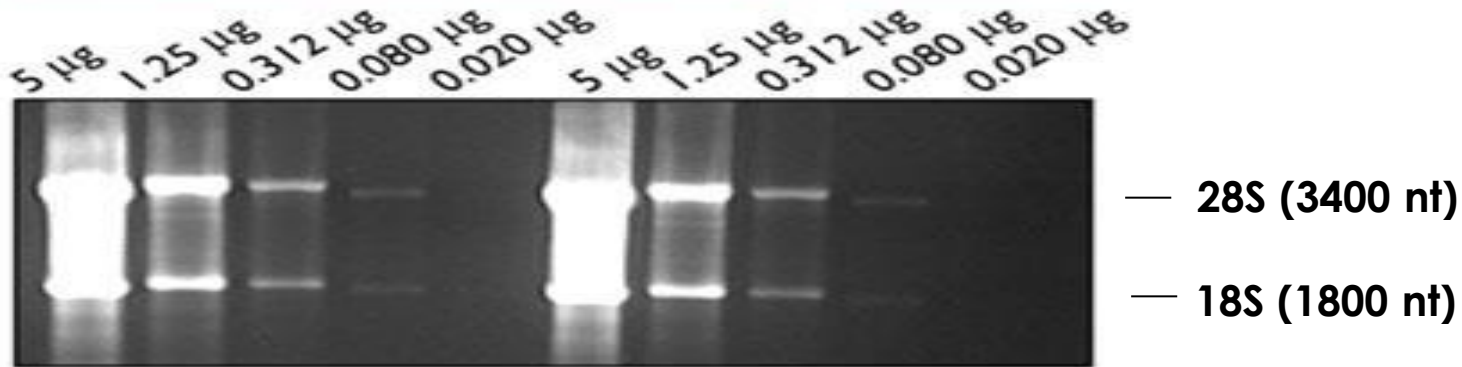


Figura 2.13. Migrazione dei frammenti di DNA attraverso un gel di agarosio. (a) Un gel di agarosio che mostra la separazione di frammenti di DNA a dimensione nota. (b) La dimensione di un frammento di DNA e la sua distanza di migrazione nel gel. (c) Grafico della relazione tra la dimensione dei frammenti e la distanza di migrazione costruito con i risultati mostrati in (b), che mostra come la relazione tra distanza di migrazione e lunghezza dei frammenti non sia lineare. (d) Grafico della relazione tra il log della dimensione dei frammenti e la distanza di migrazione, che mostra l'esistenza di una precisa correlazione inversa tra i due parametri.

La distanza di migrazione è inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola (ovvero alle sue paia di basi ; bp)

Separazione in gel d'agarosio di molecole di RNA in condizioni denaturanti

RNA Samples in Denaturing Agarose Gel



Per ottenere una buona separazione dei pesi molecolari durante la corsa nel gel, l'RNA deve essere **denaturato**, ossia le molecole devono essere liberate sia da appaiamenti con altre molecole sia da strutture secondarie intramolecolari.

La denaturazione si ottiene con un trattamento termico a 90-95°C) il campione e aggiungendo **formaldeide** al gel. Anche il loading dye contribuisce alla denaturazione poichè contiene **formaldeide** e **formammide**.

• Southern Blotting

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

La tecnica del Southern blotting consiste nel trasferimento su un filtro dei frammenti di DNA separati per elettroforesi, con il mantenimento delle stesse posizioni che occupavano sul gel. I frammenti possono essere così ibridati con sonde radioattive complementari.

Come funziona?

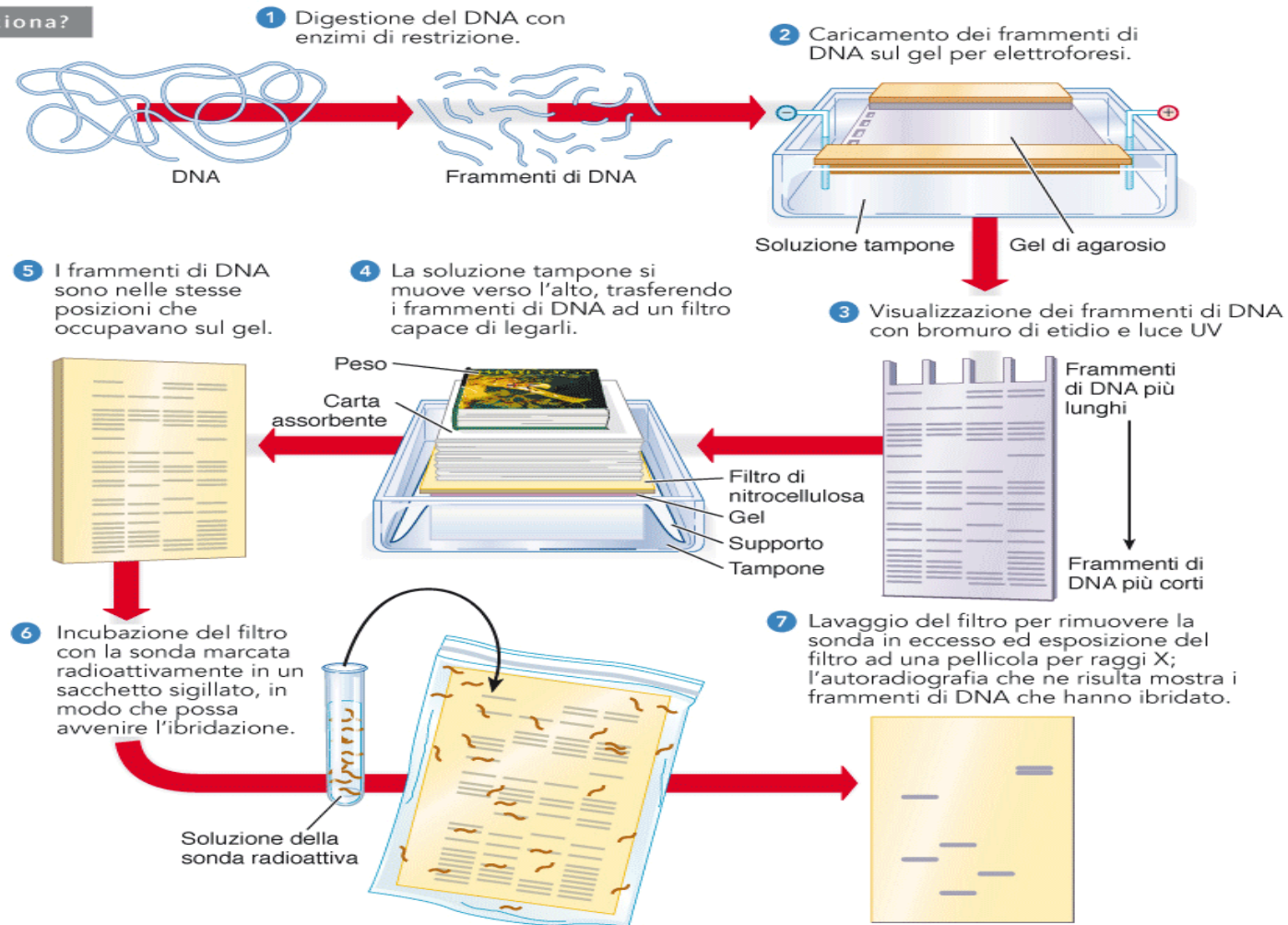
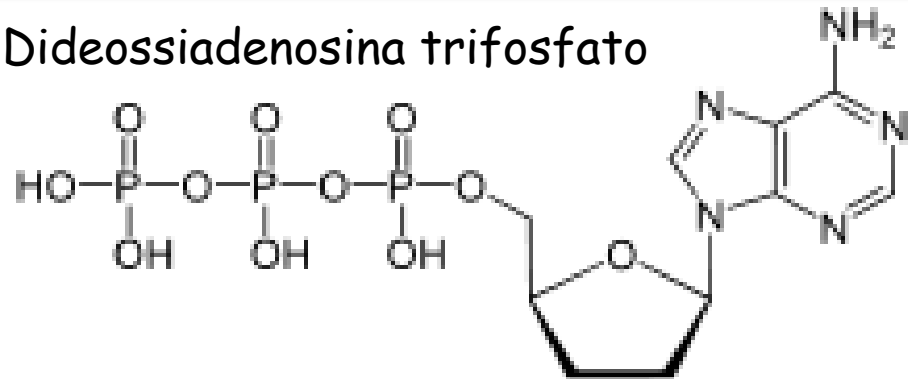


FIGURA 15-9 La tecnica del Southern blotting

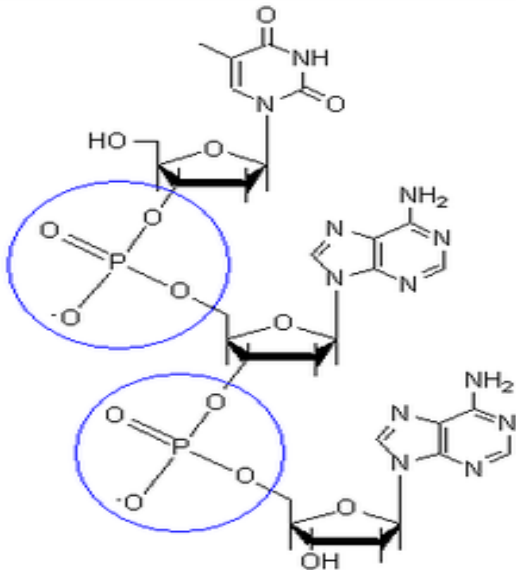
Dideossinucleotide (ddNTP) e deossinucleotide

I **dideossinucleotidi** o **ddNTP**, sono deossiribonucleotidi sintetici che presentano lo zucchero desossiribosio privo del gruppo ossidrilico in posizione 3'.

Dideossiadenosina trifosfato



dNTP deossiribonucleotidi sono i monomeri del DNA



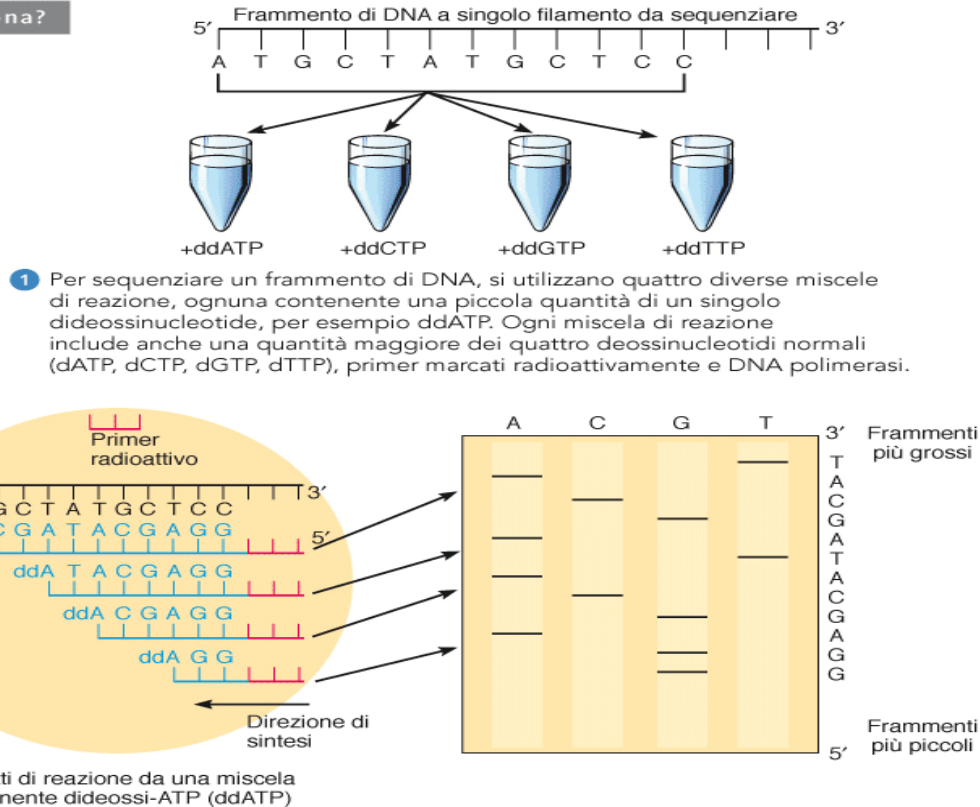
• Sequenziamento del DNA

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Il metodo di terminazione della catena con dideossinucleotidi è un sistema rapido ed efficiente per sequenziare il DNA.

Come funziona?



- 2 L'incorporazione causale del dideoossi-ATP nel filamento in crescita genera una serie di frammenti di DNA più piccoli e tutti terminanti in una qualsiasi delle posizioni in cui avrebbe dovuto collocarsi una adenina nella duplicazione del filamento originario. Queste posizioni corrispondono a quelle che nel filamento stampo contengono timina.

- 3 I prodotti radioattivi di ogni miscela sono separati mediante elettroforesi su gel e localizzati mediante autoradiografia. La sequenza dei nucleotidi del frammento di DNA neo-sintetizzato viene così letta direttamente dal film fotografico (5'→ 3'). La sequenza del filamento stampo è la sua complementare (3'→ 5').

- 4 Una lastra fotografica di un gel di sequenziamento. Le quattro corsie rappresentano rispettivamente le miscele di reazione contenenti i quattro diversi dideossinucleotidi di A, C, G e T.



Courtesy of E. Saito, New England Biolabs

FIGURA 15-10 Il metodo di sequenziamento del DNA basato sulla terminazione del filamento con dideossinucleotidi

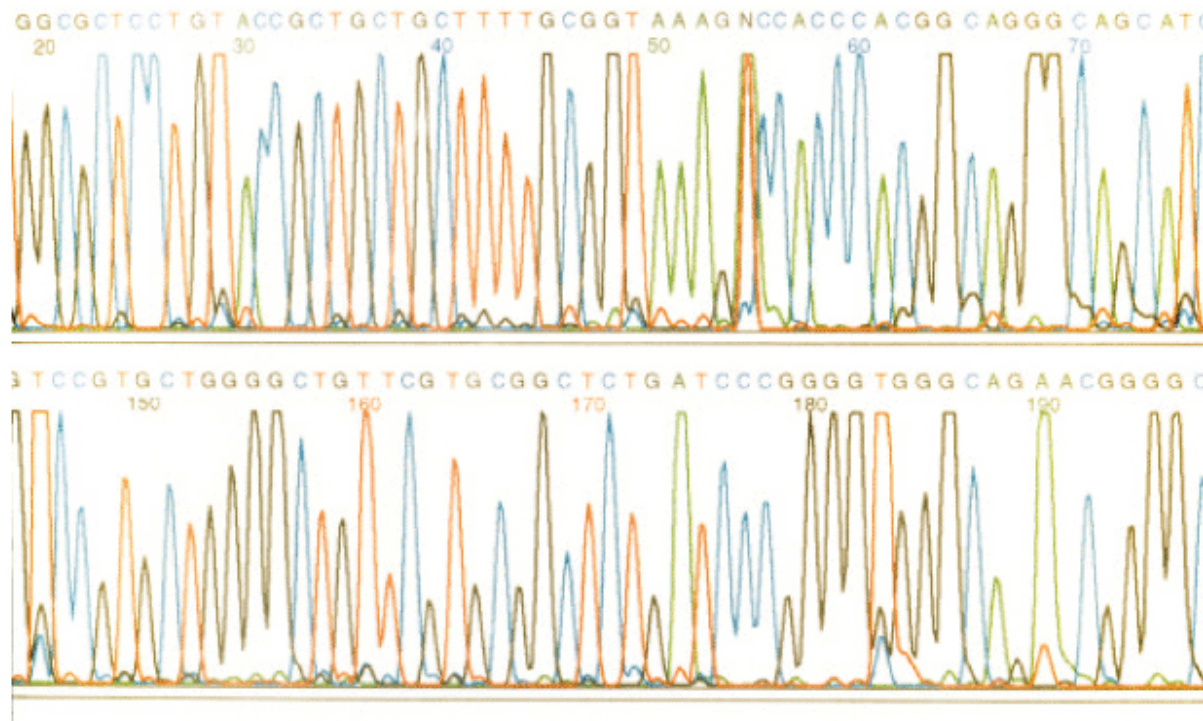


FIGURA 15-11 Un piccolo segmento dell'elettroferogramma con i risultati di un sequenziamento automatizzato del DNA

Il computer produce la serie di picchi illustrata, mediante la lettura delle bande fluorescenti sul gel. La base adenina è colorata in verde, la guanina in nero, la citosina in blu e la timina in rosso. La sequenza precisa del DNA, decifrata dal computer, appare al margine superiore della stampa.

• DNA microarray

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Il DNA microarray è una metodica che rivela i livelli di espressione genica di centinaia o addirittura migliaia di geni specifici in diversi tipi di cellule. Questa tecnica aiuta gli scienziati a comprendere quali geni sono attivi (o inattivi) ad esempio in cellule trattate con un farmaco specifico rispetto a cellule non trattate, di controllo.

Come funziona?

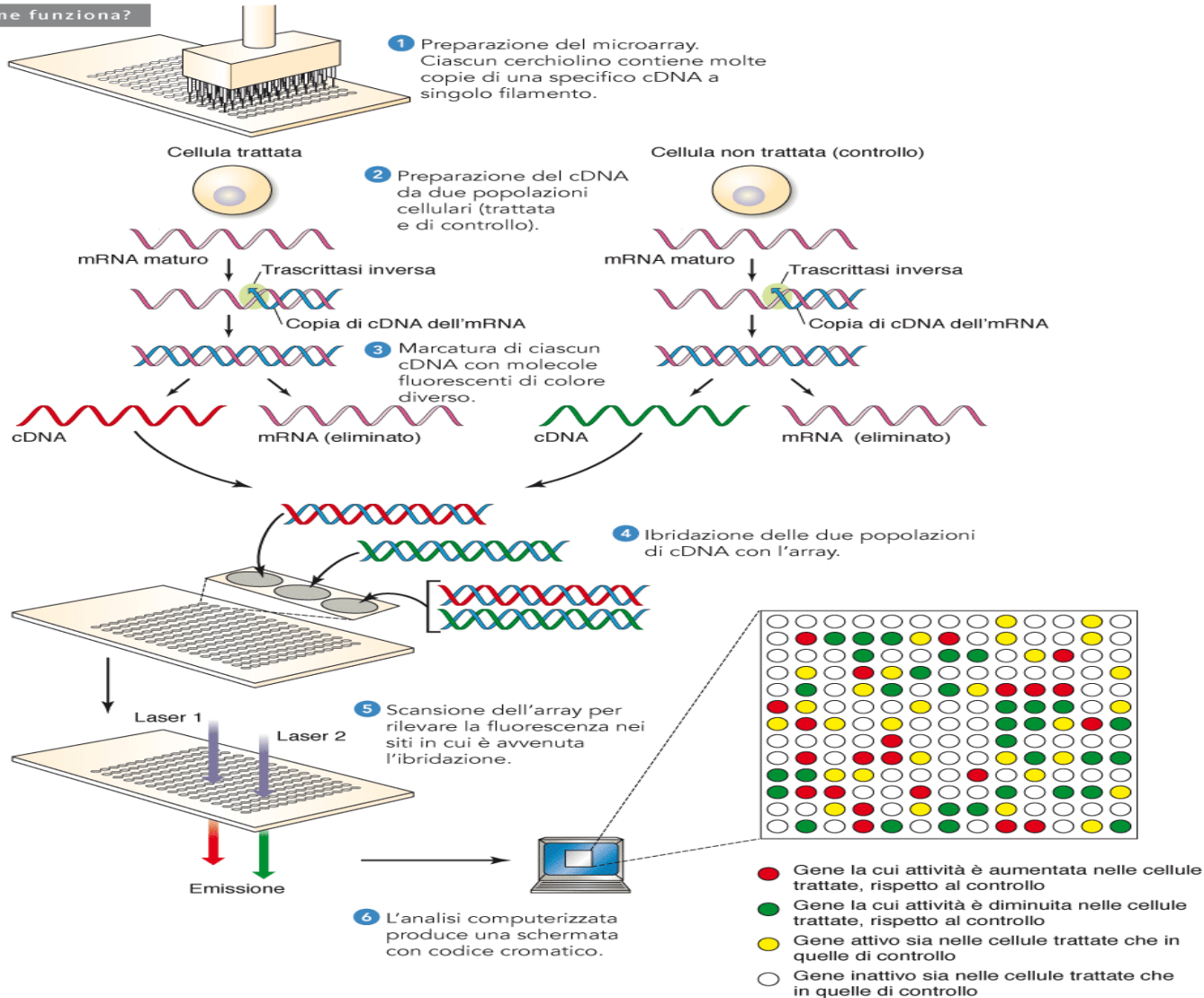


FIGURA 15-12 Un'analisi di DNA microarray

