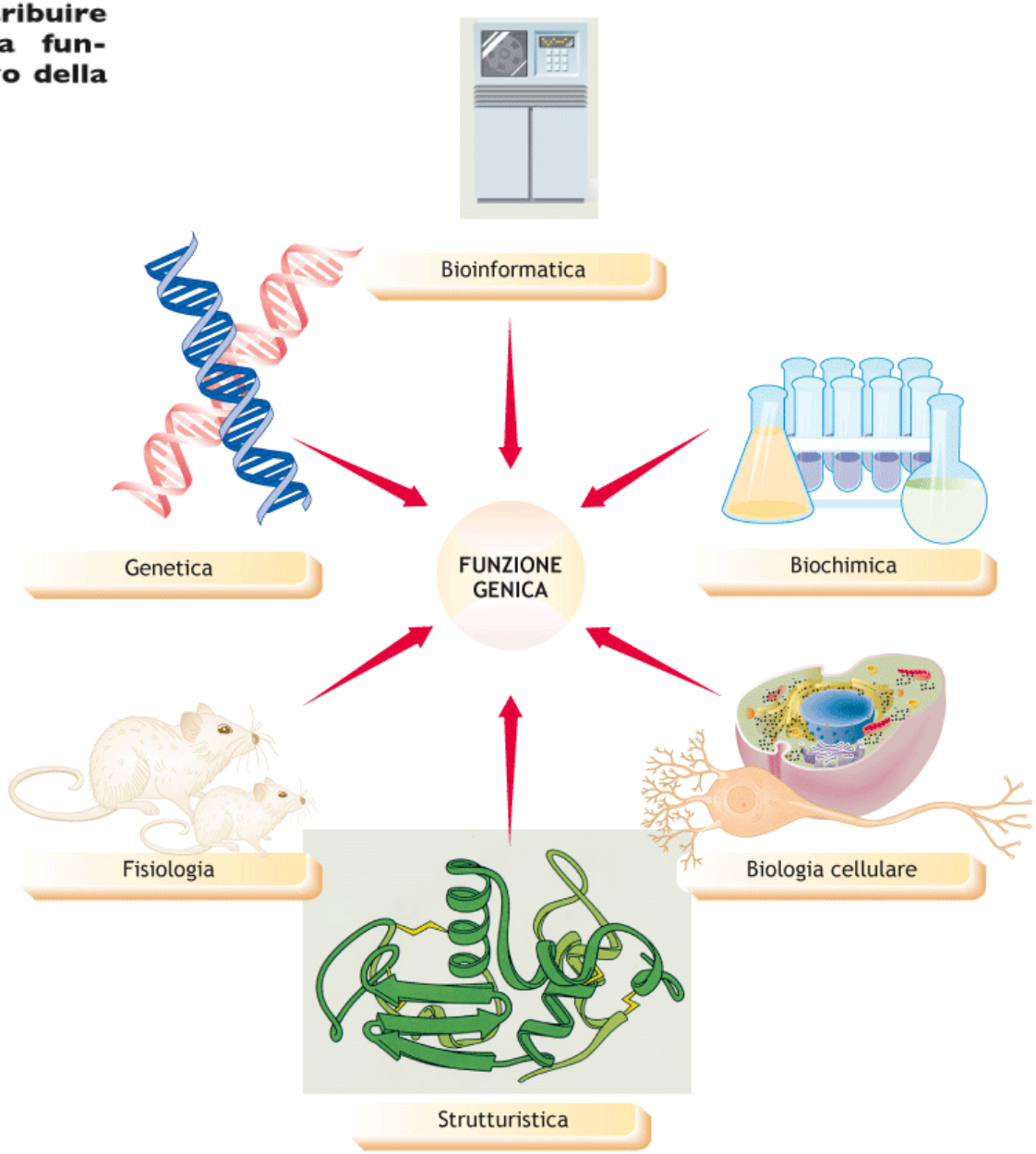
Seminario

Tecnologia del DNA e la genomica

Biologia Applicata a.a 2019-2020
Università di Ferrara

Dott.ssa Ilaria Bononi

Figura I.14.19.1 Tecniche diverse possono contribuire alla definizione della funzione genica, obiettivo della genomica funzionale.



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

Alcune Tecnologie del DNA

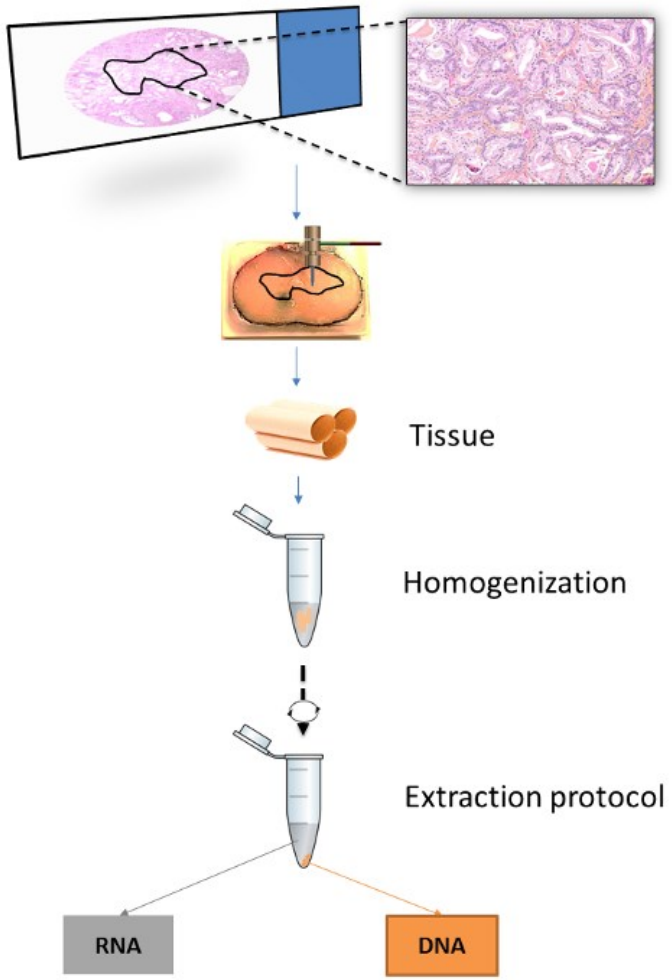
- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Estrazione acidi nucleici

La separazione degli acidi nucleici dagli altri componenti cellulari e tissutalipuò essere effettuato mediante estrazioned ella fase acquosa con una miscela d fenolo-cloroformio. Il pH del Fenolo influenza l'isolamento dei 2 diversi acidi nucleici

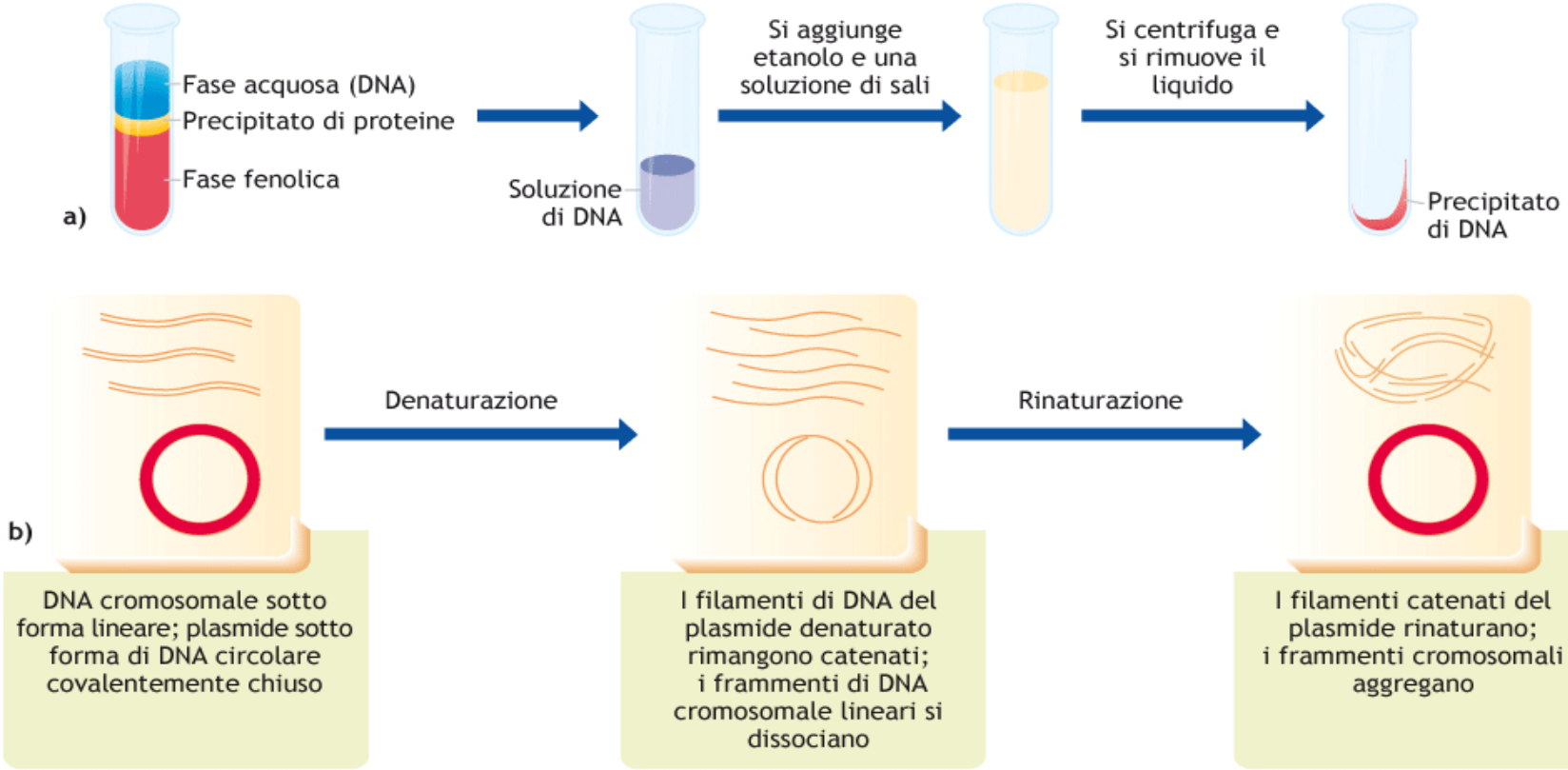


pH 4,5

pH 8

Estrazione del DNA

Figura I.14.1.1 **(a) Fasi della purificazione del DNA da cellule di mammifero.** Le cellule sono lisate mediante trattamento con agenti detergenti (SDS) e la miscela dei componenti cellulari così ottenuti viene trattata con fenolo/cloroformio. Dopo centrifugazione si ottiene la separazione della fase acquosa, contenente il DNA, dalla fase organica; le proteine denaturate rimangono all'interfase. Il DNA viene precipitato dalla fase acquosa in presenza di sali e alcol. Il DNA precipitato è raccolto per centrifugazione e ridisciolto. **(b) Il metodo della lisi alcalina per la purificazione di DNA plasmidico da cellule batteriche.**

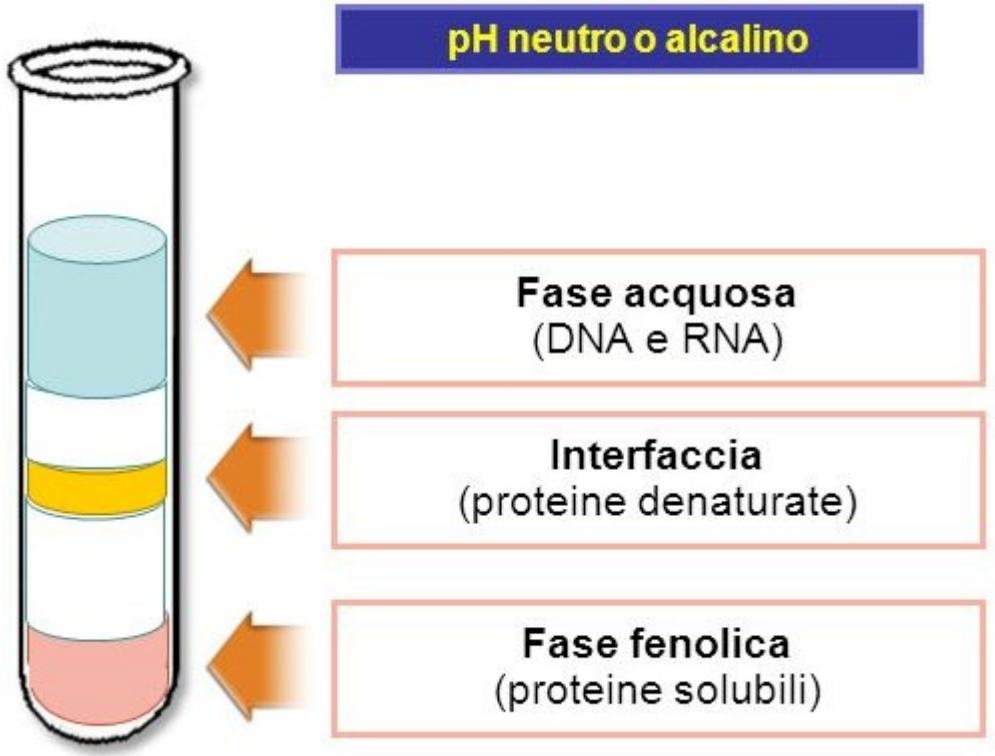


Estrazione del DNA genomico da cellule eucariotiche

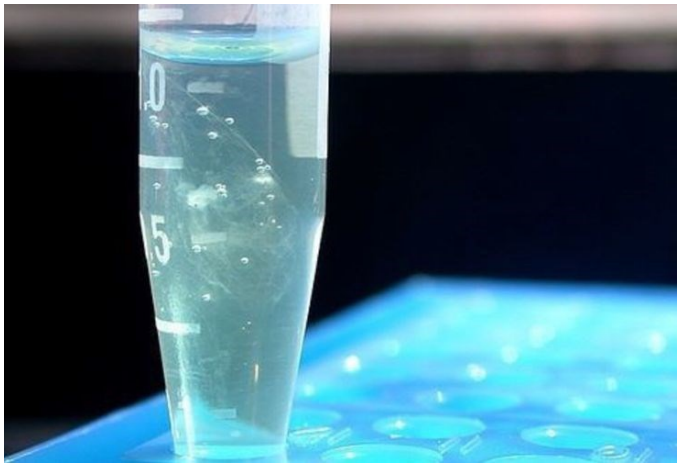
- Le membrane sono lisate con detergenti come SDS
- Si ottiene una miscela di: DNA, RNA, proteine, lipidi e carboidrati
- Separare il DNA dagli altri componenti
- Estrazione della fase acquosa con fenolo-cloroformio
  - Queste 2 sostanze organiche hanno una scarsa capacità di miscelarsi con soluzioni acquose:
    - aggiunte a un estratto cellulare
    - Vortex
    - Centrifuga
    - Si separano 2 fasi:

- Fase acquosa: contiene DNA e residui di RNA
- Fase intermedia: contine le proteine (denaturate)
- Fase organica: contiene i lipidi

Estrazione del DNA genomico da cellule eucariotiche



Estrazione del DNA genomico da cellule eucariotiche



•Scopo: ottenere una soluzione acquosa di acido nucleico il più pura possibile

•Precipitazione con isopropanolo

•Si forma un precipitato che può essere raccolto sul fondo della provetta grazie a centrifugazione

•Risospensione in soluzione acquosa

Estrazione del DNA plasmidico

DNA plasmidico: sotto forma di DNA circolare covalentemente chiuso	Passaggi	DNA batterico: DNA cromosomale sotto forma lineare
	Metodo della lisi alcalina: SDS e NaOH	
	SDS solubilizza proteine e fosfolipidi provocando la lisi	
I filamenti di DNA del plsmide denaturato rimangono catenati	NAOH denatura il DNA cromosomale, plasmidico e le proteine	I frammenti di DNA cromosomale lineari si dissociano
	RNAsi degrada l'RNA	
Mantenuto covalente mente chiuso può rinaturare in modo corretto e rimanere in soluzione I fasrmmenti catenati del palsmid nrianturano	Neutralizzazione con KAc: l'elevata conc di sale provoca la precipitazione di SDS+ proteine denaturate + debrii + DNA genomico	I frammenti di DNA cromosomali aggregano
Rimane nel surnatante	Centrifugazione	Precipita nel pellet insieme a tutti gli altri contaminanti
Il DNA plasmidico si lega alla resina	Passaggio in colonnina con matrice a scambio ionico	I frammenti che restano non sono trattenuti dalla resina
Il DNA plasmidico si stacca dalla alla resina e viene raccolto in soluzione	Eluizione dalla resina con un tampone ad altra conc salina	

Estrazione del DNA mediante kits

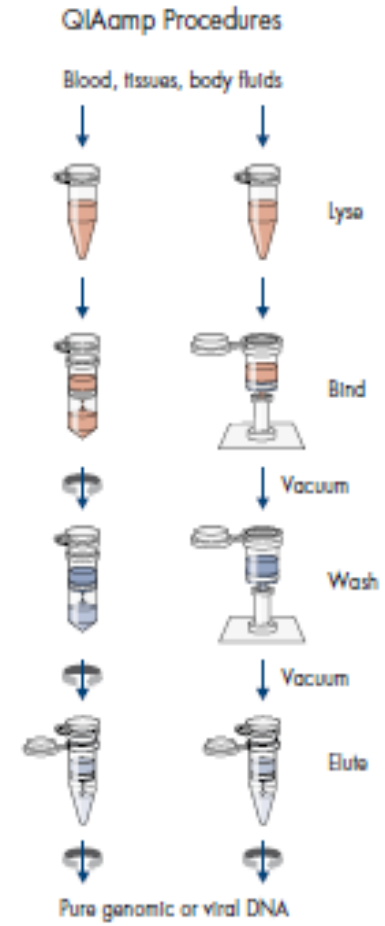


Figure 3. Fully automated nucleic acid purification using QIAamp genomic DNA kits. The QIAcube enables walkaway automation of many QIAGEN spin-column procedures. Visit **www.qiagen.com/MyQIAcube** for more information.

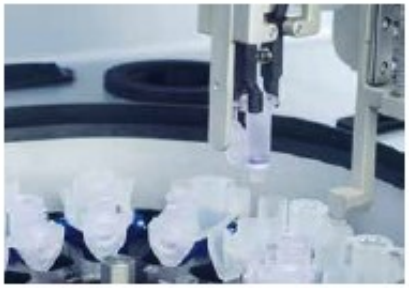
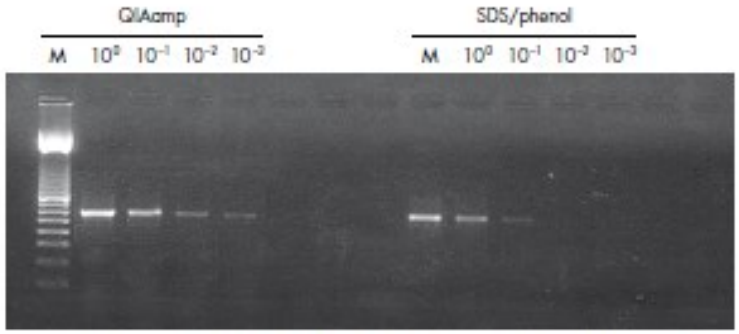
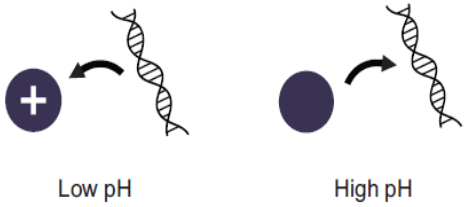
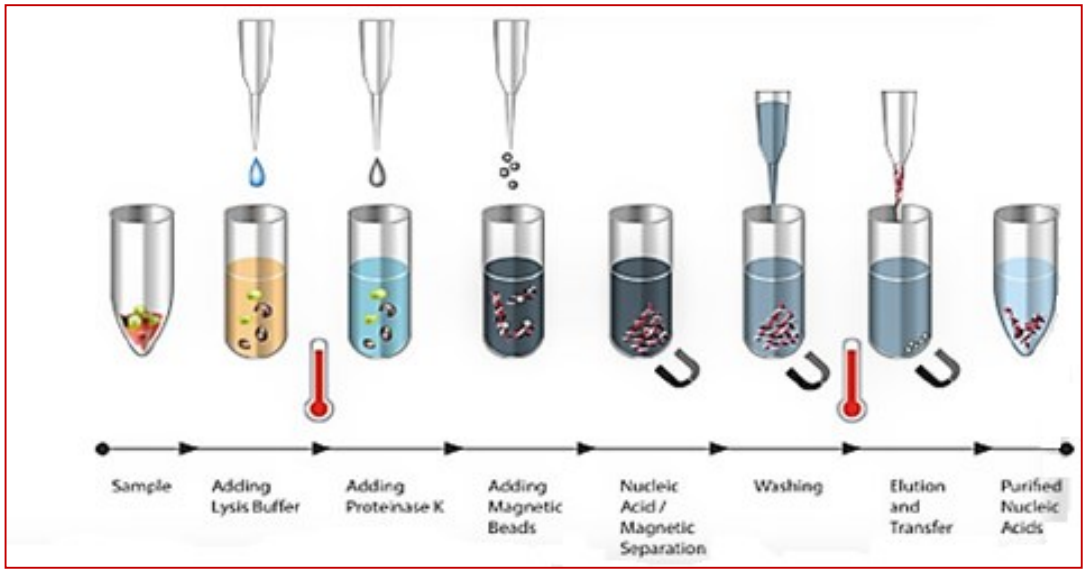


Figure 5. Freedom from laborious manual tasks. The QIAcube is equipped with an automated centrifuge and pipetting system. No manual handling steps are required during the QIAcube run.



Estrazione di DNA da siero





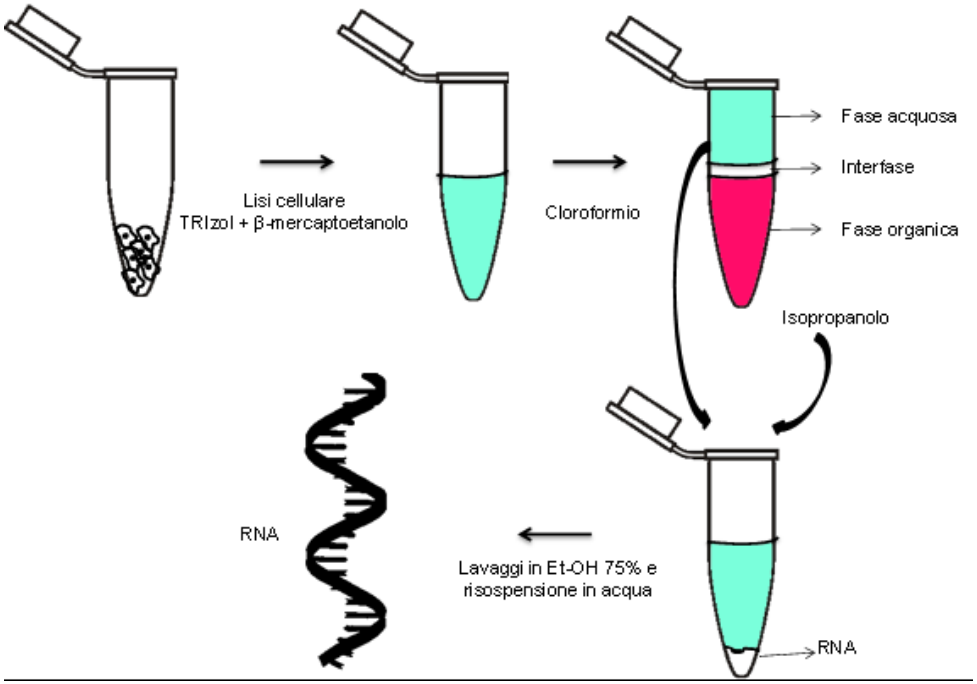
Range di concentrazione ottenute al Nanodrop:**1-50 ng/µl**

Estrazione del RNA

- RNA: più sensibile del DNA all'attacco da parte di endonucleasi
- Durante la lisi del campione biologico devono essere intattivate tutte le RNAsi endogene
- Campione fresoc
- Lisi con isotiocianato di guanidina o fenolo: con alto potere denaturante delle proteine

- Strumenti privi di RNAsi

- Trattamento con DNAsi per evitare contamianzioni da DNA genomico



Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Taglio del DNA con enzimi di restrizione

Microrganismo	Abbreviazione	Sequenza 5′ → 3′ / 3′ → 5′
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	G↓G A T C C C C T A G↑G
Brevibacterium albidum	Bal I	T G G↓C C A A C C↑G G T
Escherichia coli RY13	Eco RI	G↓A A T T C C T T A A↑G
Haemophilus aegyptius	Hae II	Pu G C G C↓Py Py↑C G C G Pu
Haemophilus aegyptius	Hae III	G G↓C C C C↑G G
Haemophilus haemolyticus	Hha I	G C G↓C C↑G C G
Haemophilus influenzae R_d	Hin d II	G T Py↓Pu A C C A Pu↑Py T G
Haemophilus influenzae R_d	Hin d III	A↓A G C T T T T C G A↑A
Haemophilus parainfluenzae	Hpa I	G T T↓A A C C A A↑T T G
Haemophilus parainfluenzae	Hpa II	C↓C G G G G C↑C
Providentia stuartii 164	Pst I	C T G C A↓G G↑A C G T C
Streptomyces albus G	Sal I	G↓T C G A C C A G C T↑G
Xanthomonas oryzae	Xor II	C G A T C↓G G↑C T A G C

Taglio del DNA con enzimi di restrizione

Enzyme	Recognition site	Type of cut end
*Eco*RI	G↓A—A—T—T—C C—T—T—A—A↑G	5′-phosphate extension
*Bam*HI	G↓G—A—T—C—C C—C—T—A—G↑G	5′-phosphate extension
*Pst*I	C—T—G—C—A↓G G↑A- —T—C	3′-hydroxyl extension
*Sau*3AI	↓G—A—T—C C—T—A—G↑	5′-phosphate extension
*Pvu*II	C—A—G↓C—T—G G—T—C↑G—A—C	Blunt end
*Hpa*I	G—T—T↓A—A—C C—A—A↑T—T—G	Blunt end
*Hae*III	G—G↓C—C C—C↑G—G	Blunt end
*Not*I	G↓C—G—G—C—C—G—C C—G—C—C—G—G—C↑G	5′-phosphate extension

Taglio del DNA con enzimi di restrizione

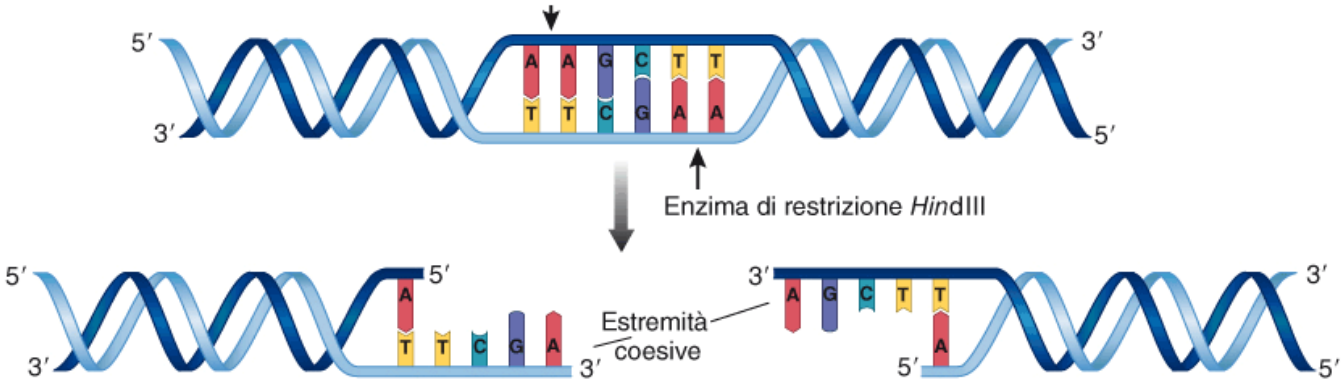
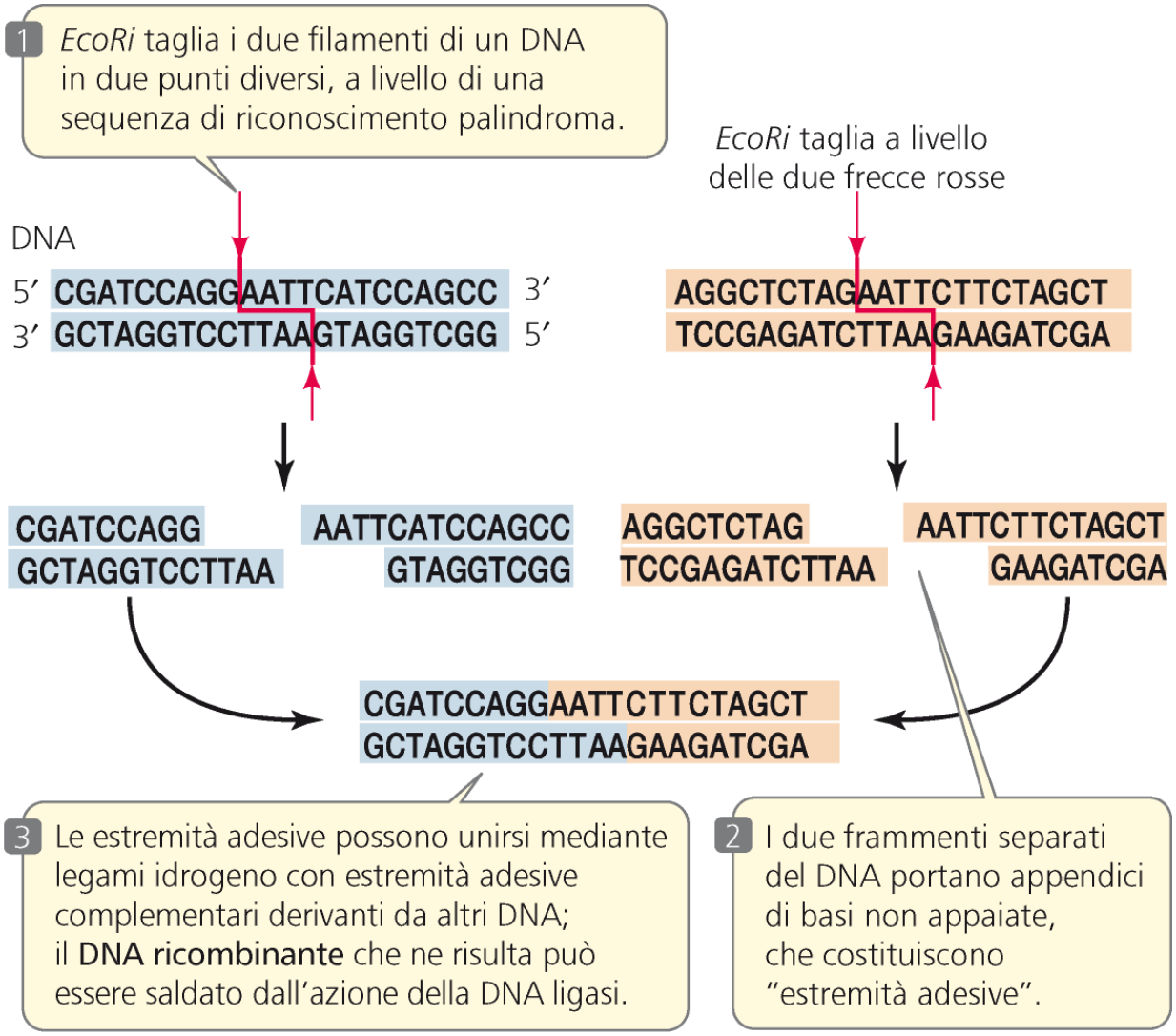


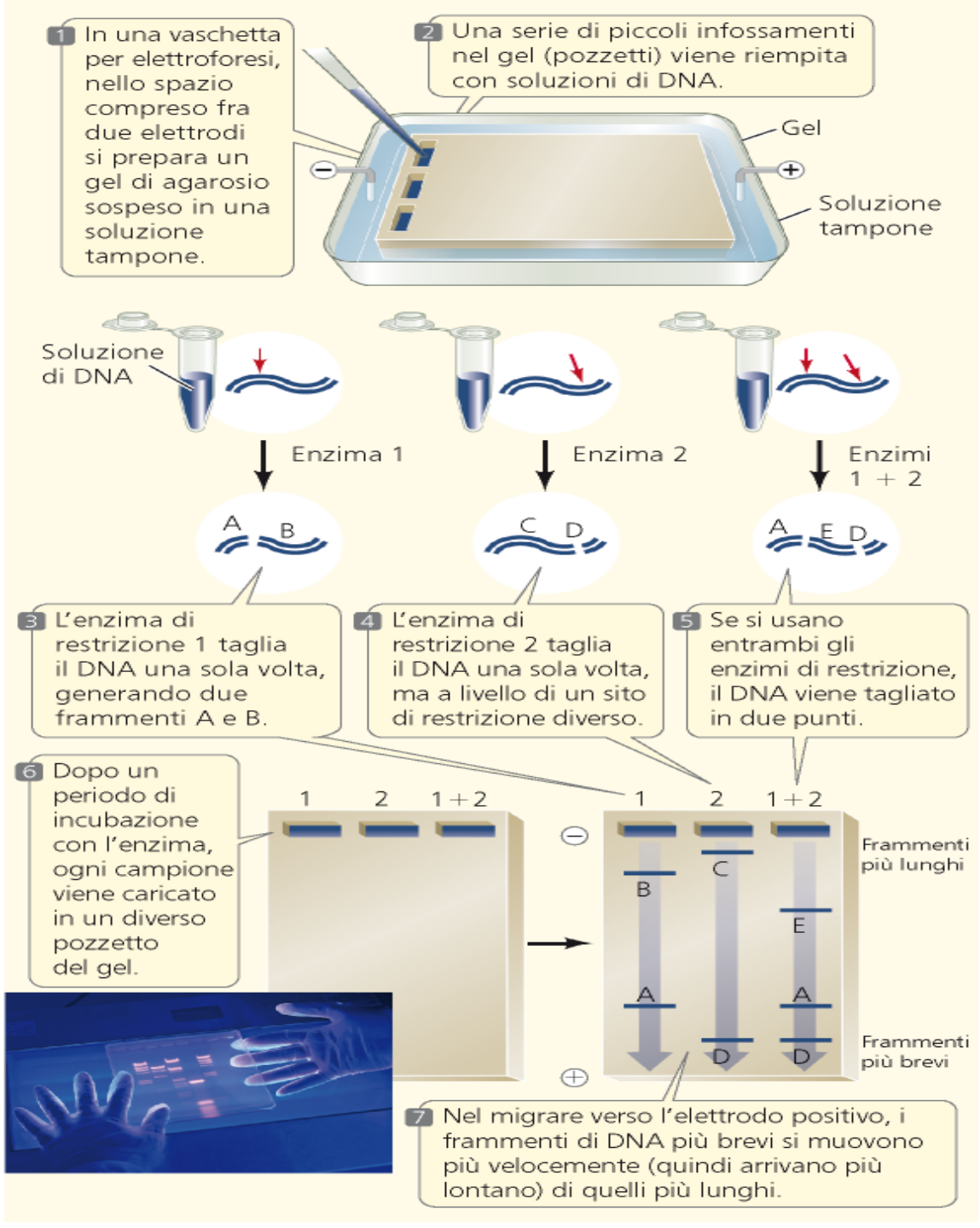
Figura 15-1
Taglio del DNA con un enzima di restrizione

Molti enzimi di restrizione, come *Hin*dIII, 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.

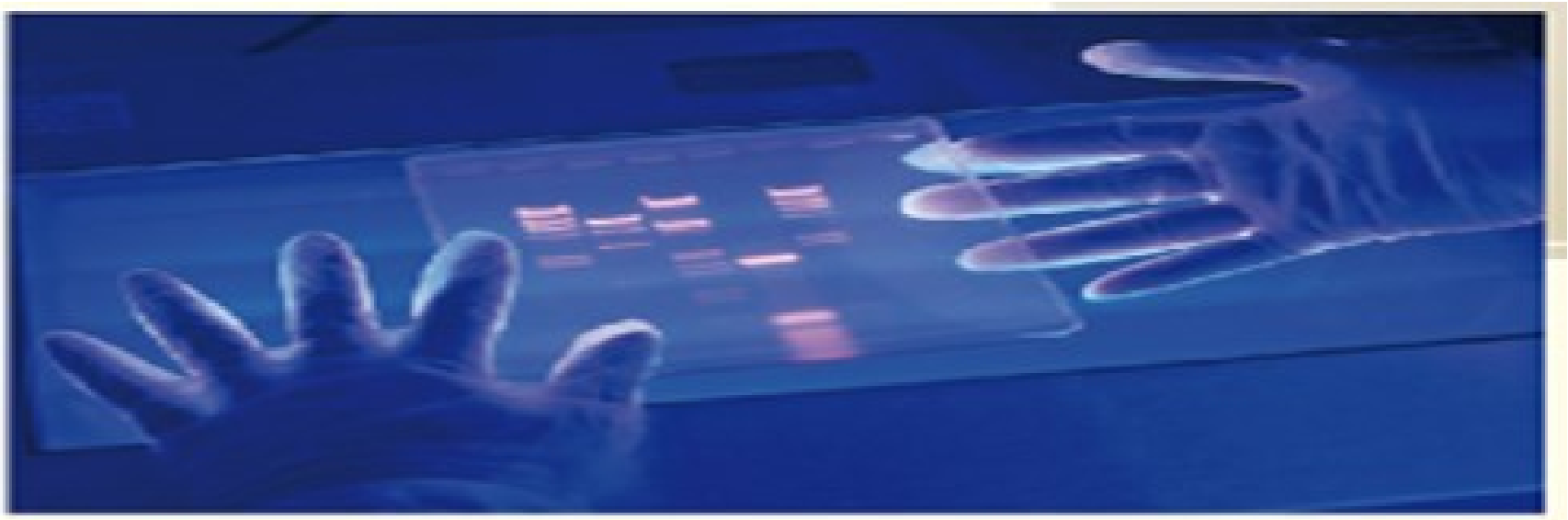
Taglio del DNA con enzimi di restrizione



Taglio del DNA con enzimi di restrizione



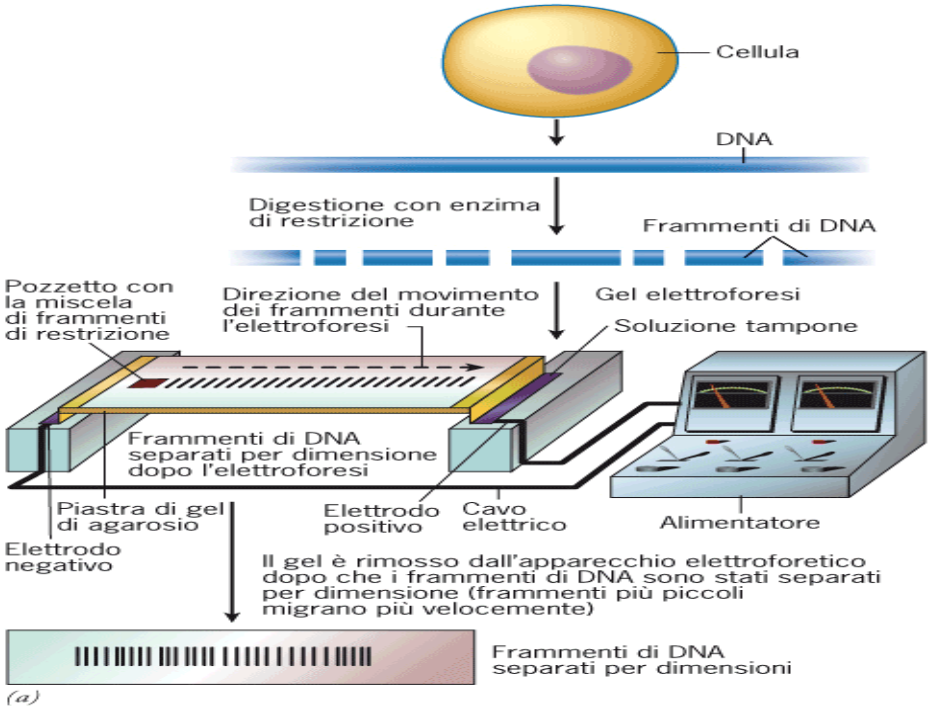
Taglio del DNA
con enzimi di restrizione

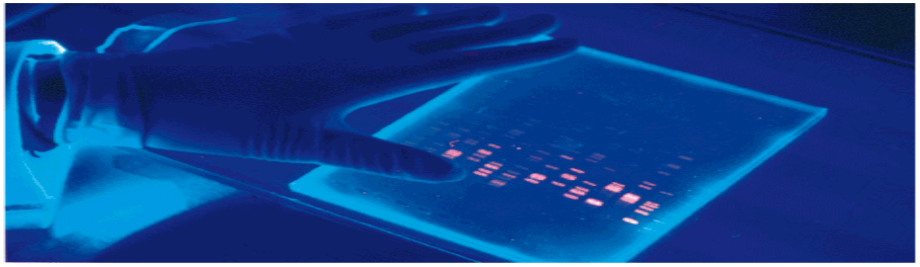


Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Elettroforesi su gel





(b)

Figura 18.34 **Separazione di frammenti di restrizione di DNA con elettroforesi su gel.** (*a*) Il DNA è incubato con un enzima di restrizione, che lo taglia in frammenti. La miscela di frammenti è introdotta in un pozzetto su una lastra di agarosio e viene applicata corrente. Le molecole di DNA cariche negativamente migrano verso l'elettrodo positivo e separate in base alla dimensione. (*b*) Tutti i frammenti di DNA presenti in un gel possono essere rivelati immergendo il gel in una soluzione di bromuro di etidio e osservandolo sotto una luce ultravioletta. (B: PHILLIPE PLAILLY/ SCIENCE PHOTO LIBRARY/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

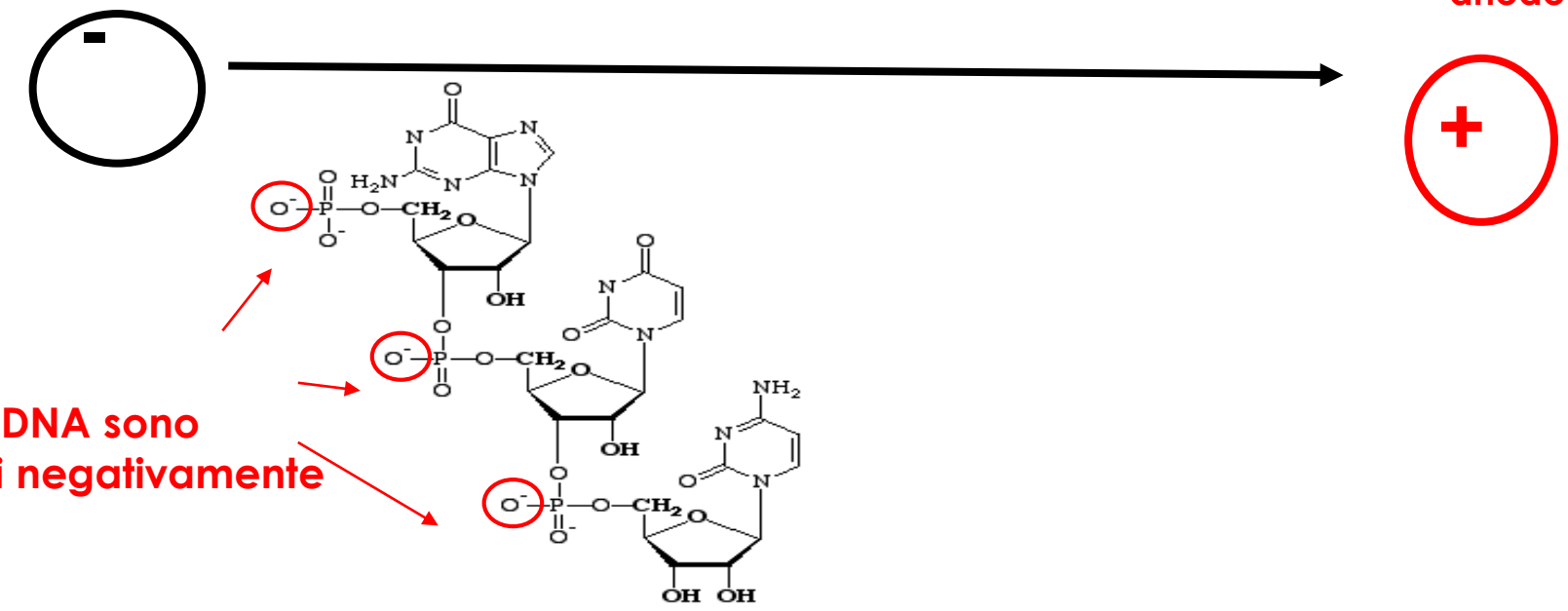
1. SEPARAZIONE DI MACROMOLECOLE IN BASE ALLA LORO CARICA

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



Elettroforesi

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

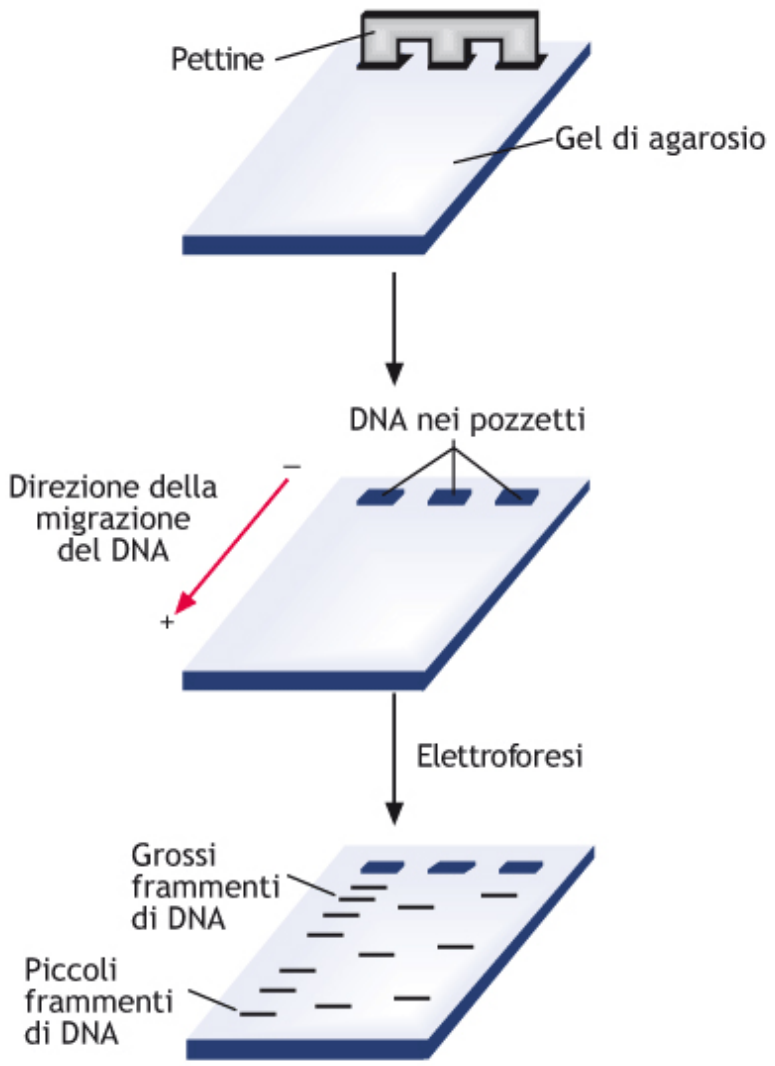


Figura I.14.2.1 Gel elettroforesi in agarosio. L'agarosio disciolto è colato in uno stampo che contiene un pettine. Dopo che il gel si è formato, il pettine è rimosso per creare i pozzetti nei quali saranno caricati i campioni di DNA. Si applica quindi una corrente elettrica per spostare il DNA carico negativamente verso l'elettrodo positivo. Le piccole molecole di DNA generalmente migrano attraverso il gel con una velocità superiore rispetto a quelle più grosse.

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*)

Elettroforesi

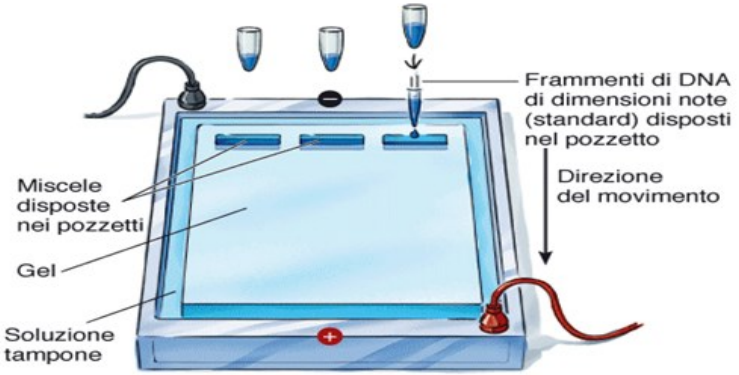
METODO DI RICERCA

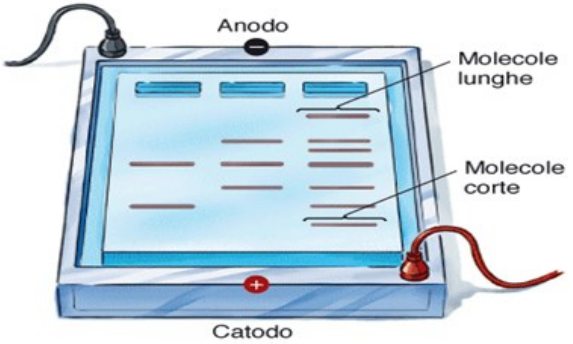
Perché si usa? L'elettroforesi su gel separa molecole, come gli acidi nucleici, sulla base della loro dimensione e carica mentre migrano attraverso un campo elettrico.

Come funziona?

1. Il gel è preparato versando una soluzione di agorosio 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 pozzeti 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.

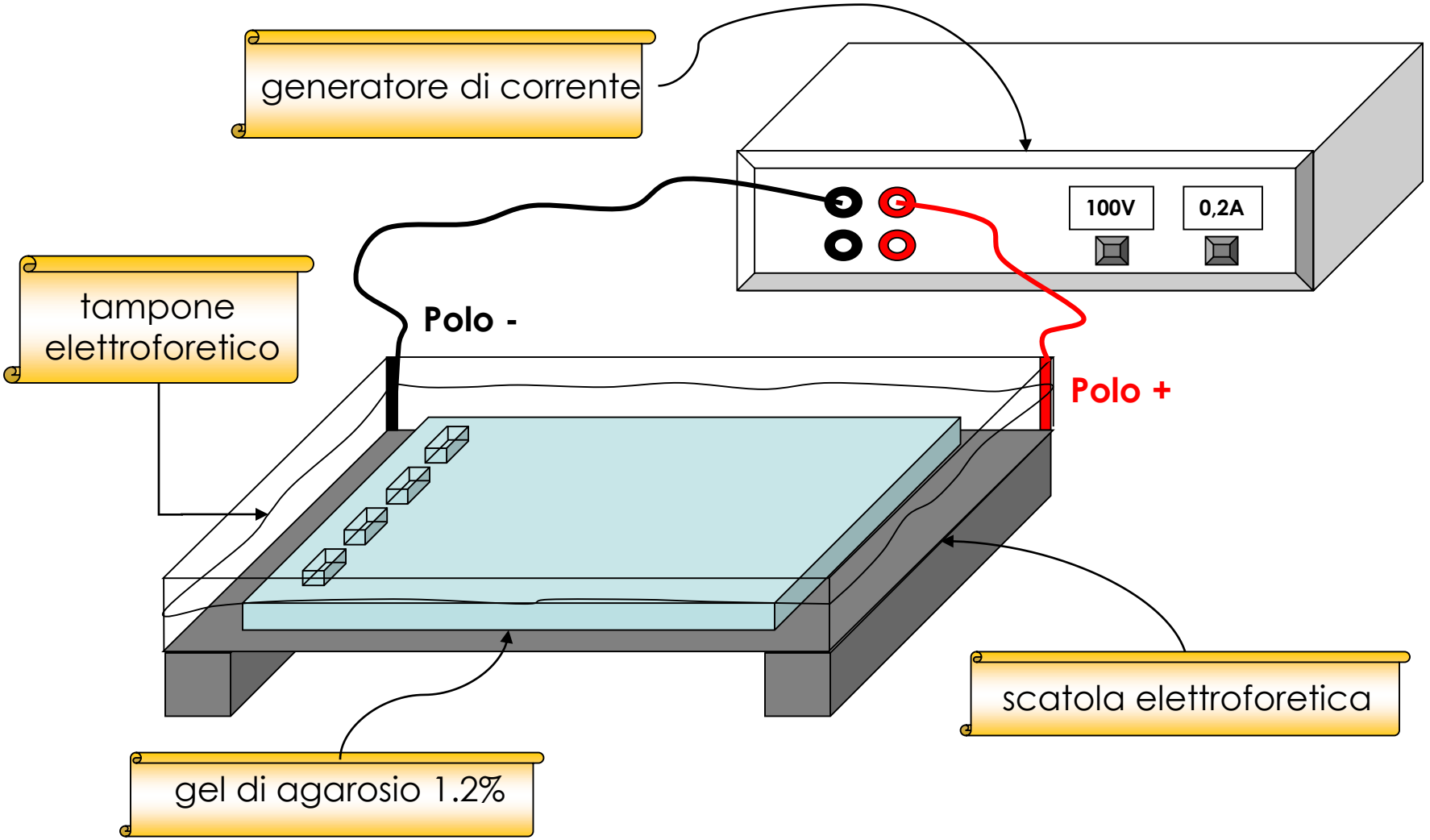




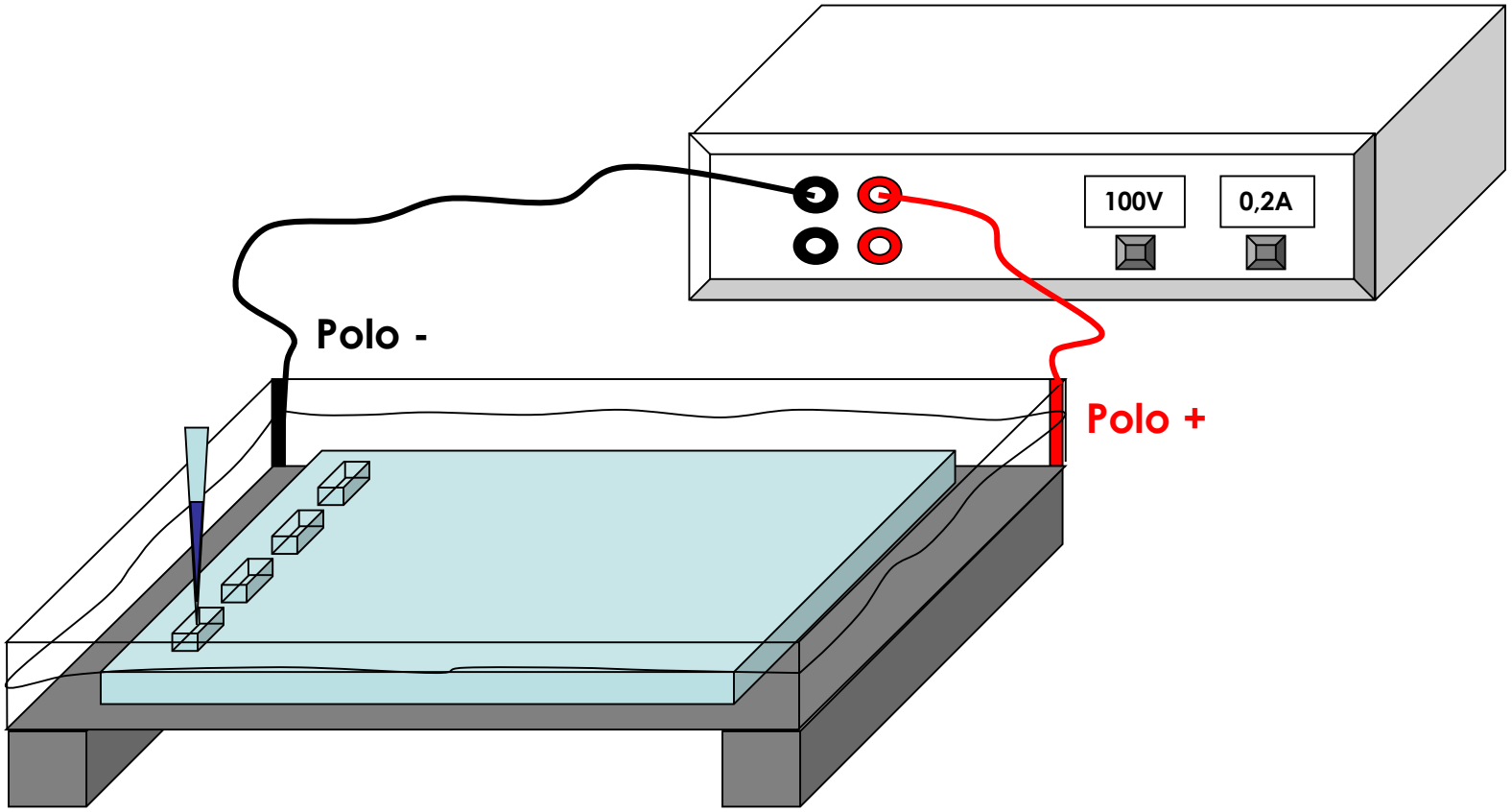
3. Questo gel contiene frammenti di DNA separati per elettroforesi. Il gel è colorato con bromuro di etidio, un colorante che lega il DNA ed è fluorescente quando esposto a luce UV.

FIGURA 15-8 L'elettroforesi su gel

SCHEMA APPARATO PER ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

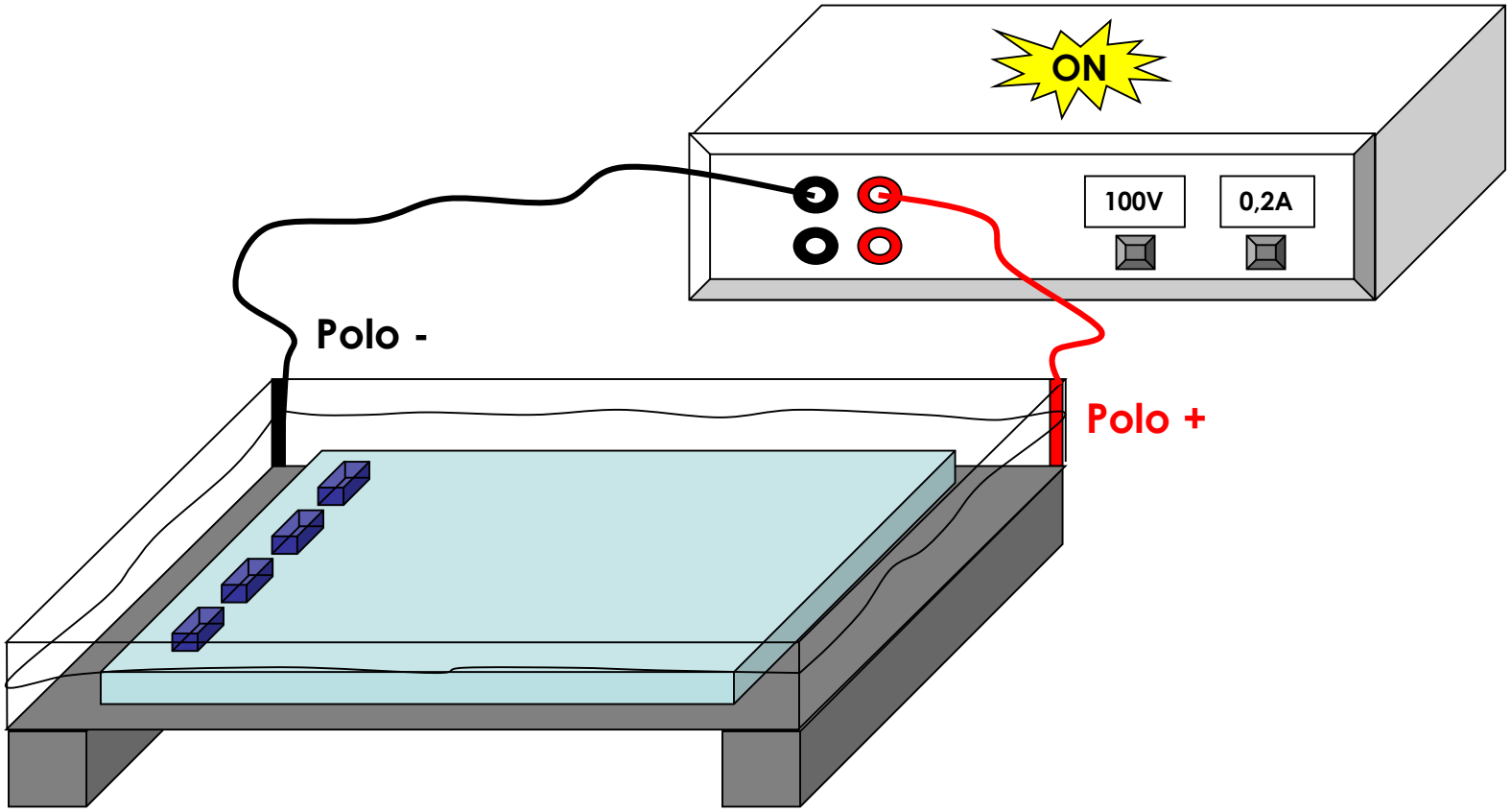


ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



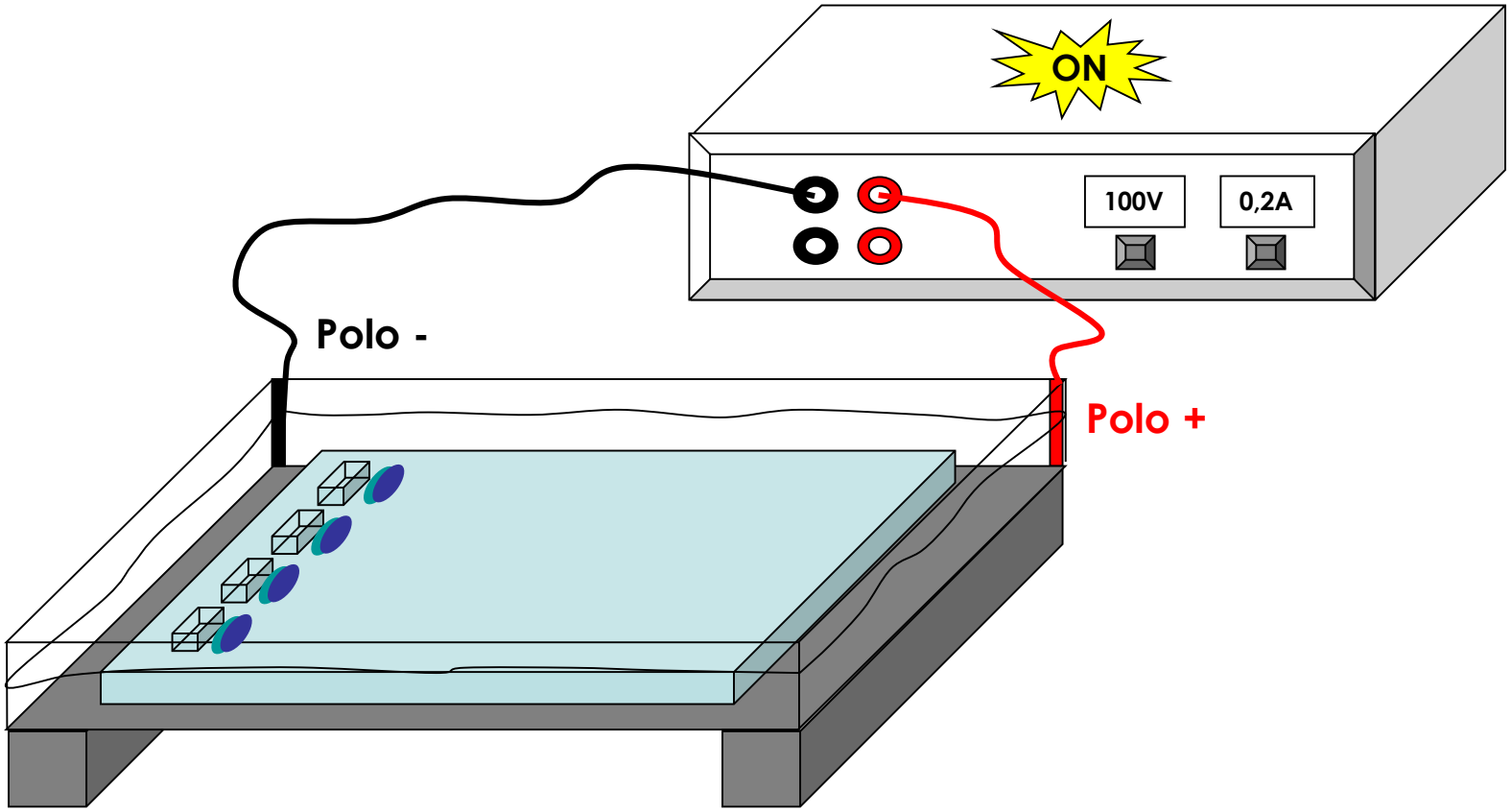
Loading dye **aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, Blu di bromofenolo e Blu di xilencianolo che migrano nel gel a velocità diversa.**

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.**

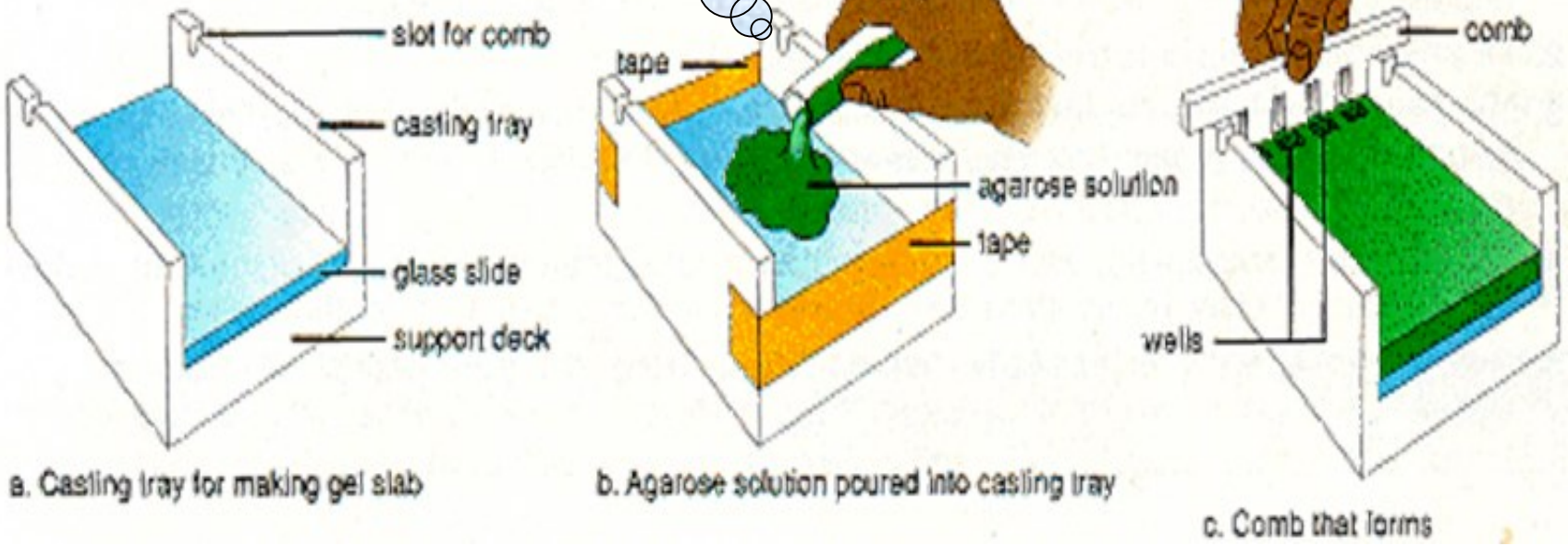
METODO: FORMAZIONE DEL GEL DI AGAROSIO

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 intercalnate FLUORESCENTE

3. Si versa l'agarosio sciolto nella vaschetta elettroforetica

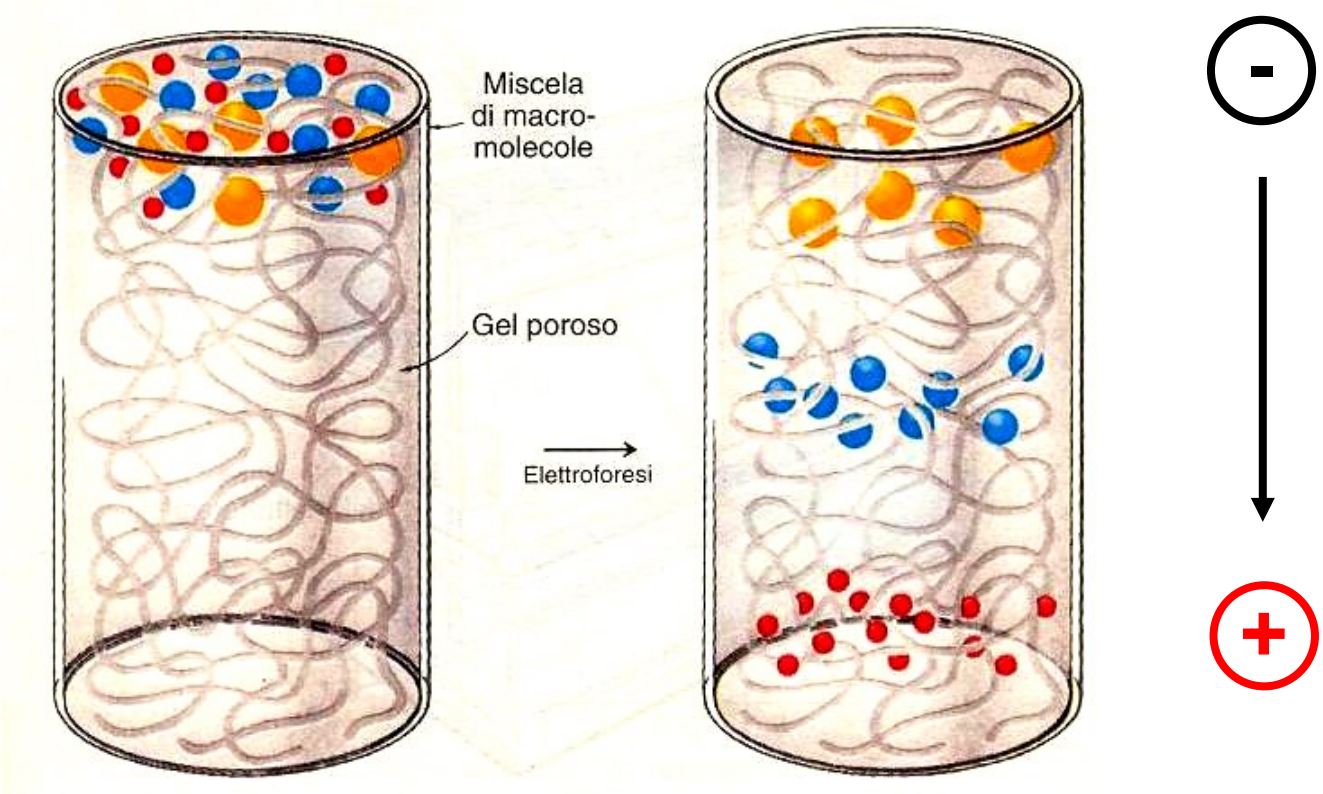
4. Quando il gel è gelificato, Si levano "i pettini "



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 (poliacrillamide , agarosio)



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!!!

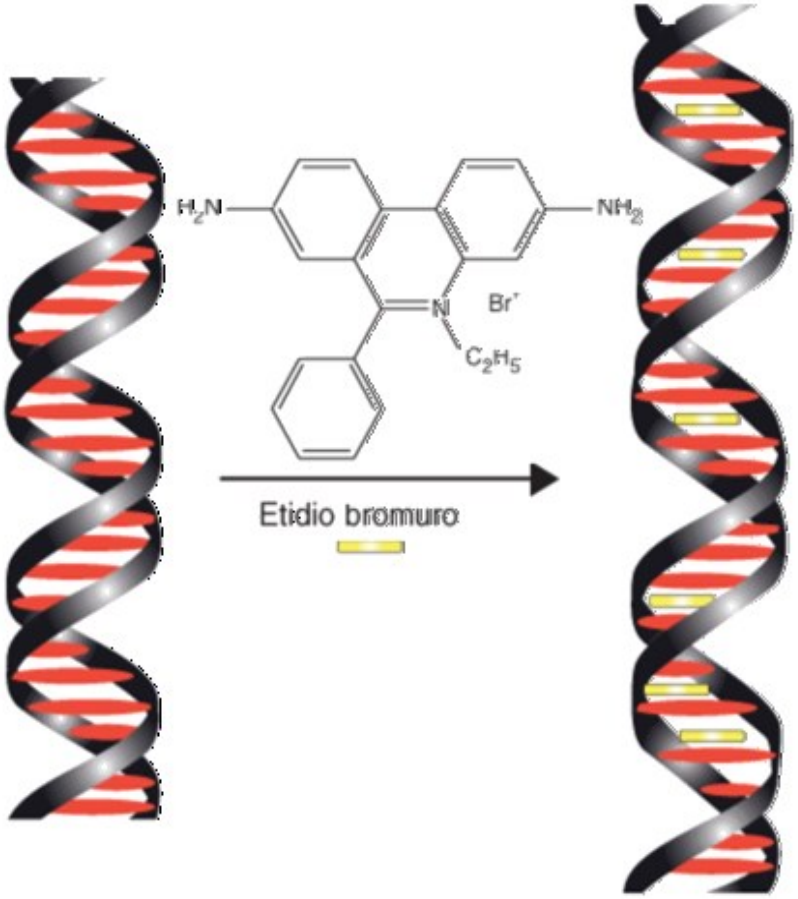
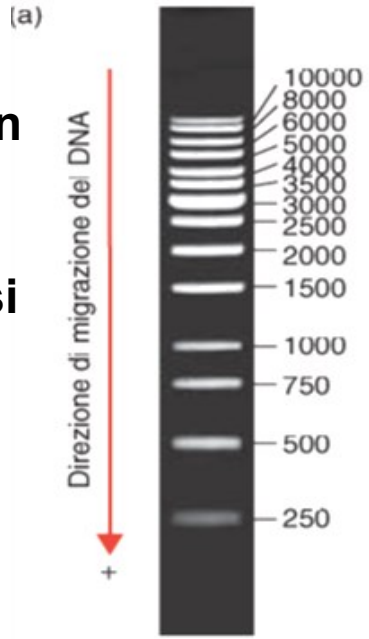


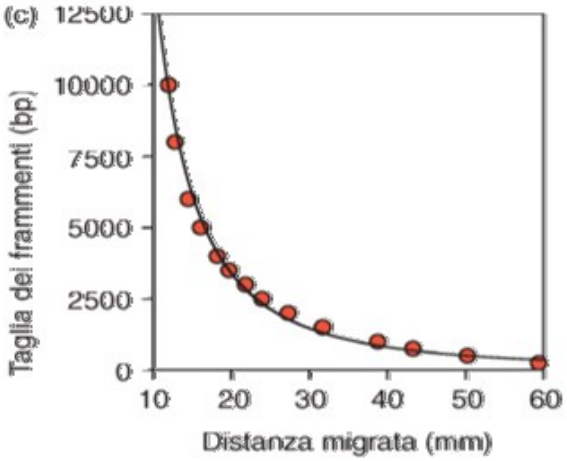
Figura 2.12. Il legame dell'etidio bromuro al DNA. L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il legame distorce la doppia elica ed aumenta la sua lunghezza. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato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

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



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

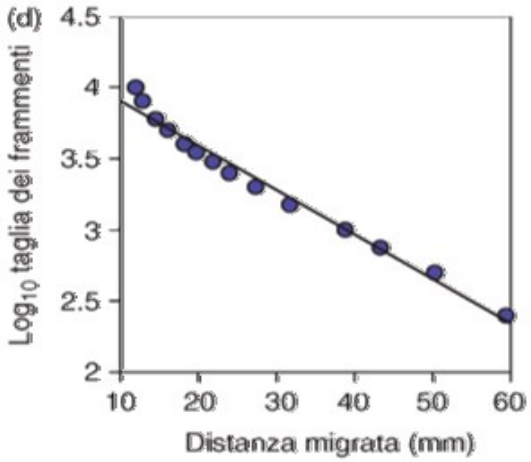
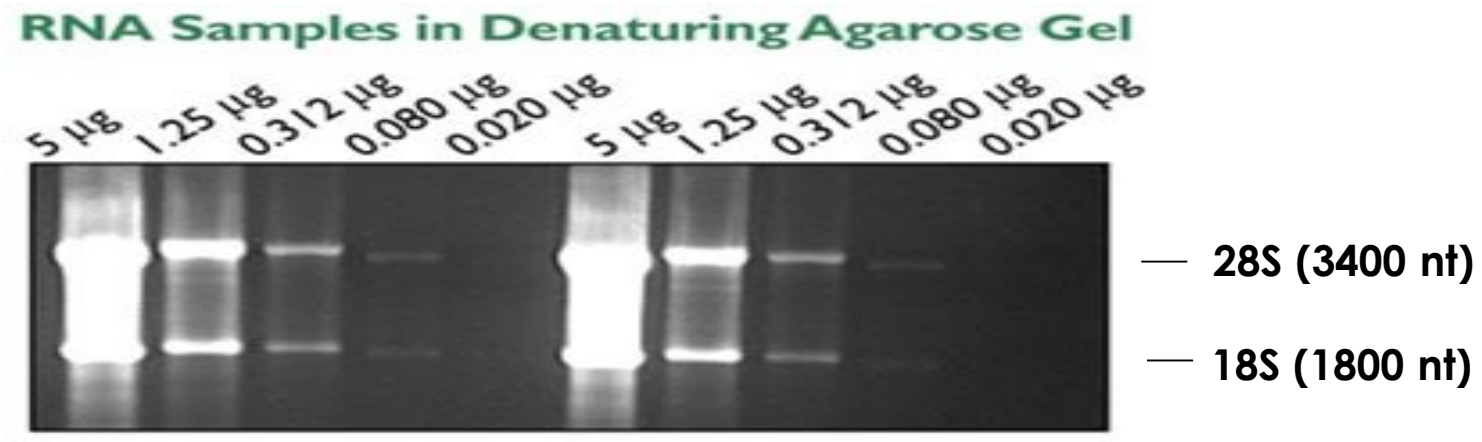


Figura 2.13. Migrazione dei frammenti di DNA attraverso un gel di agarosio. (a) Un gel di agarosio che mostra la separazione di frammenti di DNA a dimensione nota. (b) La dimensione di un frammento di DNA e la sua distanza di migrazione nel gel. (c) Grafico della relazione tra la dimensione dei frammenti e la distanza di migrazione costruito con in 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.

Separazione in gel d'agarosio di molecole di RNA in condizioni <u>denaturanti</u>



Per ottenere una buona separazione dei pesi molecolari durante la corsa nel gel, l'RNA deve essere **<u>denaturato</u>**, 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**.

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*)**

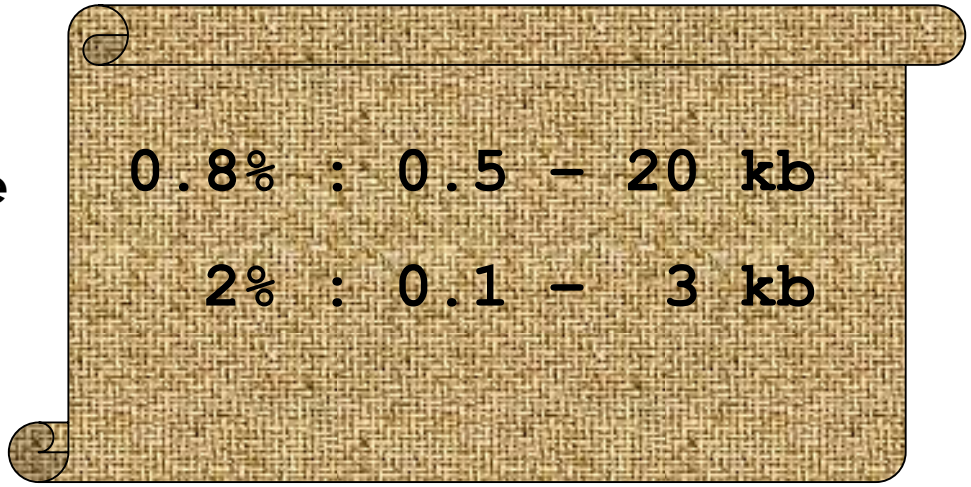
* La gel elettroforesi analitica analizza la composizione , qualità, quantità di un campione di acido nucleico

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

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

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

Concentrazione di agarosio



Risoluzione

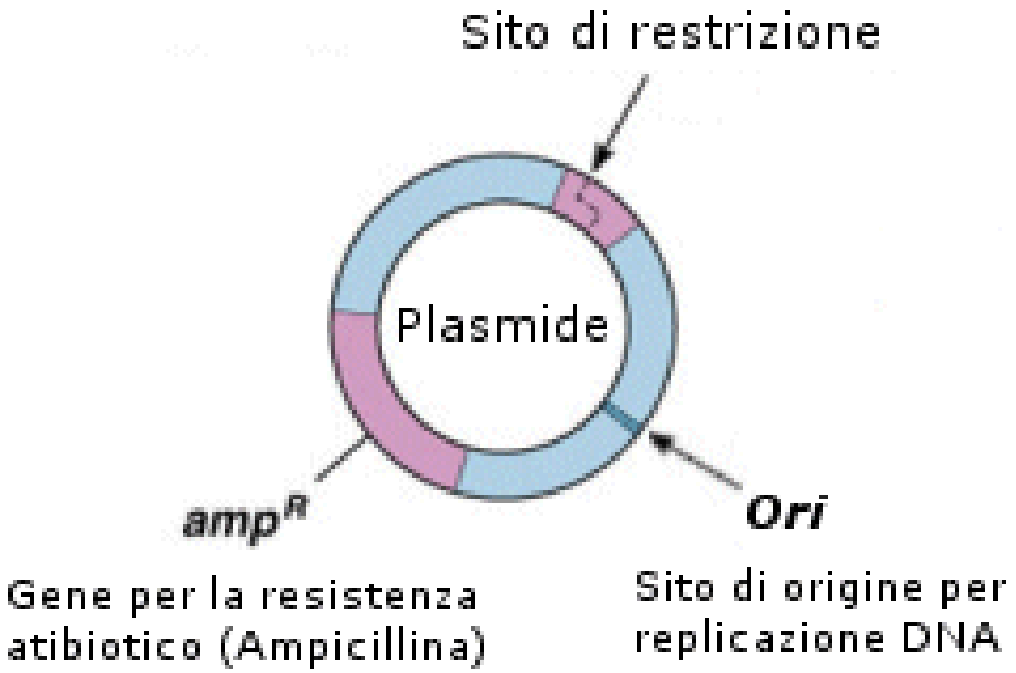
Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Generazione del DNA ricombinante

Generazione del DNA ricombinante
Plasmide

polylinker



Generazione del DNA ricombinante
Plasmide

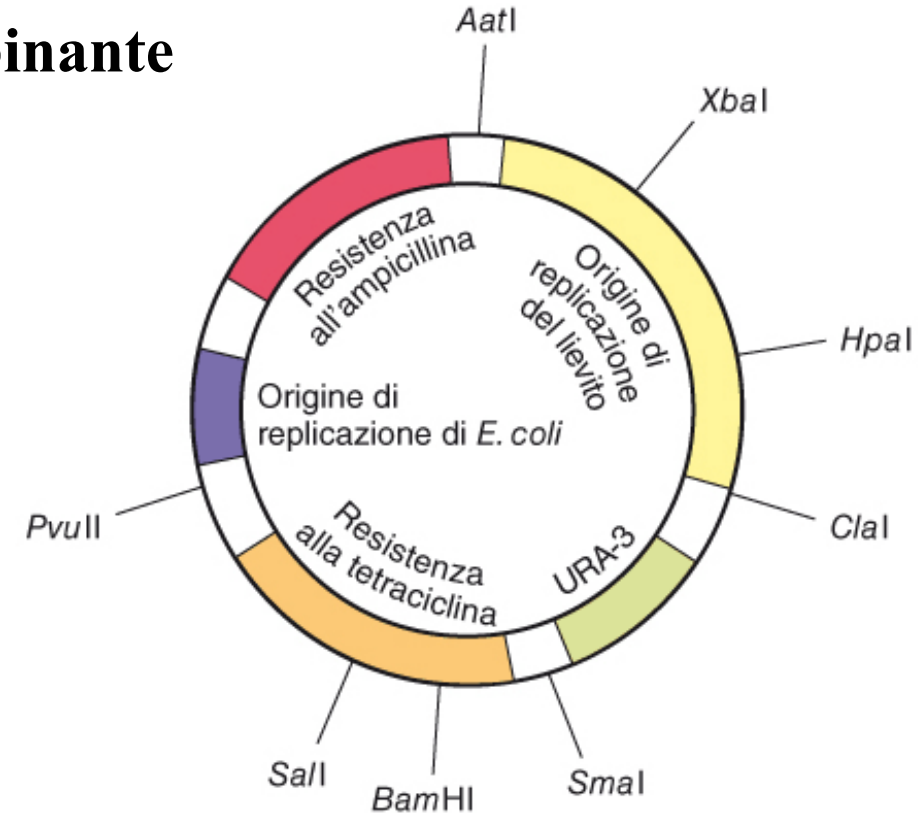


Figura 15-3 **Plasmide**

Questo vettore plasmidico presenta molte caratteristiche utili. È stato costruito combinando frammenti di DNA isolati da plasmidi, geni di *E. coli* e geni di lievito. Le due origini di replicazione, una *E. coli* e una per il lievito, *Saccharomyces cerevisiae*, gli permettono di replicarsi indipendentemente nei due tipi di cellule. Le sigle nella circonferenza esterna indicano i siti per enzimi di restrizione che tagliano il plasmide solo ed esclusivamente in quella posizione. Sono mostrati anche i geni per la resistenza agli antibiotici ampicillina e tetraciclina e il gene *URA*-3 di lievito. Il gene *URA*-3 è utile quando si trasformano le cellule di lievito che sono prive di un enzima necessario per la sintesi dell'uracile perché permette di identificare quelle che hanno ricevuto il plasmide. Le cellule che incorporano il plasmide divengono capaci di crescere in un mezzo privo di uracile.

Generazione del DNA ricombinante

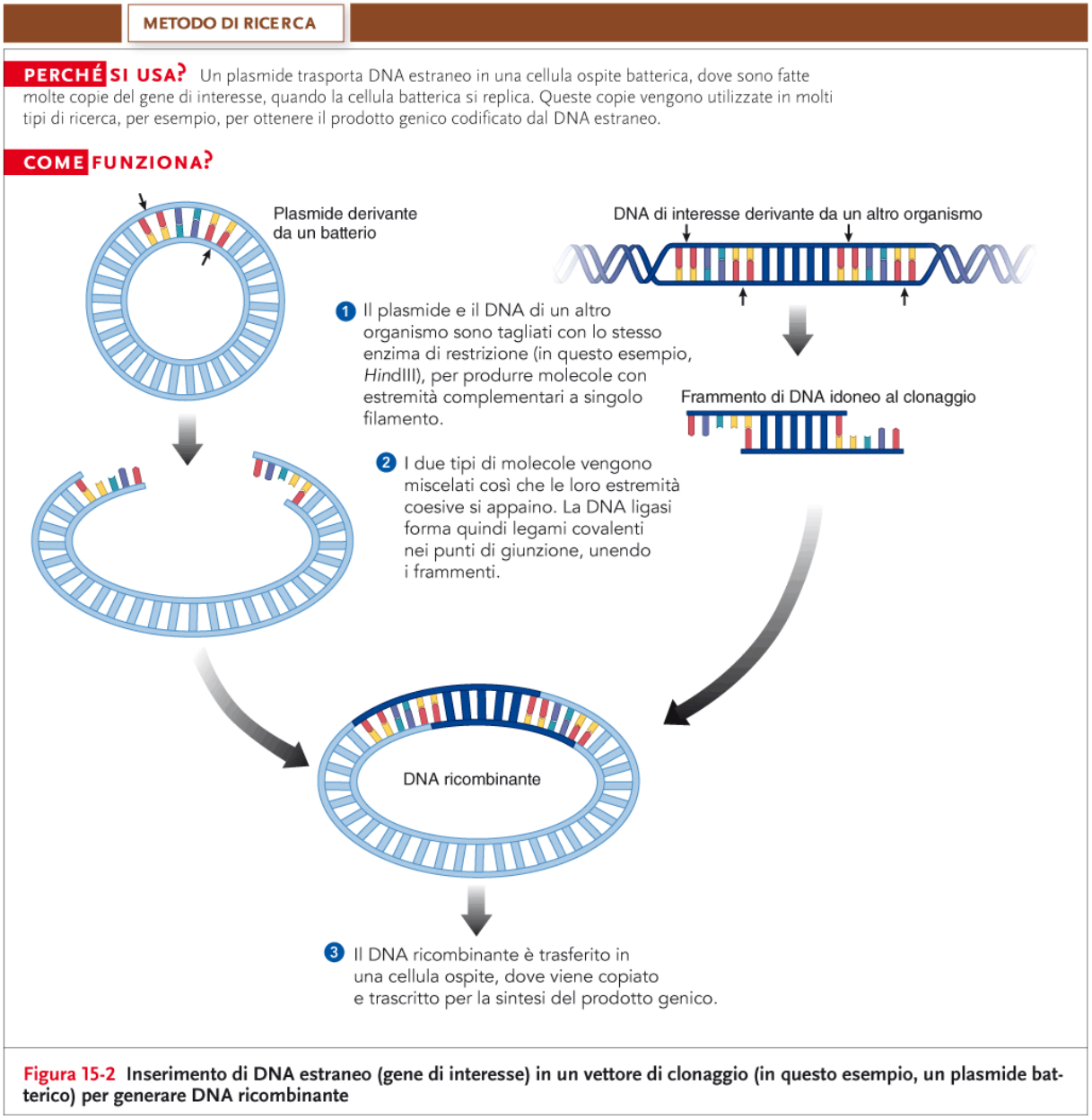
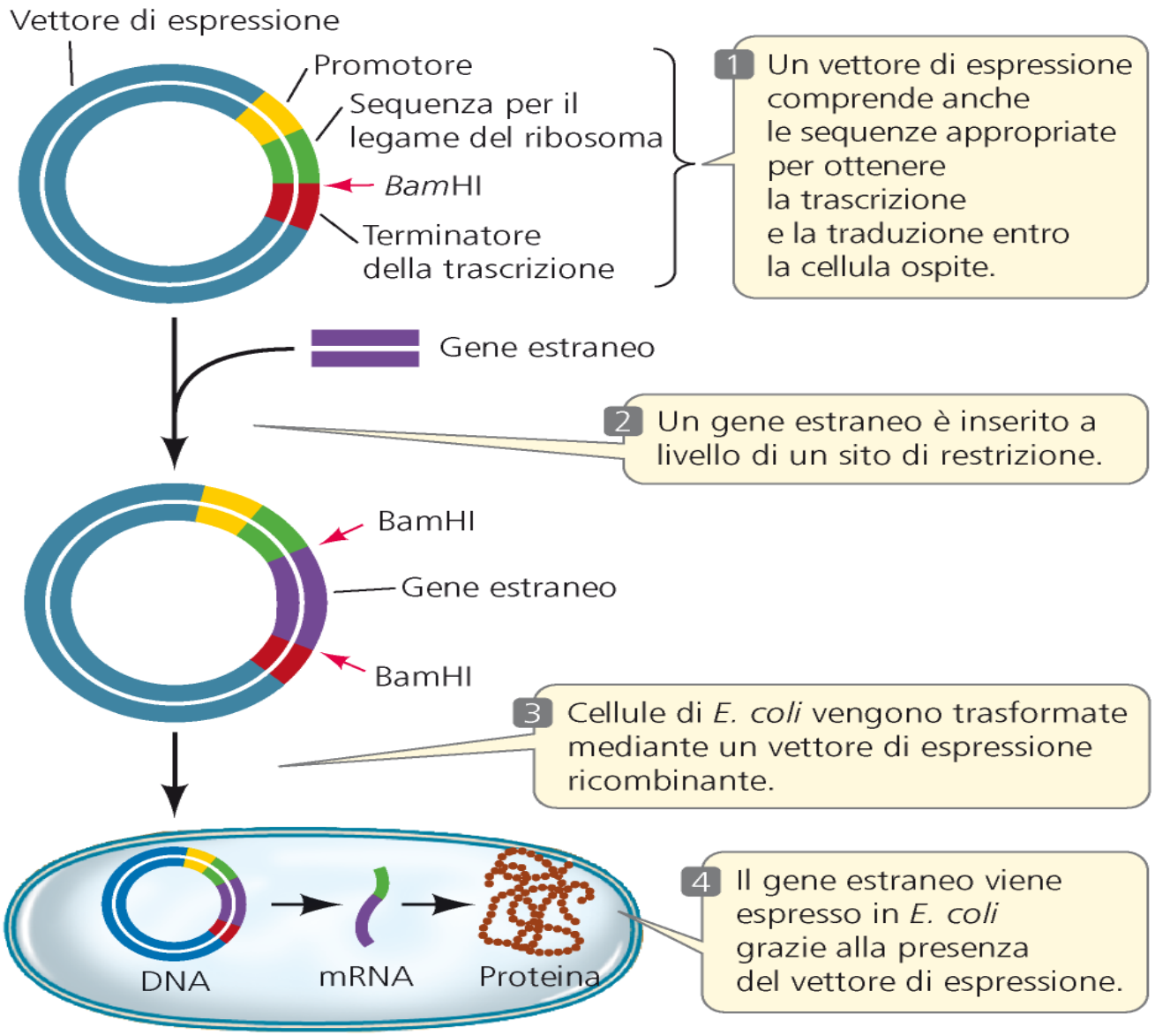
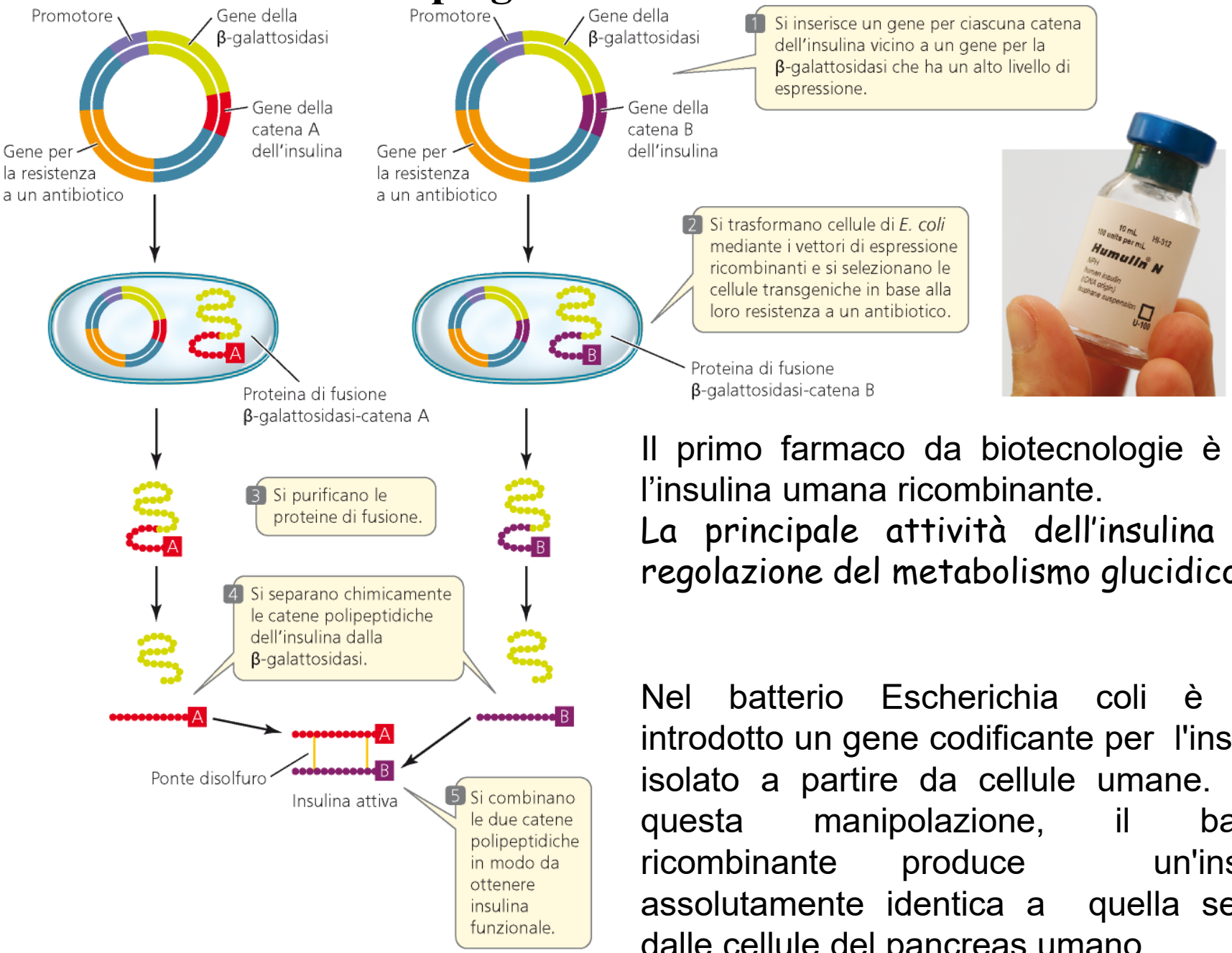


Figura 15-2 **Inserimento di DNA estraneo (gene di interesse) in un vettore di clonaggio (in questo esempio, un plasmide batterico) per generare DNA ricombinante**

Generazione del DNA ricombinante



Impiego del DNA ricombinante



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.

Piante transgeniche

Per gent. conc. di Monsanto Corporation

(a) Si noti la bassa resa produttiva di piante di granoturco normali utilizzate come controlli.

Per gent. conc. di Monsanto Corporation

(b) Piante di granoturco modificate geneticamente sopportano meglio la siccità rispetto a quelle normali.

Piante transgeniche

Queste piante transgeniche crescono bene in acqua salata.

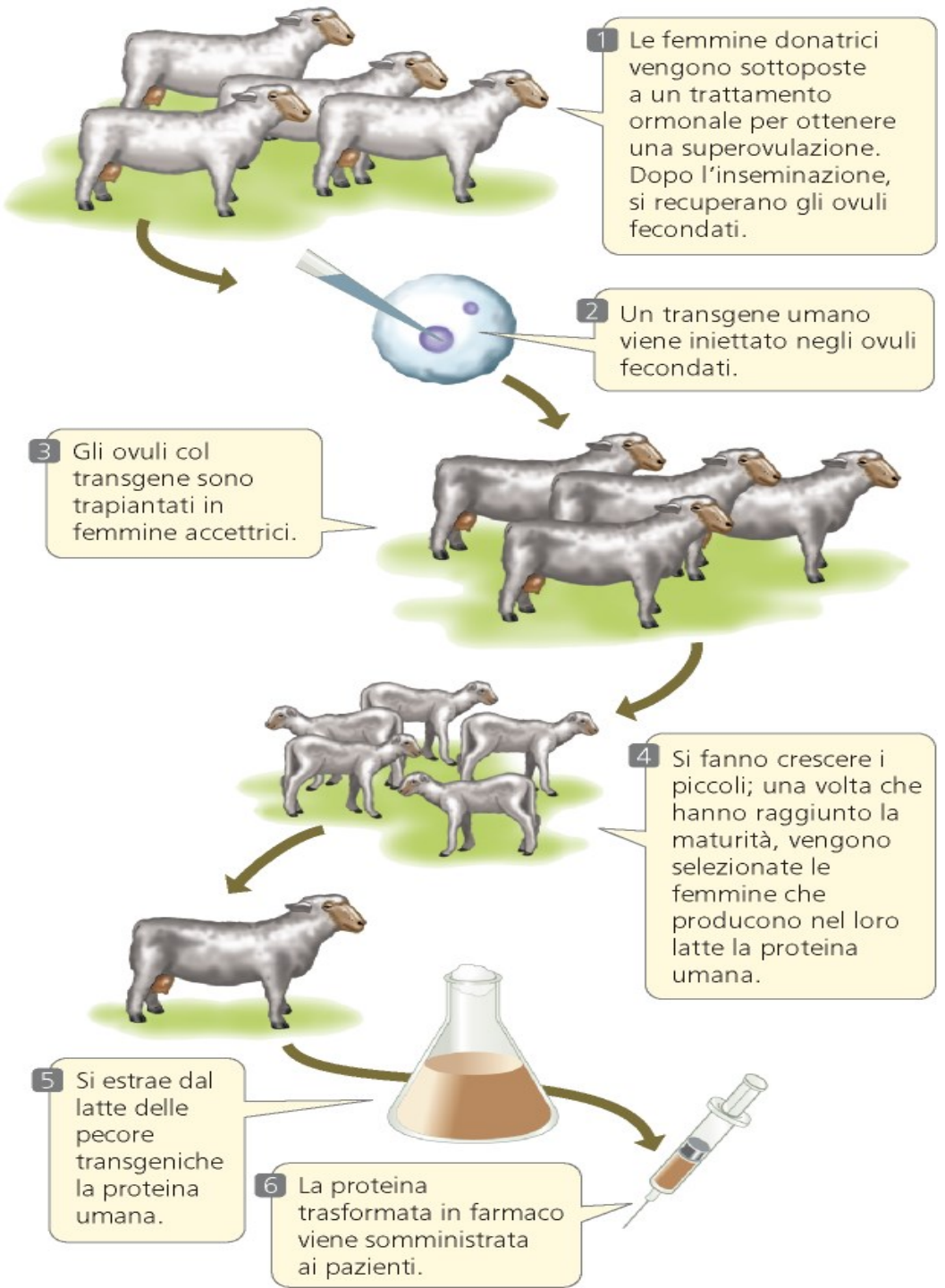
Le piante normali nell'acqua salata appassiscono.

Animali transgenici

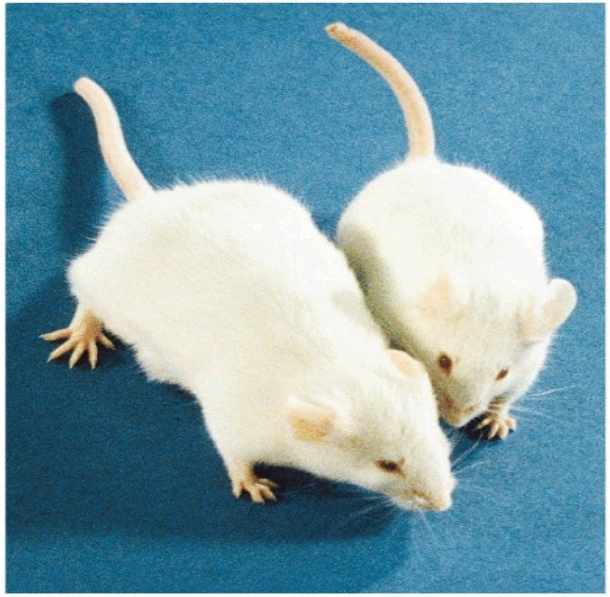
Per gent. conc. di GloFish®

Pesci transgenici (GloFish®). Questi pesci di acquario emettono fluorescenza di colore verde, rosso o giallo in quanto i ricercatori hanno inserito nel loro genoma un gene codificante una proteina fluorescente, normalmente presente nelle meduse e nei coralli.

Animali transgenici



Animali transgenici



R.L. Brinster, University of Pennsylvania Medical School

Figura 15-14 **Un topo transgenico**

Il topo sulla *destra* è normale, mentre quello sulla *sinistra* è transgenico ed esprime l'ormone della crescita di ratto.

Pentti Vänskä, Helsingin Sanomat International Edition

Figura 15-15 **Mucche transgeniche "pharm"**

Queste mucche contengono il gene umano che codifica per la lattoferrina, una proteina che si trova nel latte materno umano e in alcune secrezioni, come le lacrime, la saliva, la bile e i succhi pancreatici. La lattoferrina rappresenta una delle linee di difesa del sistema immunitario contro gli organismi patogeni. Queste mucche transgeniche secernono la lattoferrina umana nel proprio latte.

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Costruzione di libreria genomica

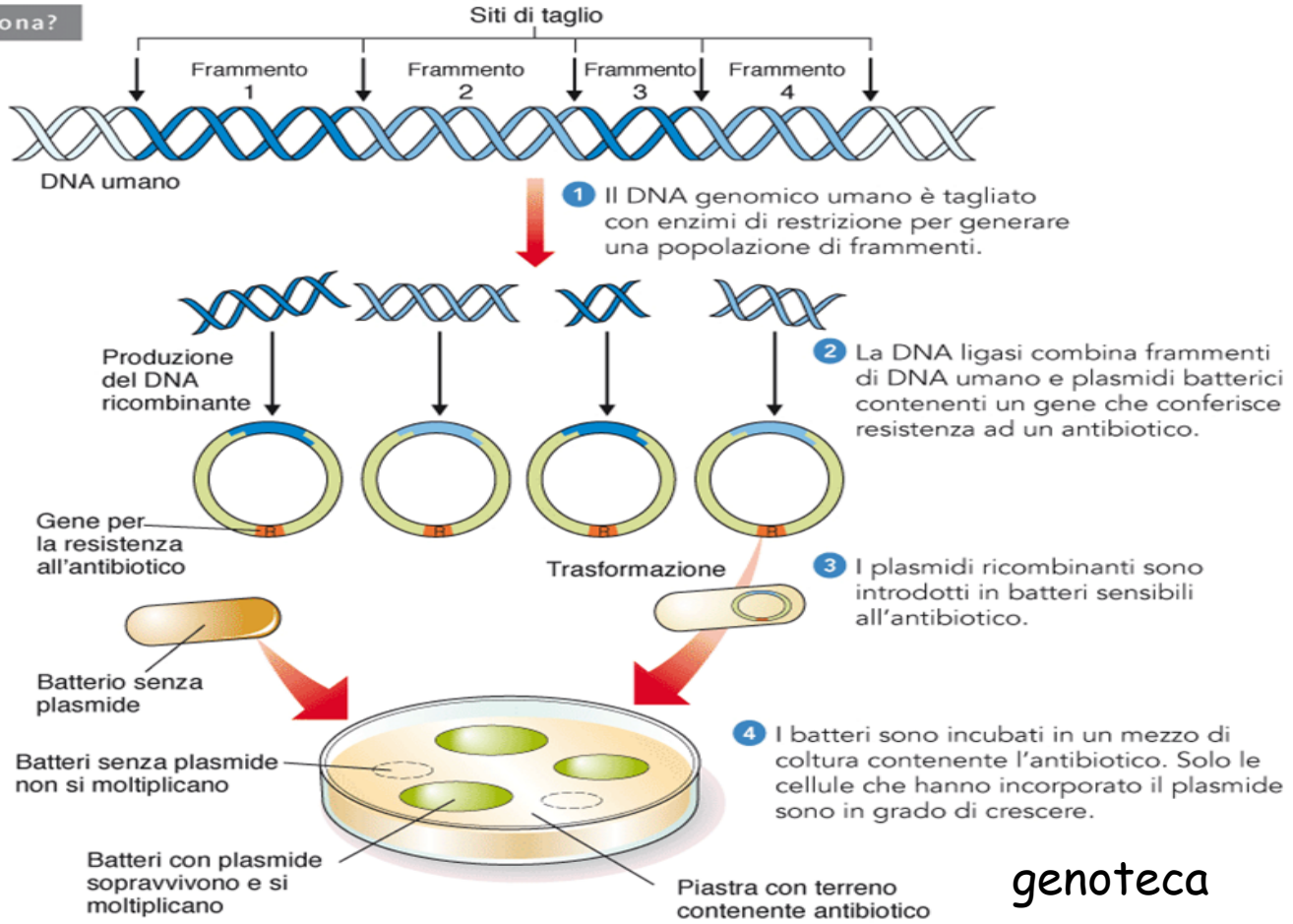
Costruzione libreria genomica

METODO

Perché si usa?

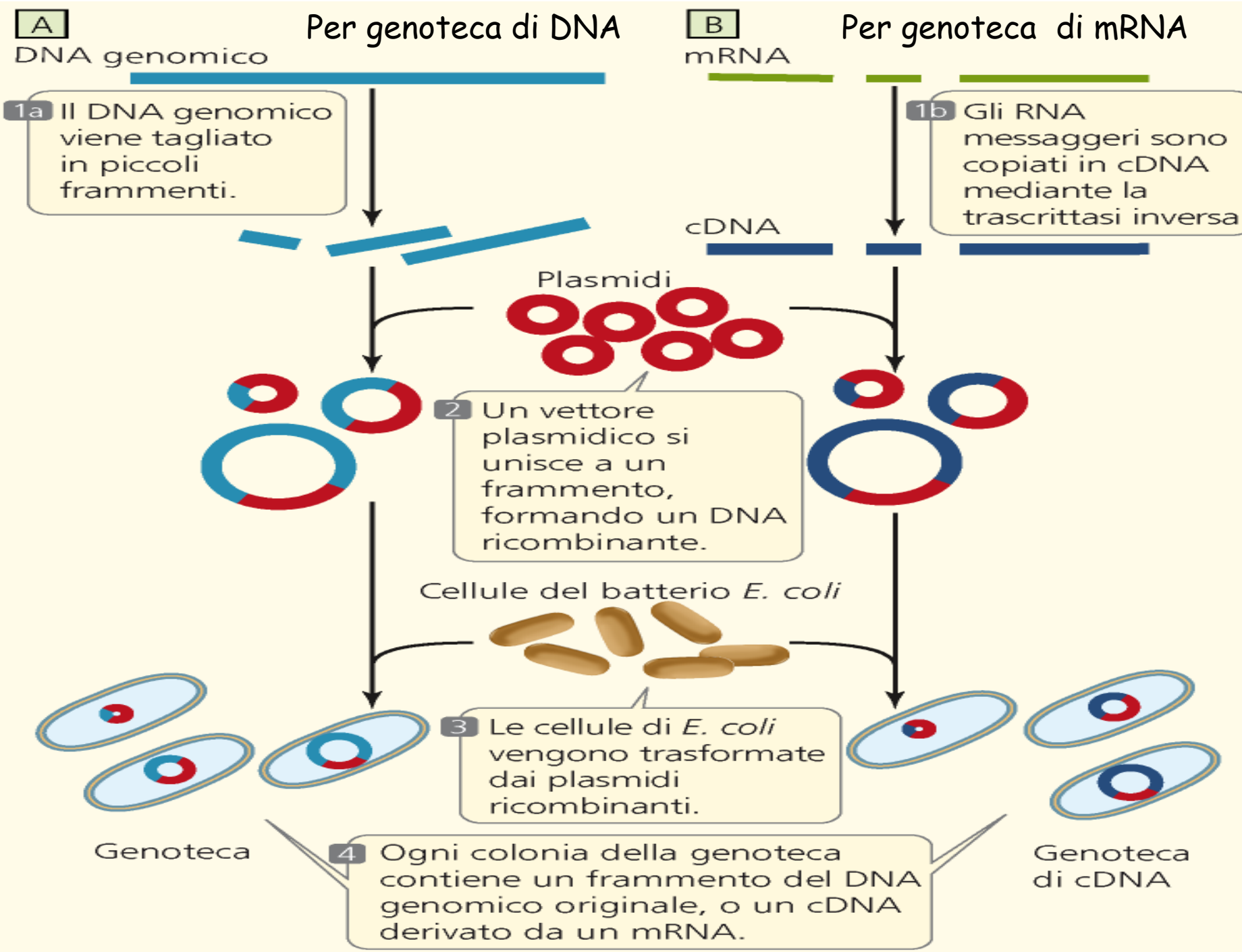
Una libreria genomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA del genoma di un organismo; una libreria cromosomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA di un cromosoma specifico. Ciascun frammento di DNA viene "conservato" in un clone di cellule batteriche ricombinanti. Gli scienziati usano 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
Per genoteca di DNA
B
Per genoteca di mRNA
DNA genomico
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.
Genoteca
4 Ogni colonia della genoteca contiene un frammento del DNA genomico originale, o un cDNA derivato da un mRNA.
Genoteca di cDNA

Alcune Tecnologie del DNA

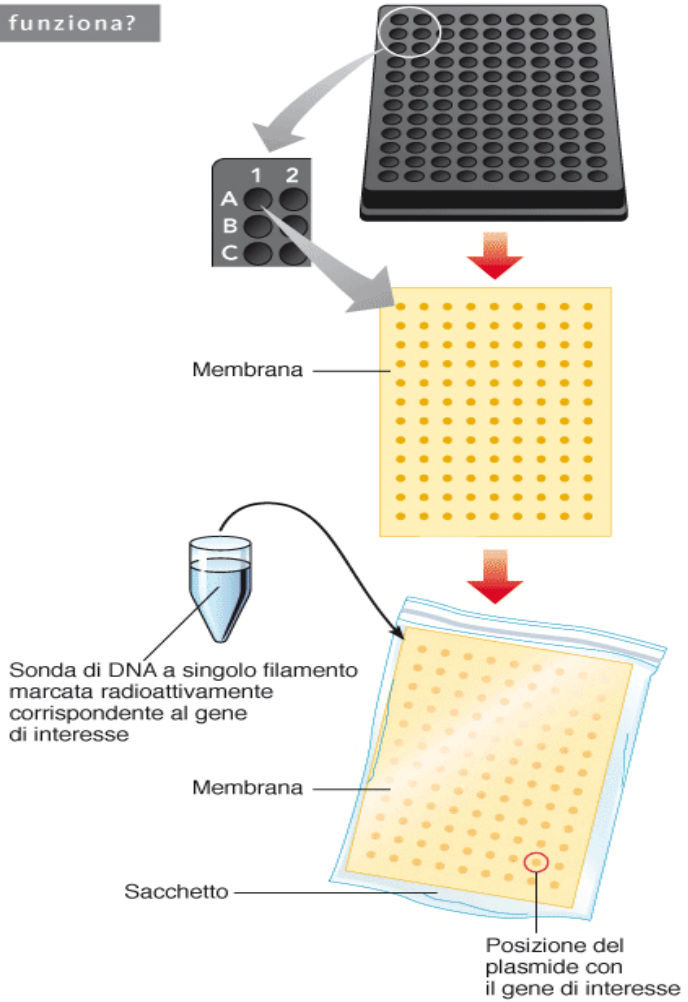
- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

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

• Souther 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?

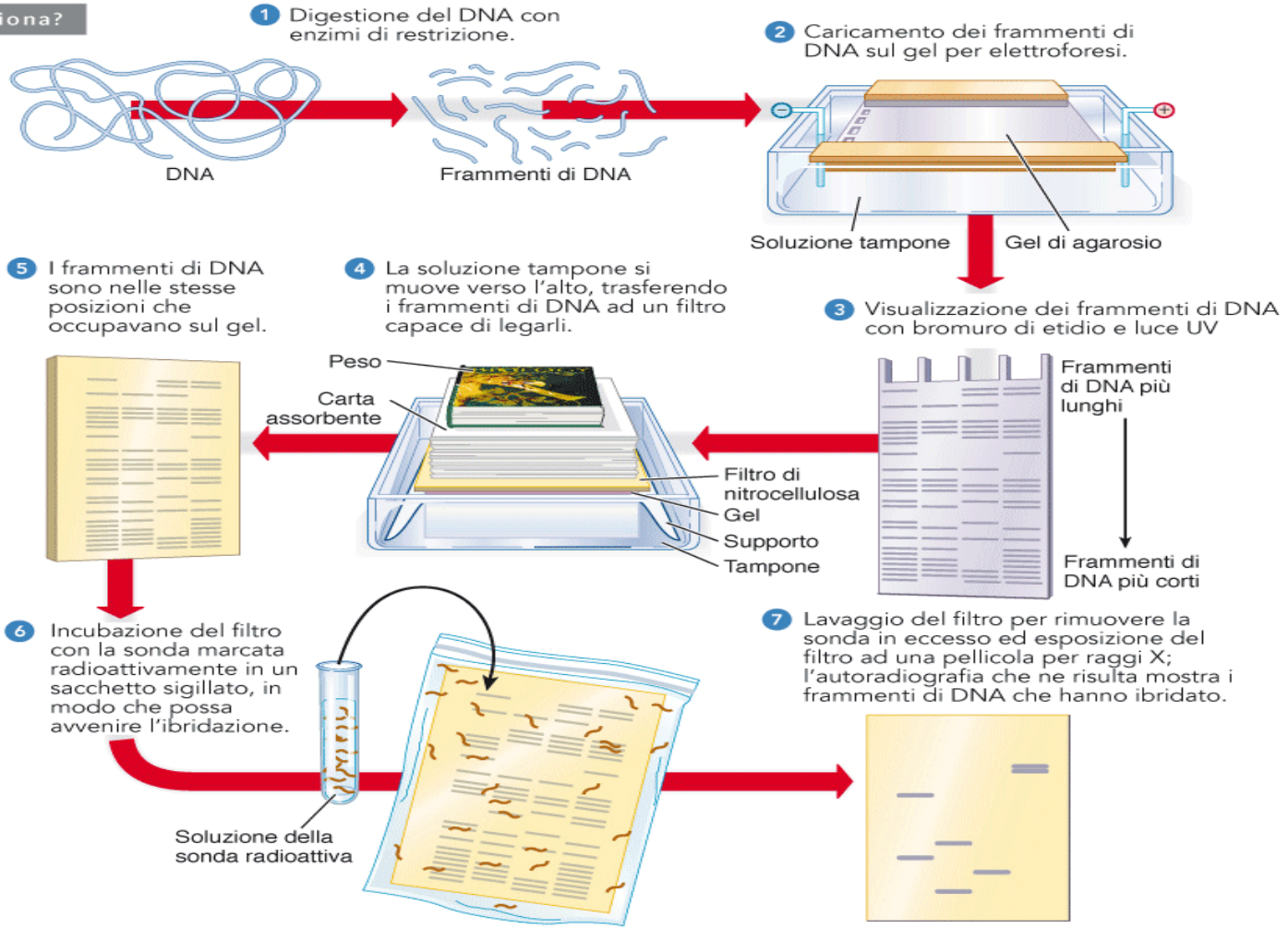


FIGURA 15-9 La tecnica del Southern blotting

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Il DNA fingerprinting presenta numerose applicazioni

Le brevi ripetizioni in tandem (Short tandem repeats, STR) (microsatelliti) sono marcatori molecolari costituiti da brevi sequenze di DNA ripetuto (200 nucletotidi) con uno schema semplice ripetuto esempio GTGTGT oppure CAGCAGCAG). Le STR sono altamente polimorfiche poichè variano in lunghezza da individuo ad individuo: questa caratteristica le rende utili per identificare gli individui

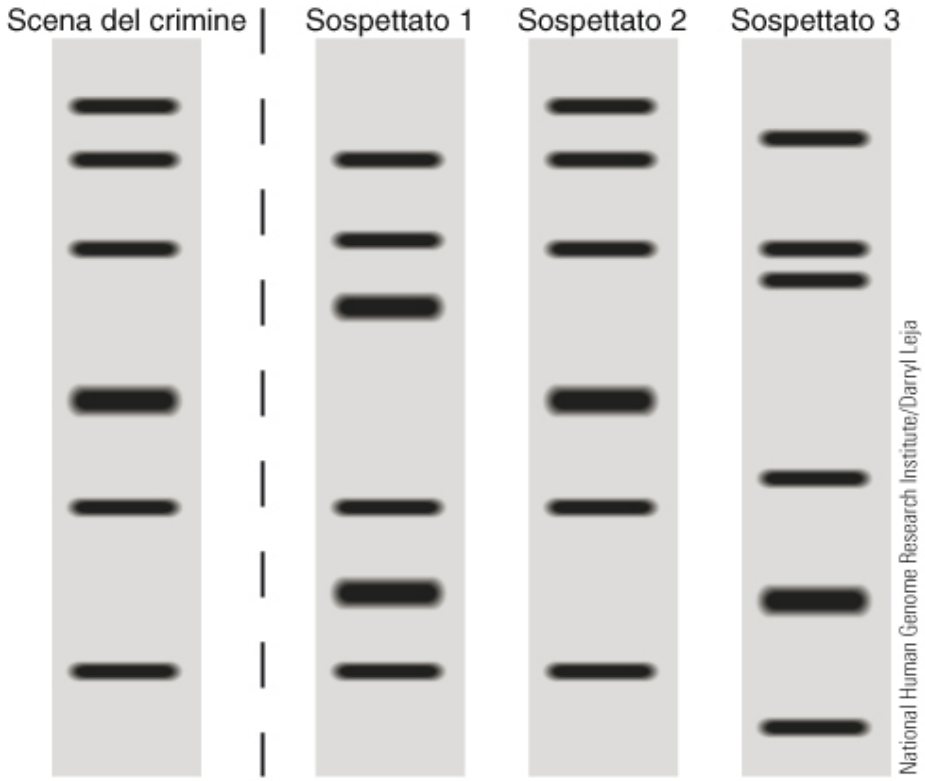


Figura 15-13 Fingerprinting del DNA

Questi fingerprint di DNA mostrano il DNA derivante dalla scena di un crimine (al centro) insieme ai profili del DNA di tre individui sospettati. Riuscite a individuare il profilo di DNA del sospettato che corrisponde al campione di sangue ritrovato sulla scena del crimine?

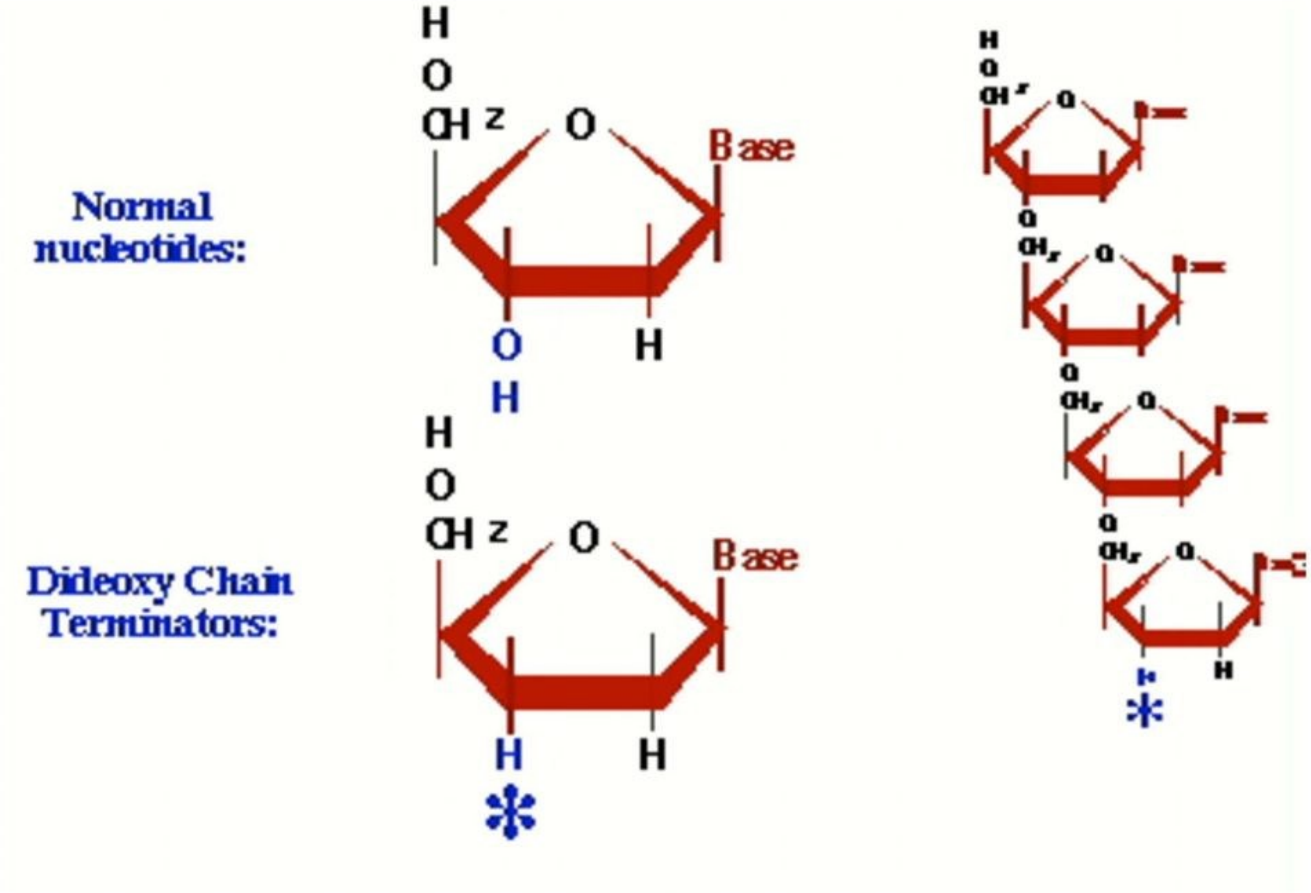
Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

Metodo di Sanger

(o metodo a terminazione di catena)

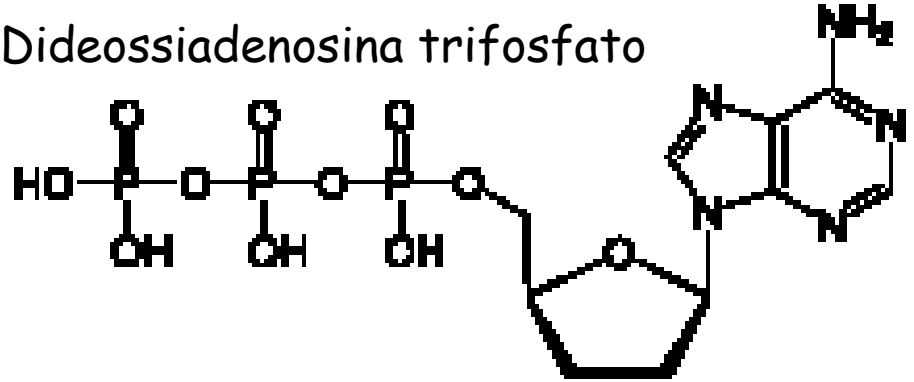
Dideossinucleotidi trifosfati (ddNTP) o Terminatori di catena



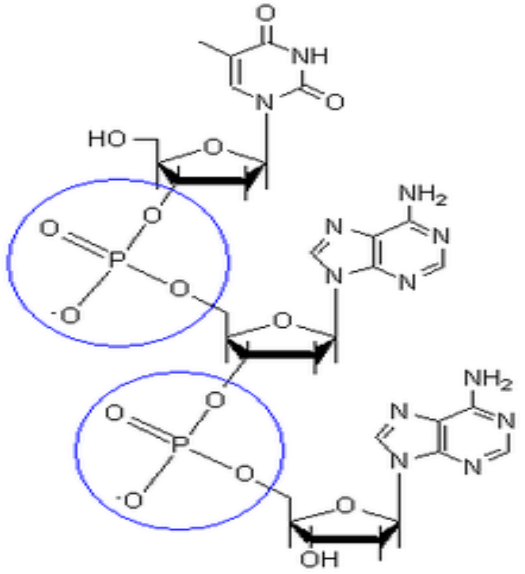
Dideossinucleotide (ddNTP) e deossinulceotide

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

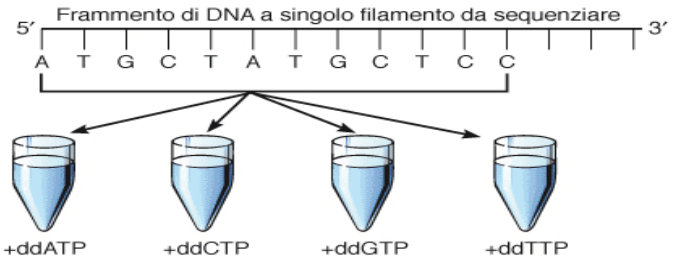


• Sequenziamento del DNA

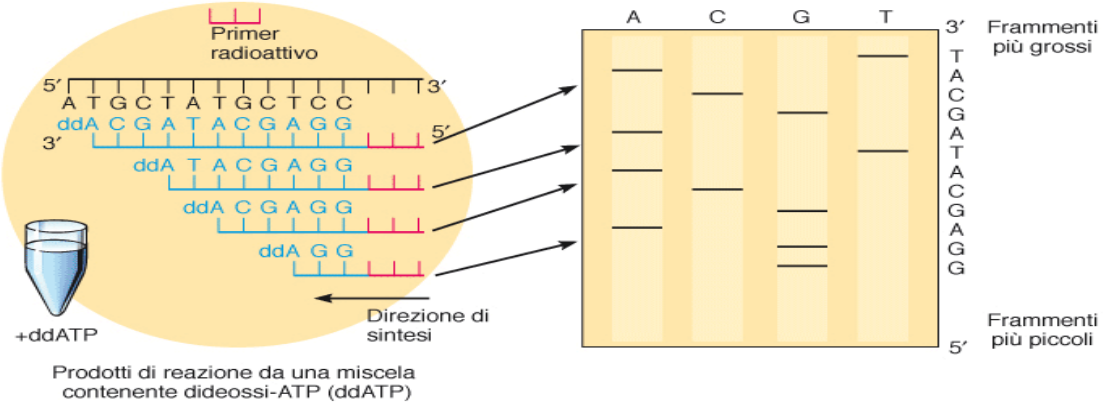
METODO DI RICERCA

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

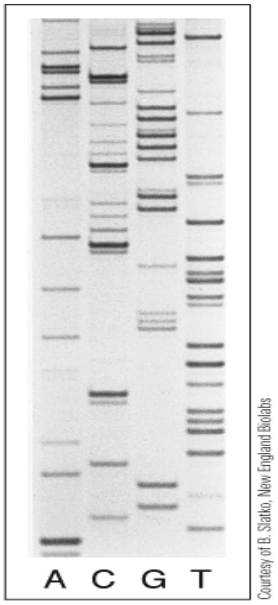
Come funziona?



1 Per sequenziare un frammento di DNA, si utilizzano quattro diverse miscele di reazione, ognuna contenente una piccola quantità di un singolo dideossinucleotide, per esempio ddATP. Ogni miscela di reazione include anche una quantità maggiore dei quattro deossinucleotidi normali (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), primer marcati radioattivamente e DNA polimerasi.



Prodotti di reazione da una miscela contenente dideossi-ATP (ddATP)



Courtesy of B. Slatko, New England Biolabs

2 L'incorporazione causale del dideossi-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 dideossinucleoti di A, C, G e T.

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

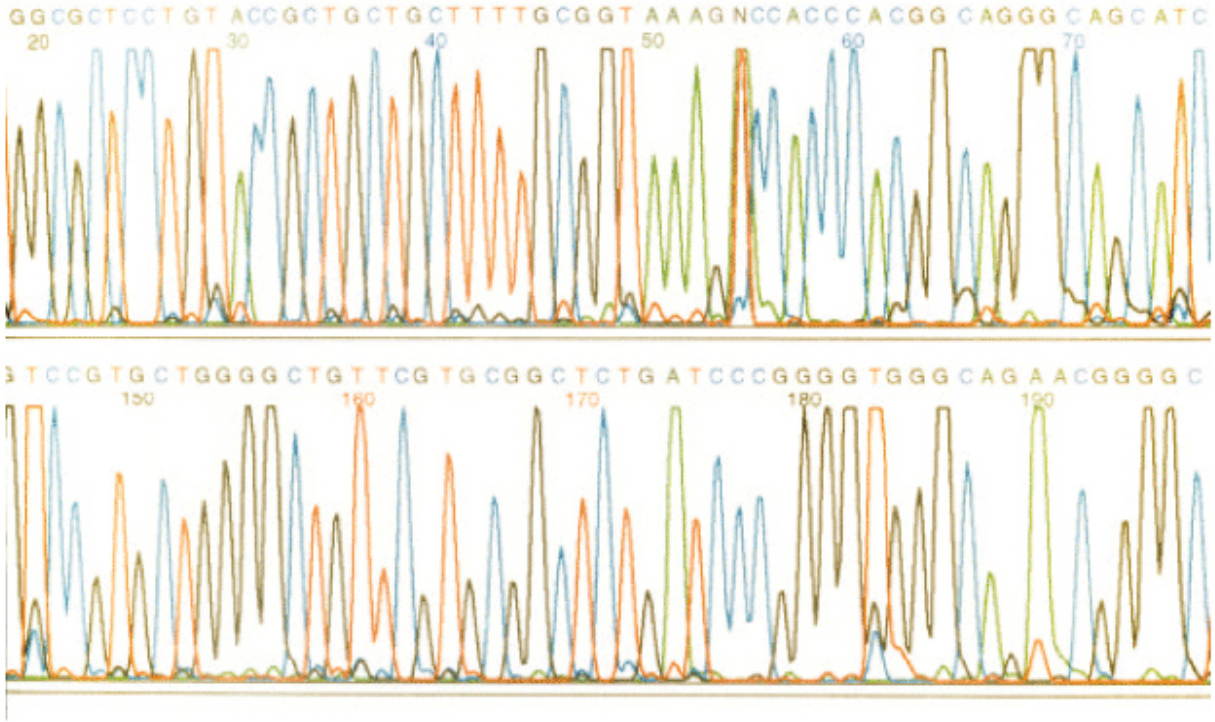


FIGURA 15-11 **Un piccolo segmento dell'elettroferogramma con i risultati di un sequenziamento automatizzato del DNA**

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.

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

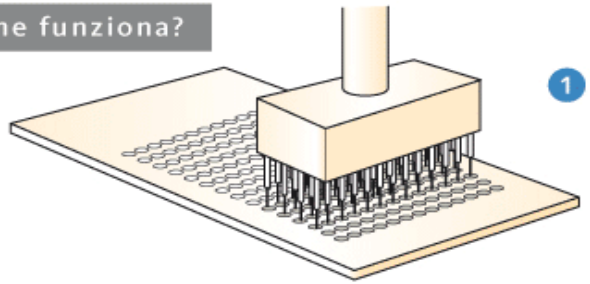
• DNA microarray

METODO DI RICERCA

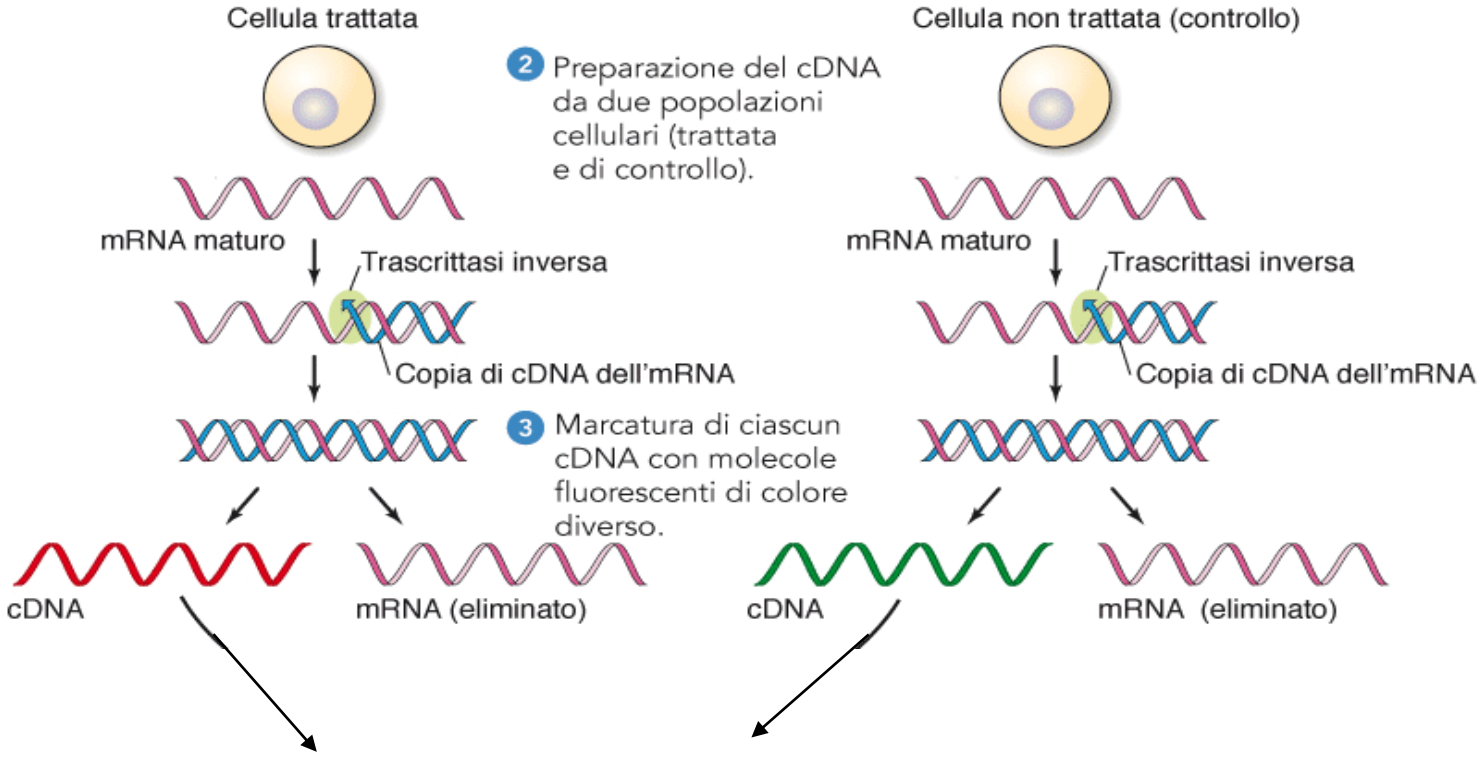
Perché si usa?

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.

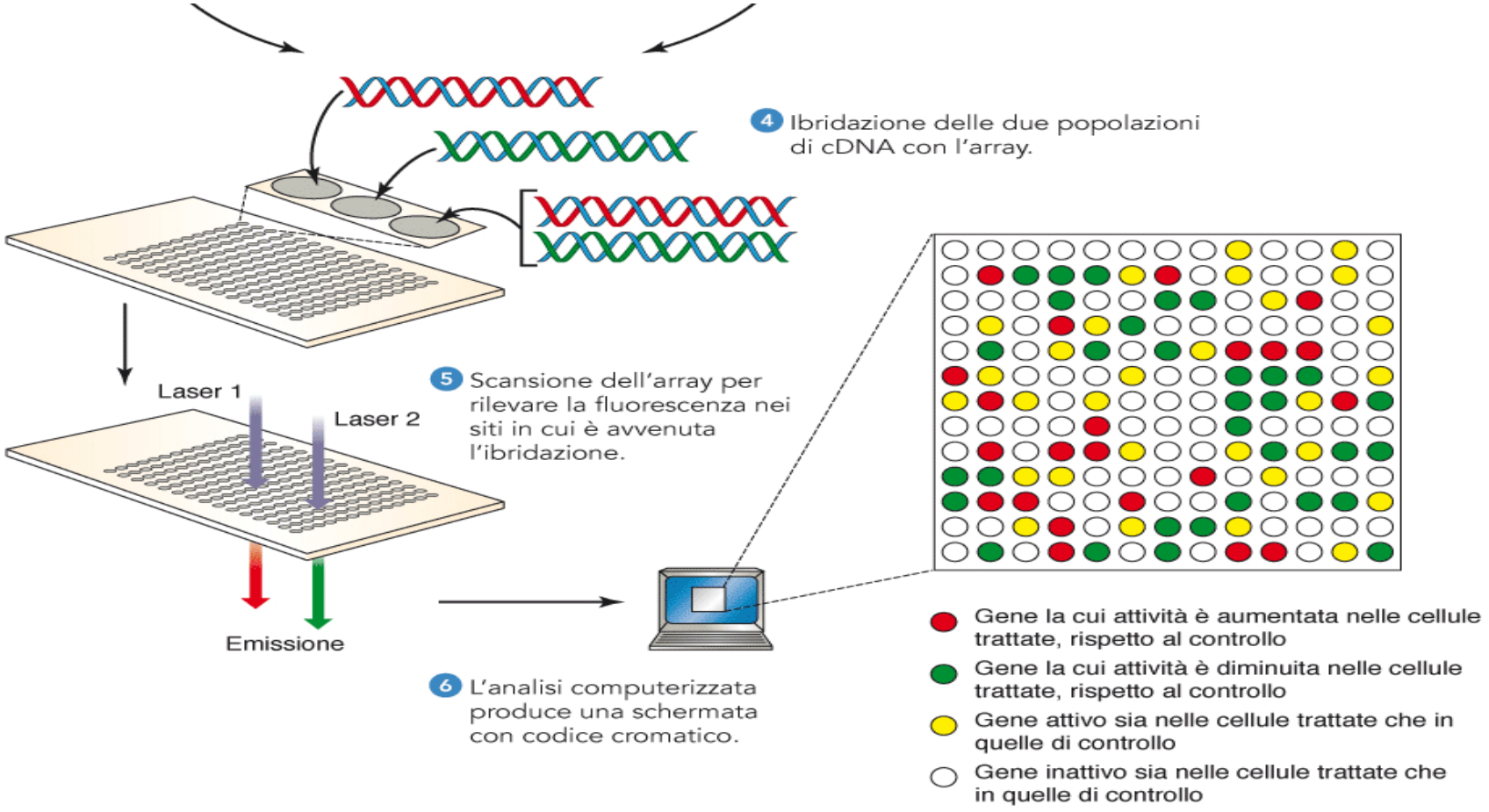
Come funziona?

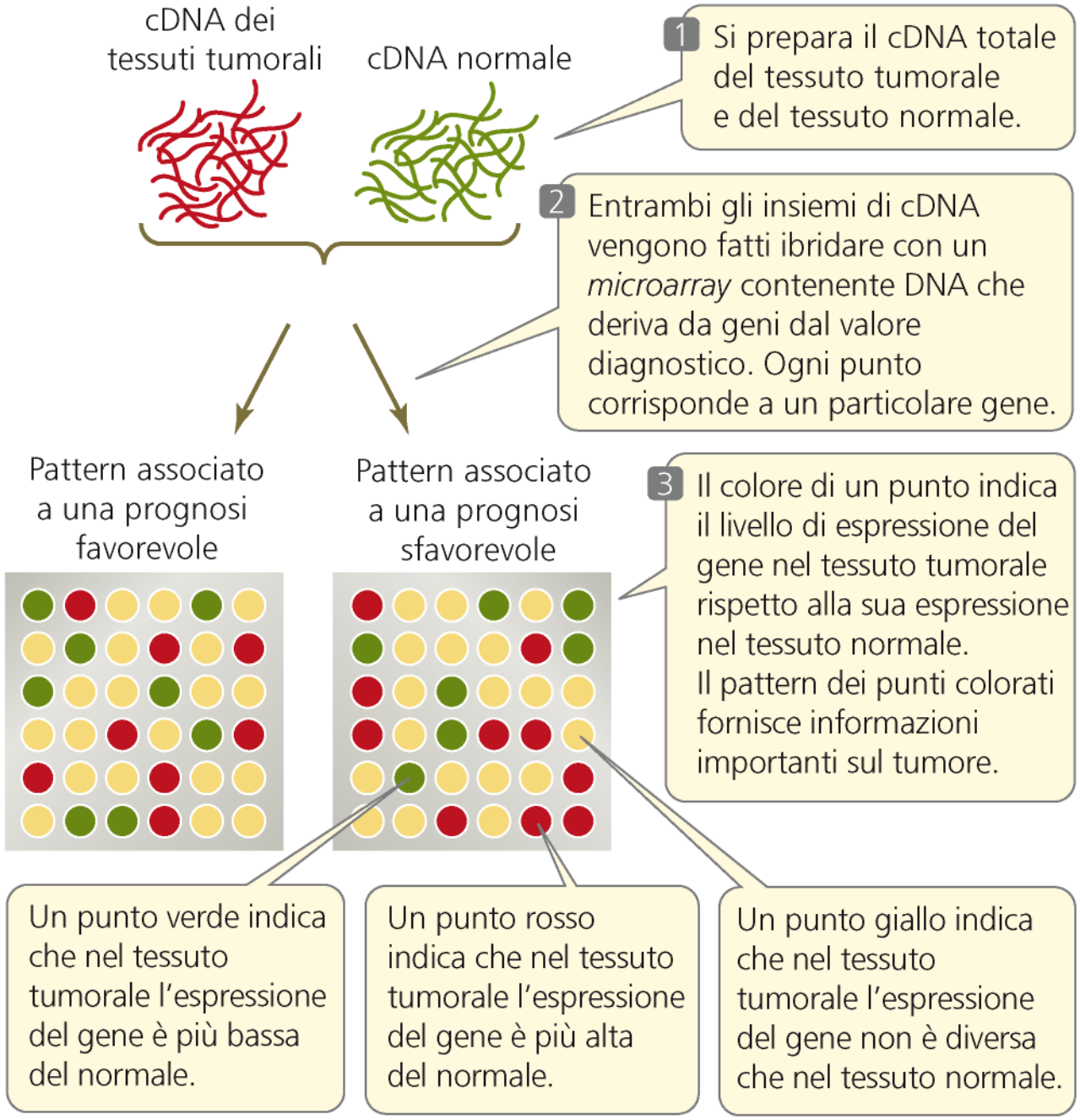


1 Preparazione del microarray. Ciascun cerchiolino contiene molte copie di una specifico cDNA a singolo filamento.



- DNA microarray




cDNA dei tessuti tumorali
cDNA normale
1 Si prepara il cDNA totale del tessuto tumorale e del tessuto normale.
2 Entrambi gli insiemi di cDNA vengono fatti ibridare con un *microarray* contenente DNA che deriva da geni dal valore diagnostico. Ogni punto corrisponde a un particolare gene.
Pattern associato a una prognosi favorevole
Pattern associato a una prognosi sfavorevole
3 Il colore di un punto indica il livello di espressione del gene nel tessuto tumorale rispetto alla sua espressione nel tessuto normale.
Il pattern dei punti colorati fornisce informazioni importanti sul tumore.
Un punto verde indica che nel tessuto tumorale l'espressione del gene è più bassa del normale.
Un punto rosso indica che nel tessuto tumorale l'espressione del gene è più alta del normale.
Un punto giallo indica che nel tessuto tumorale l'espressione del gene non è diversa che nel tessuto normale.

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

PCR

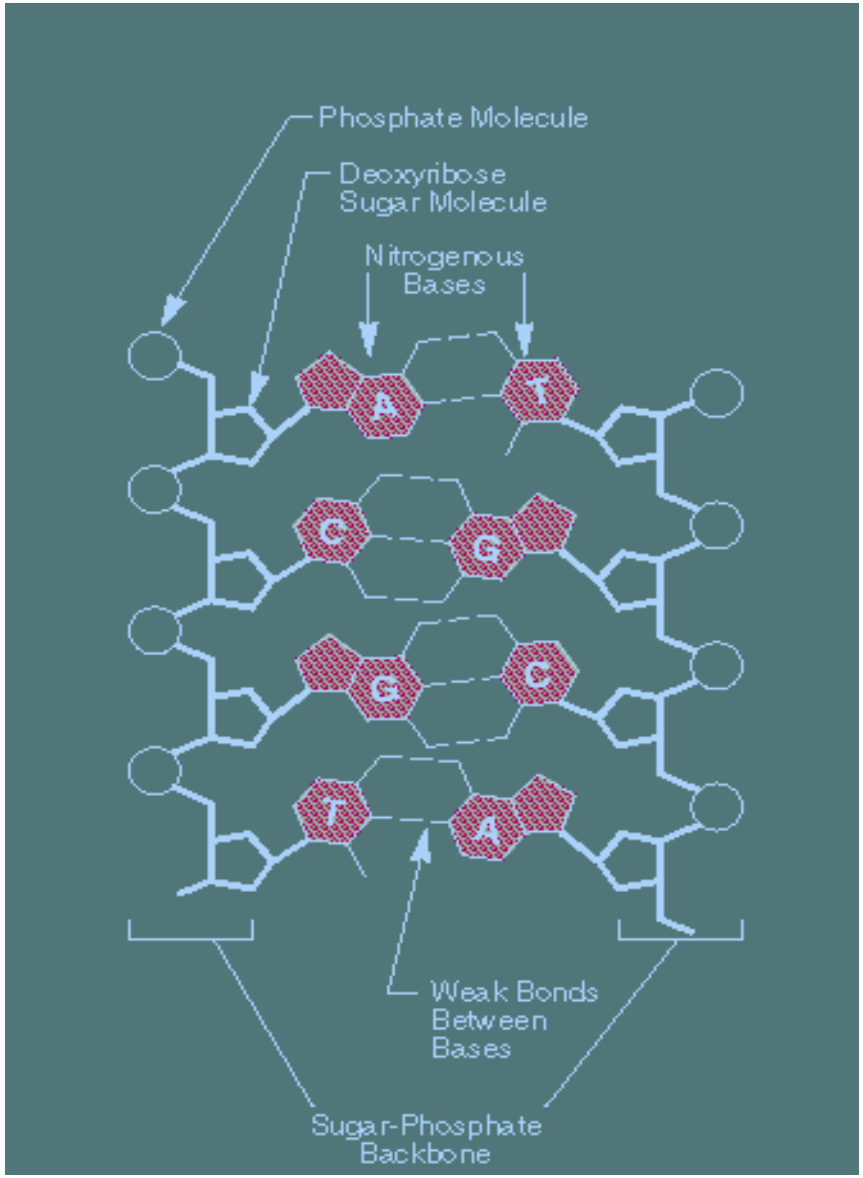
La reazione a catena della polimerasi (in inglese: Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di sequenze di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

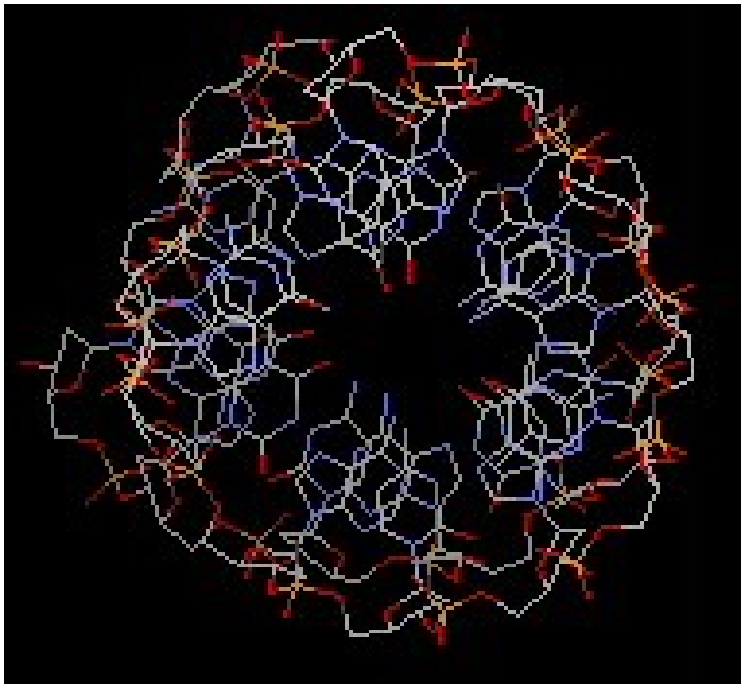
L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

L’invenzione della PCR

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

La PCR è basata sulla complementarietà delle basi





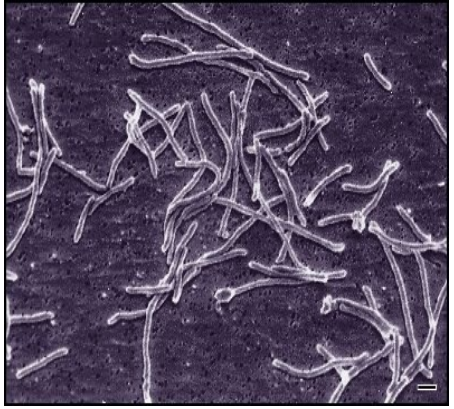
Com'era l'analisi genetica prima della PCR?

- 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

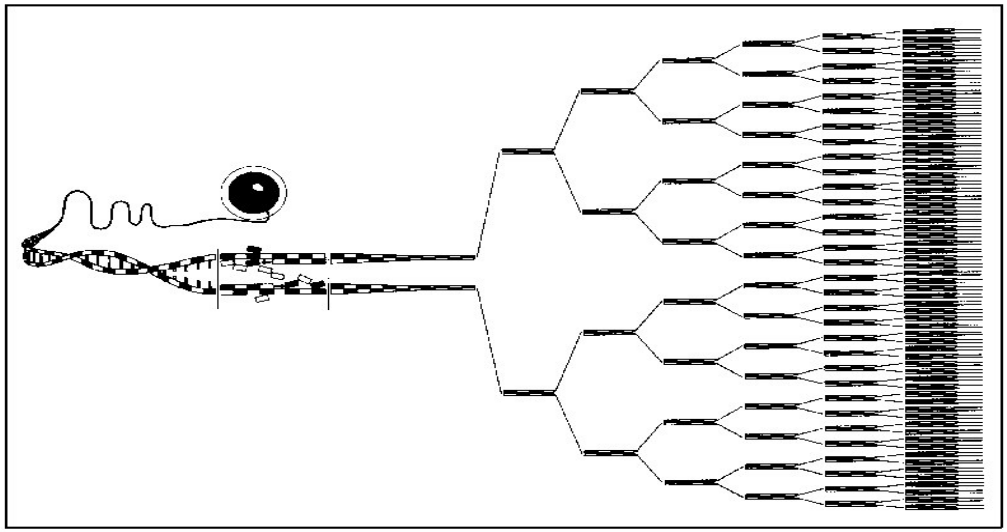
DNA polimerasi di *Thermus aquaticus*



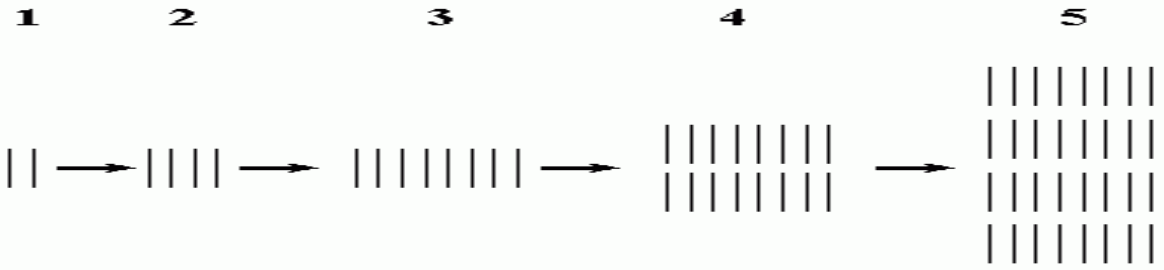
Thermus aquaticus **è un batterio termofilo isolato per la prima volta nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli (Stati Uniti).**
È divenuto famoso nel campo della biologia molecolare dopo la sensazionale invenzione di Kary Mullis, la reazione a catena della polimerasi (PCR), 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.

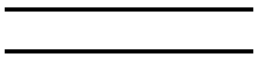
Polymerase Chain Reaction - PCR



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

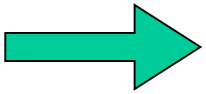


DNA

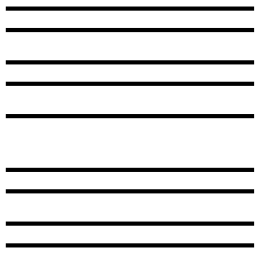


(singola molecola)

PCR



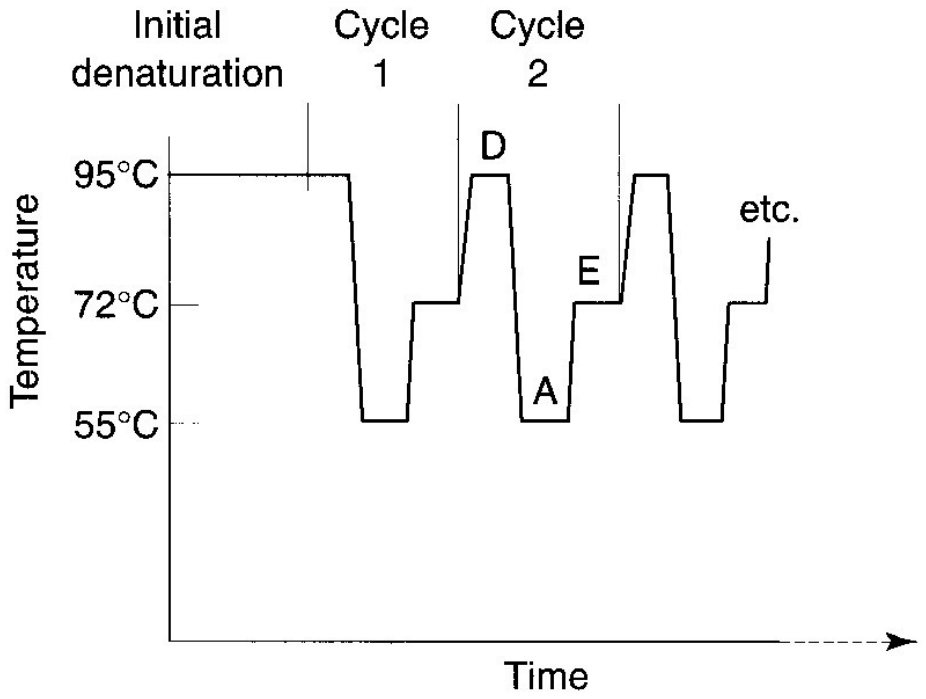
amplificazione



Molte molecole

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**

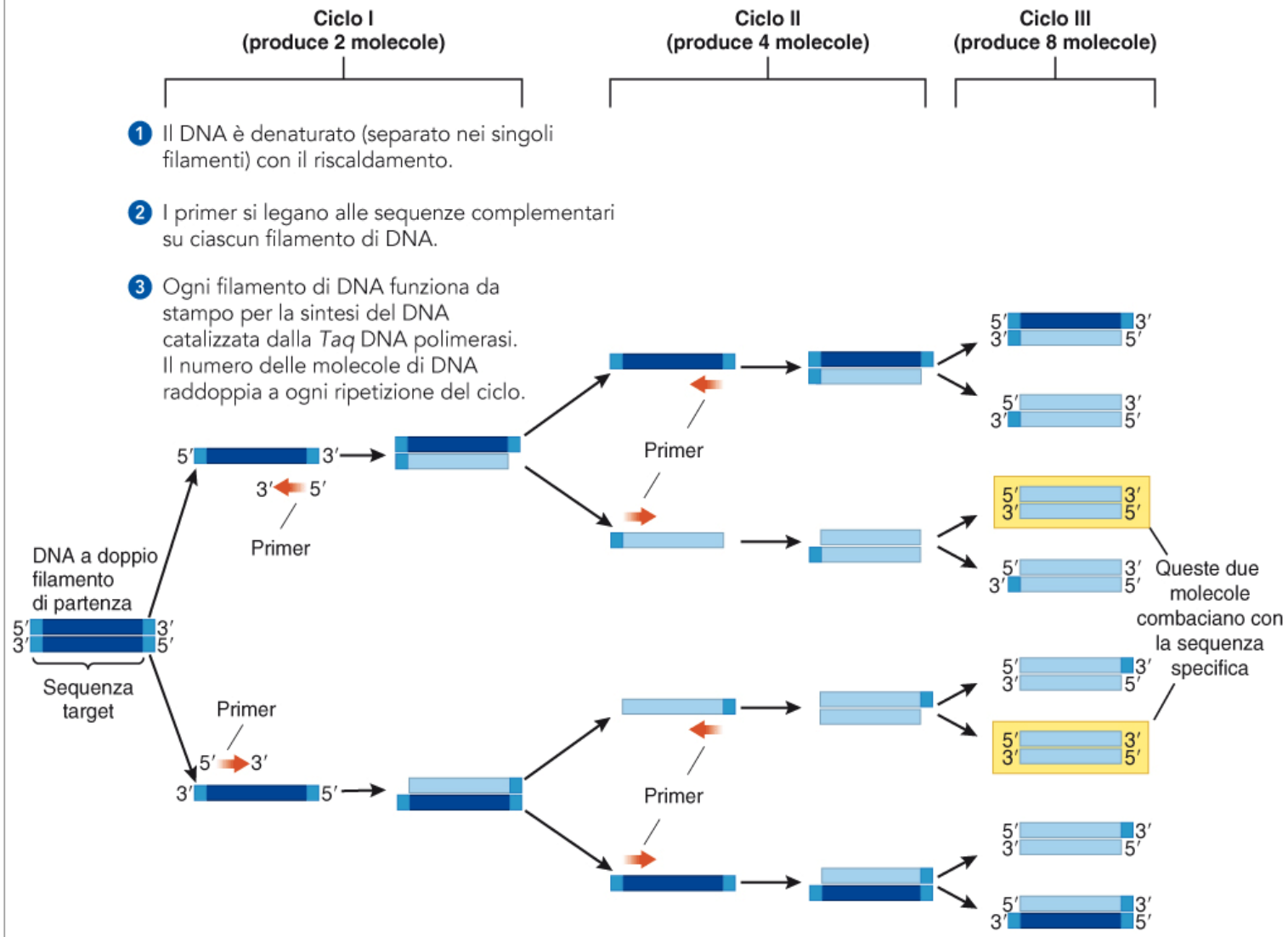


Quanto è potente **la PCR?**

- **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)**

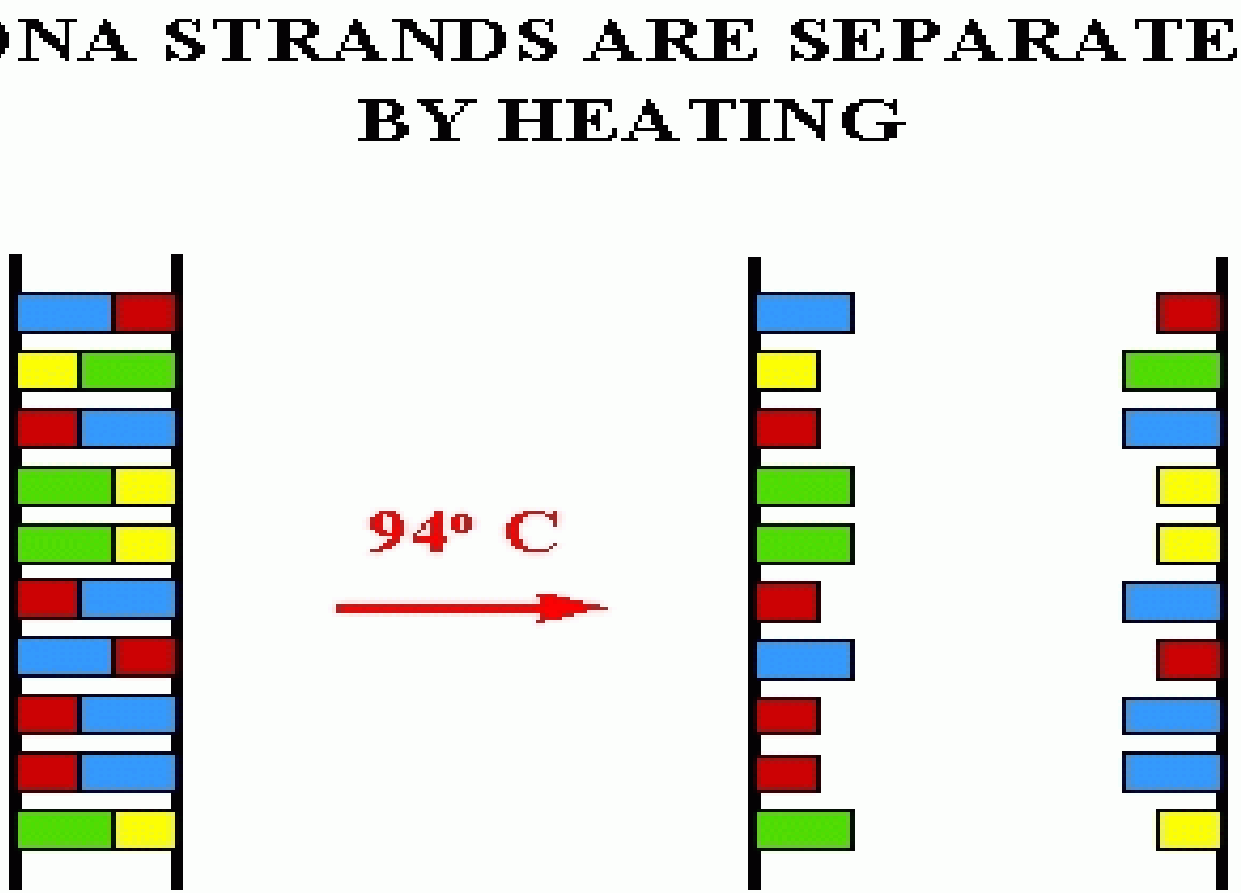
PCR

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



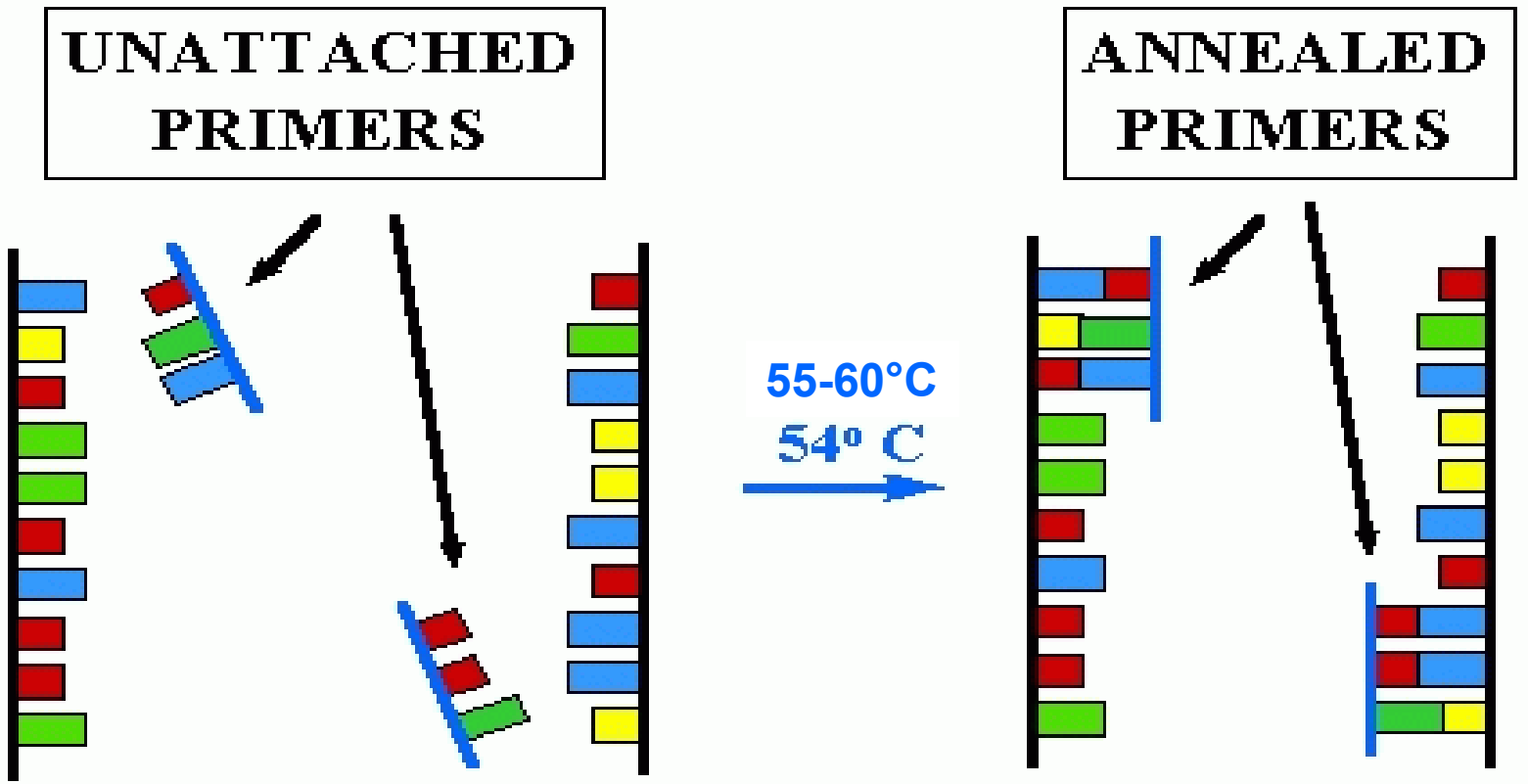
fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



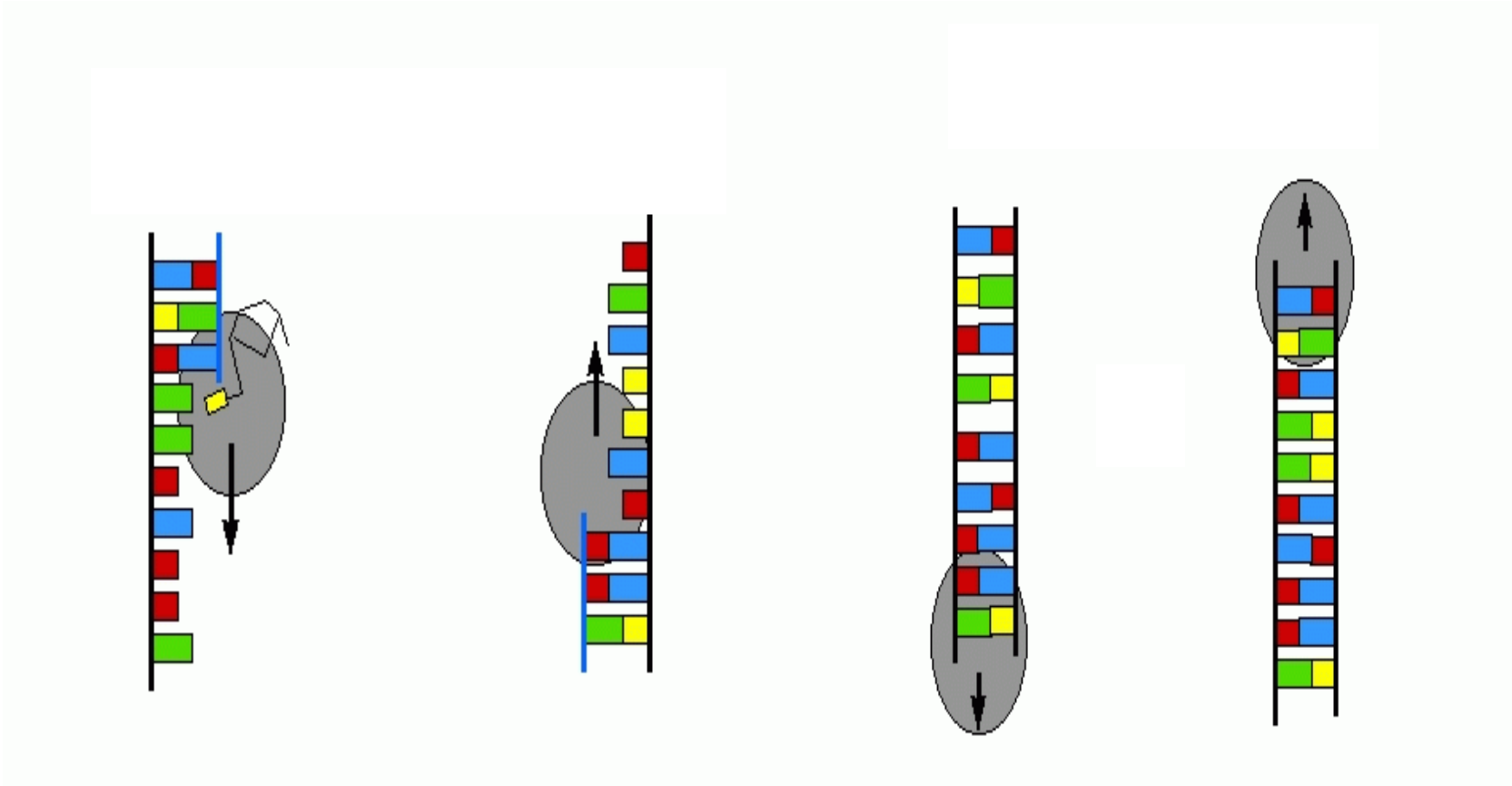
fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

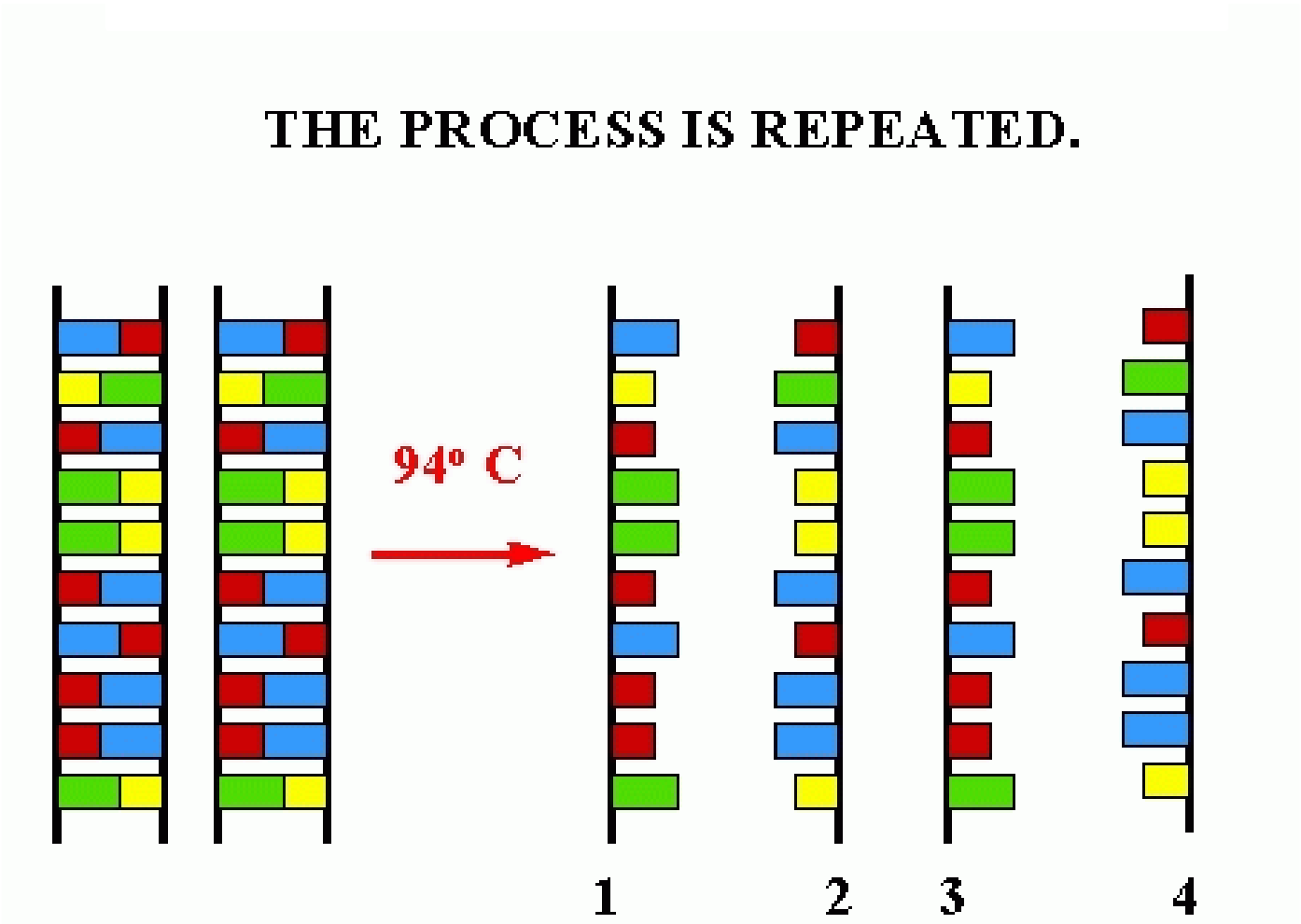


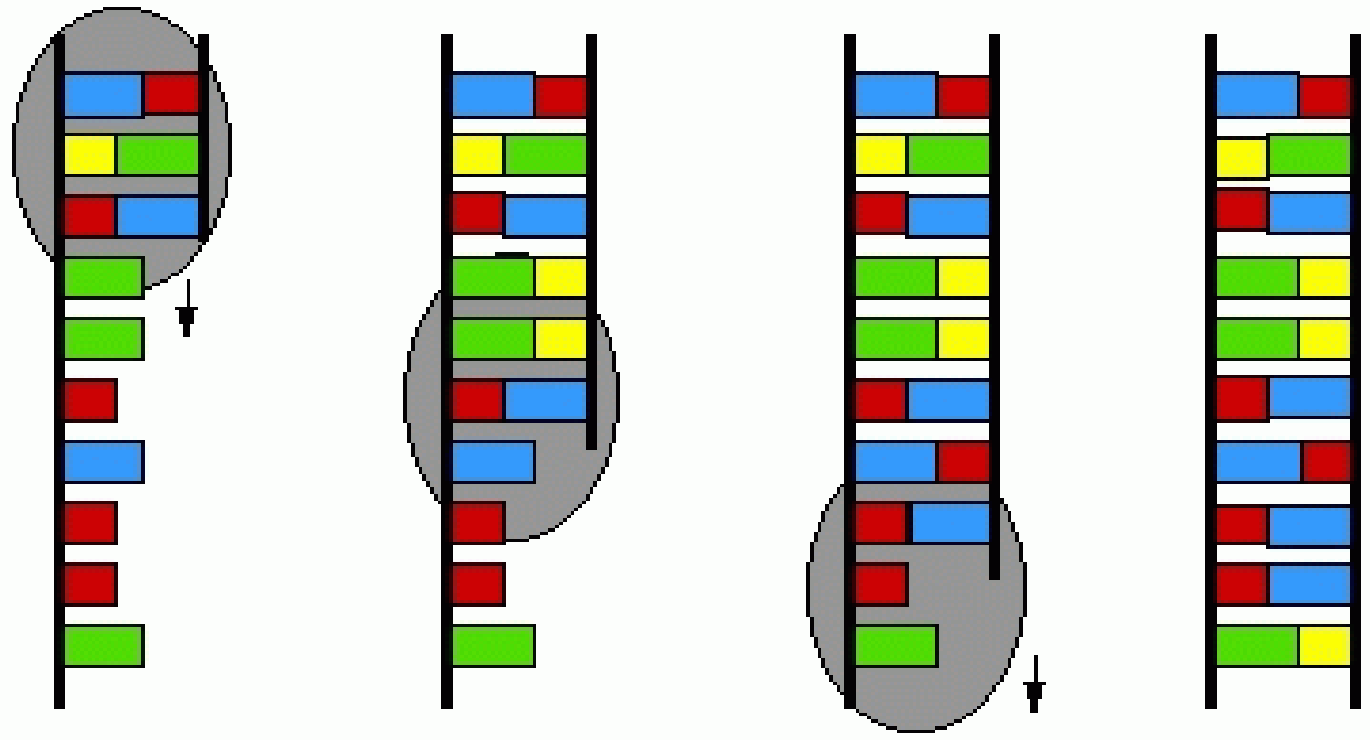
fase 3: ESTENSIONE

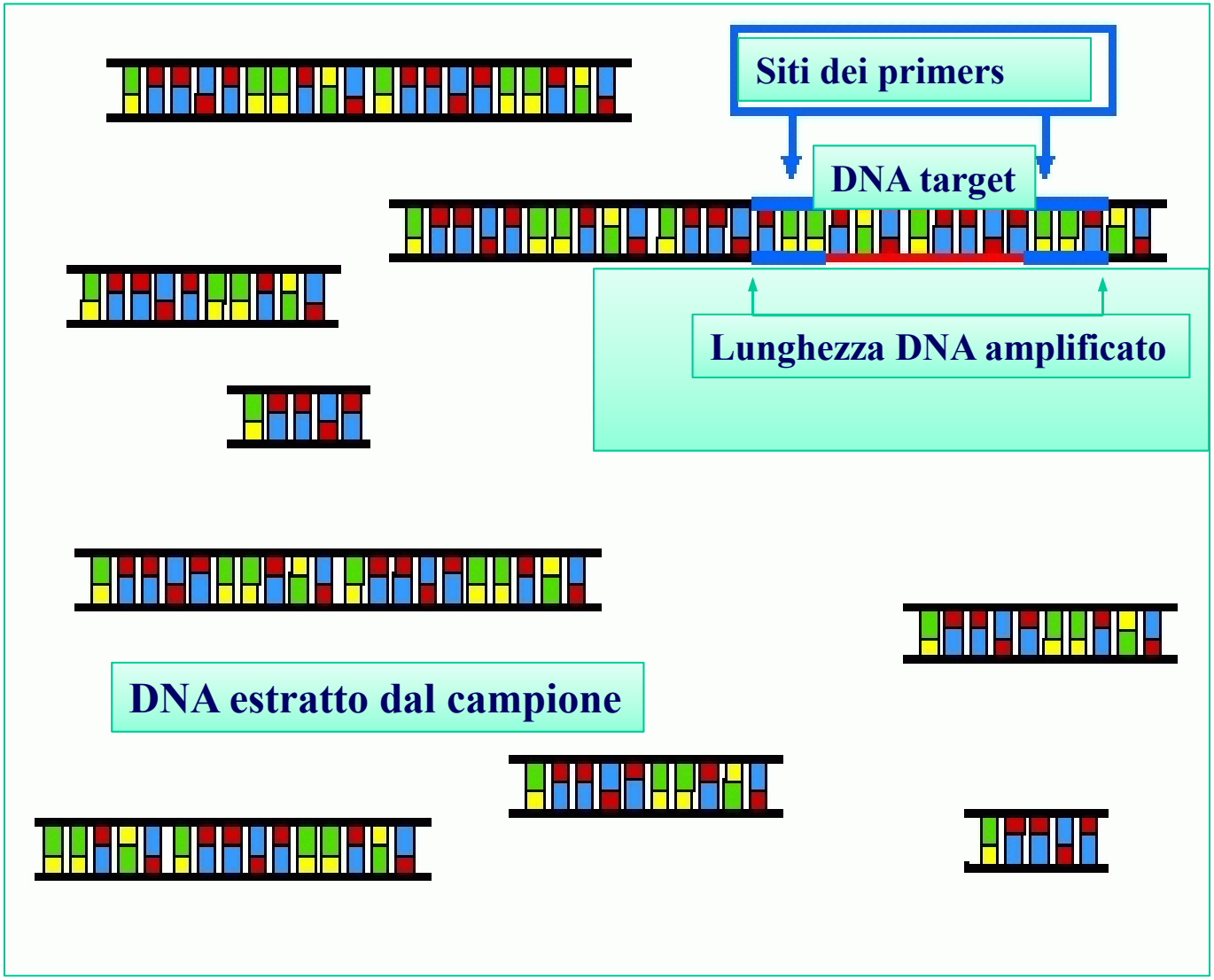
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



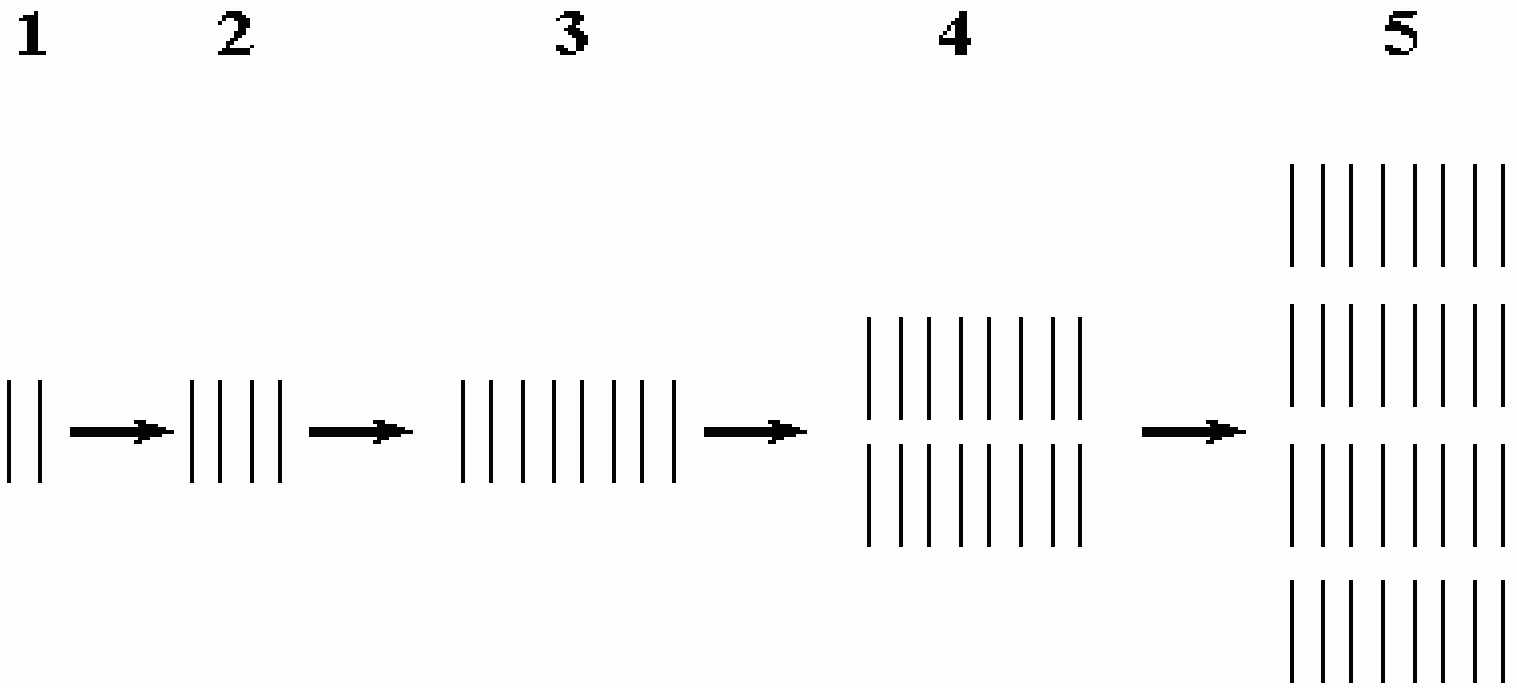
IL PROCESSO SI RIPETE




1
2
3
4


Siti dei primers
DNA target
Lunghezza DNA amplificato
DNA estratto dal campione

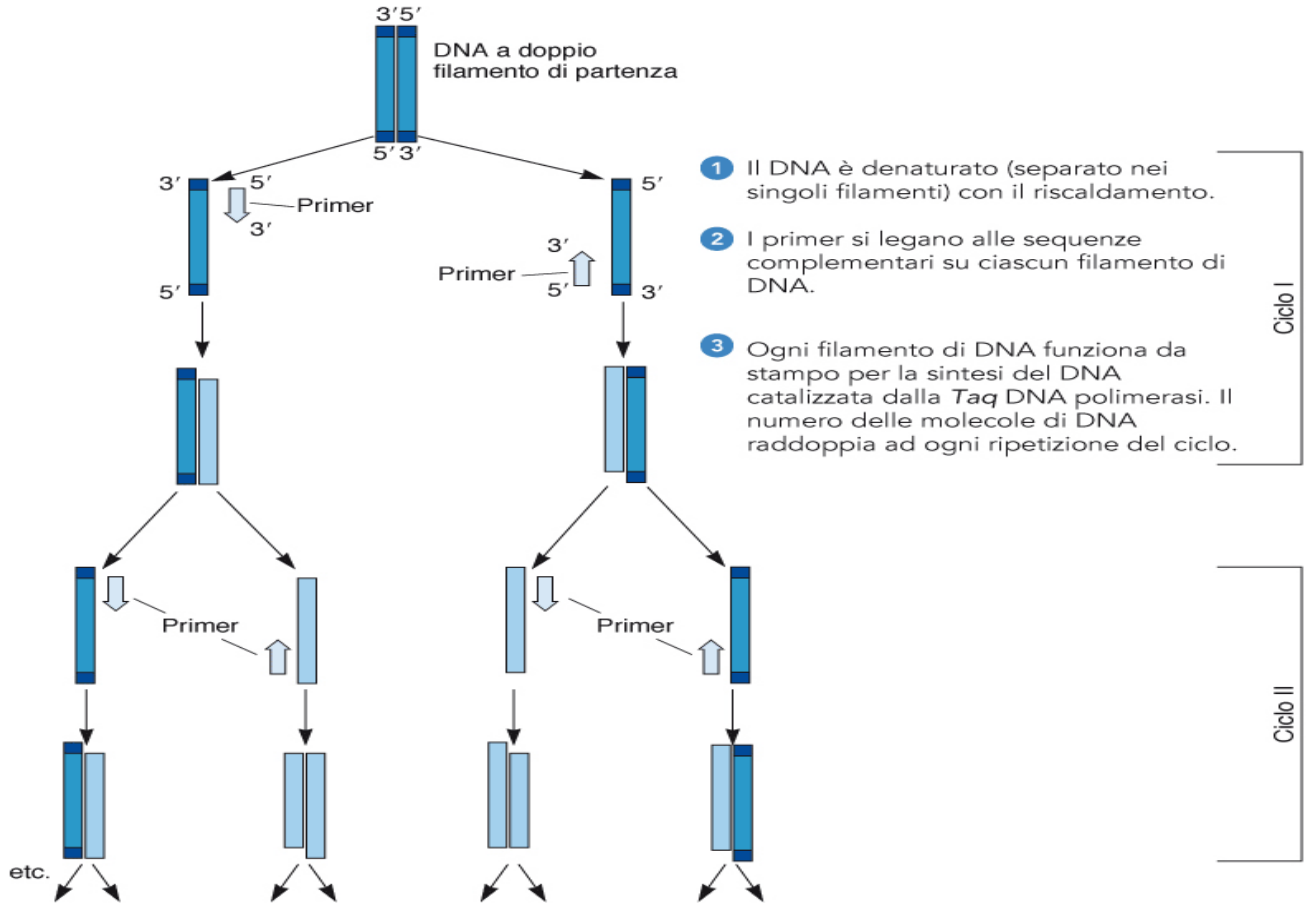
Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA “copiato” raddoppia



- PCR

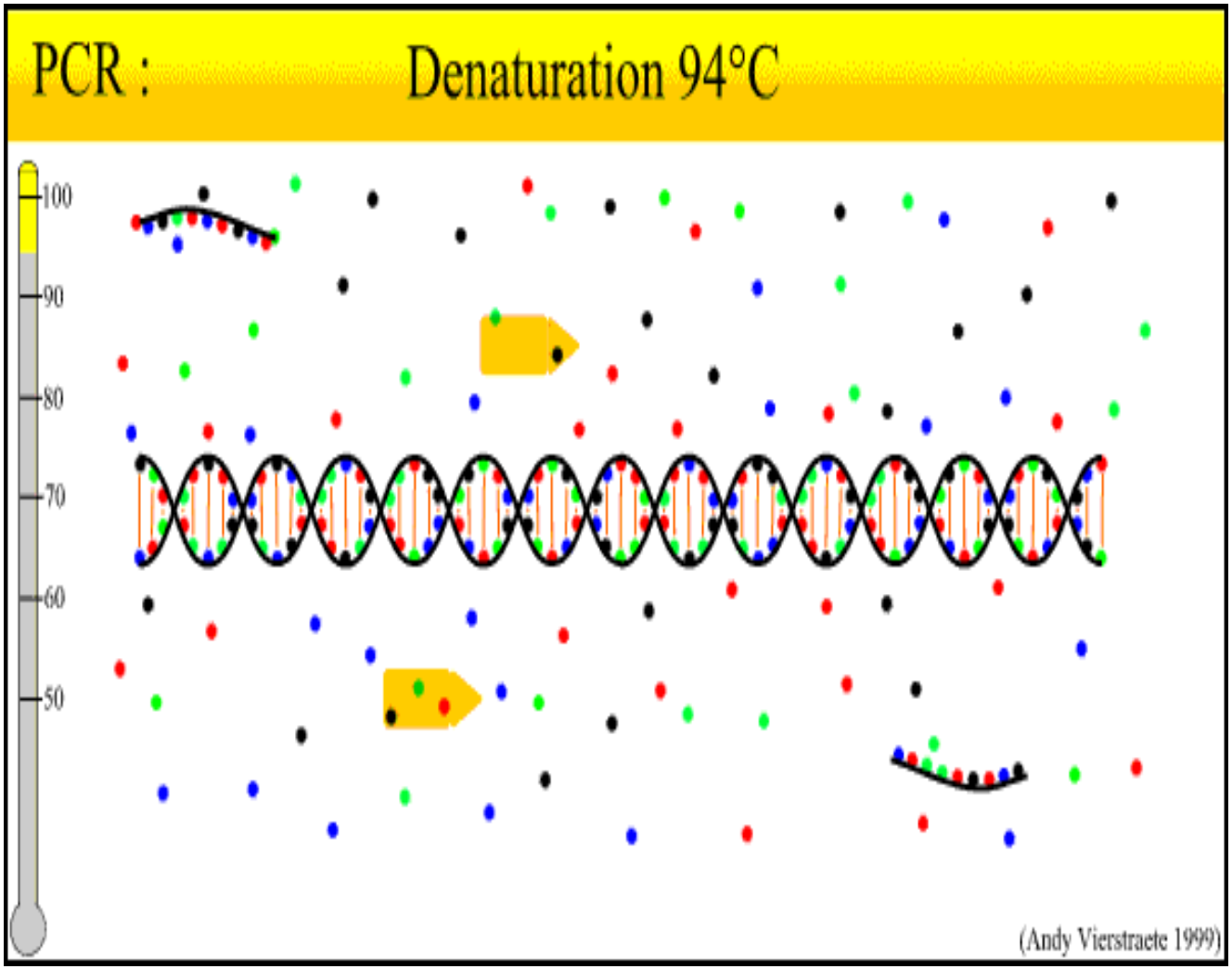
METODO DI RICERCA

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



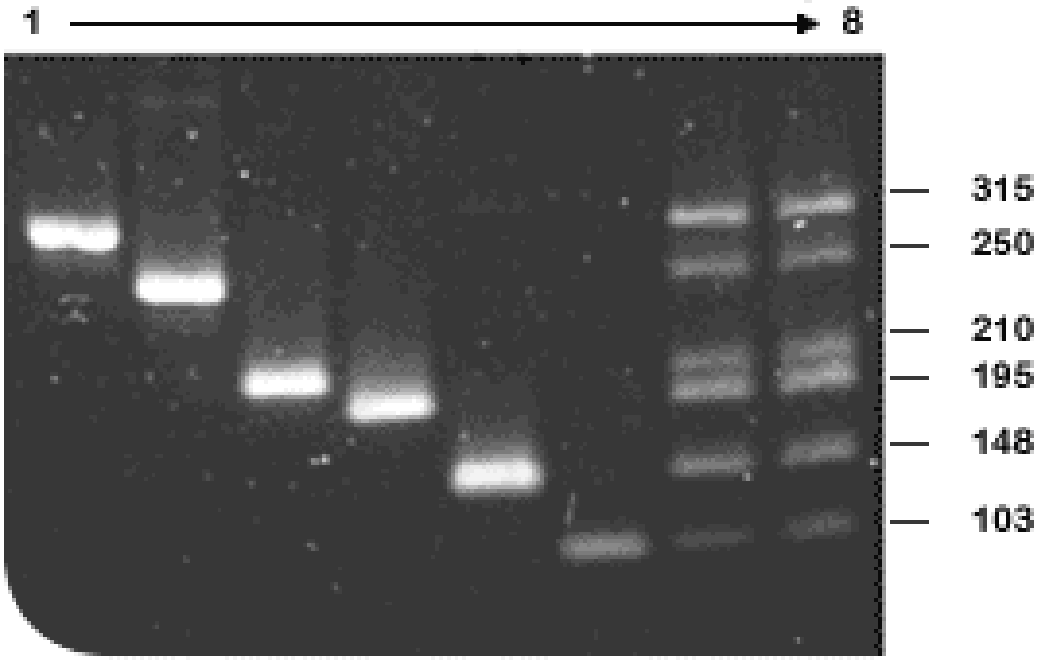
Come funziona? La miscela di reazione iniziale include una piccolissima quantità di DNA a doppio filamento, i precursori del DNA (deossiribonucleotidi), specifici primer di acido nucleico e la *Taq* DNA polimerasi termostabile. La reazione di PCR coinvolge ripetuti cicli di denaturazione, attacco dei 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
100
90
80
70
60
50
(Andy Vierstraete 1999)

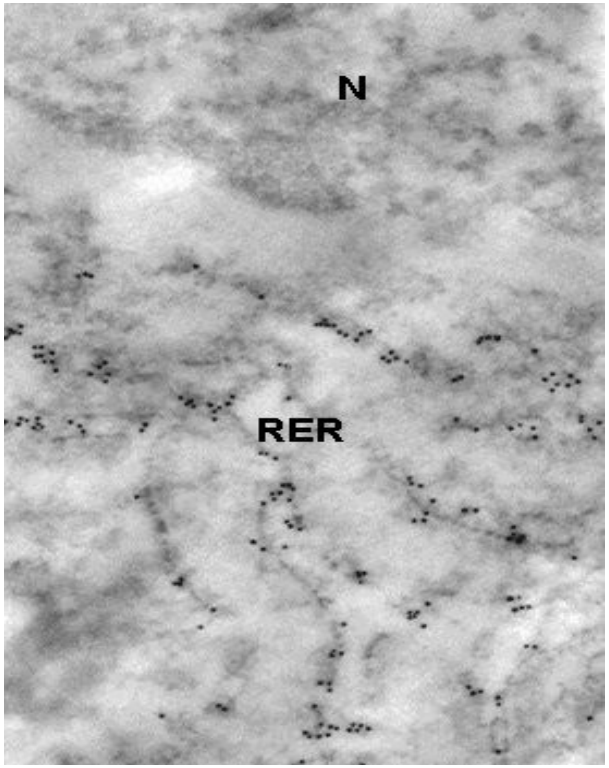
PCR MULTIPLEX

- 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



Termociclatori

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

- Formazione del cDNA

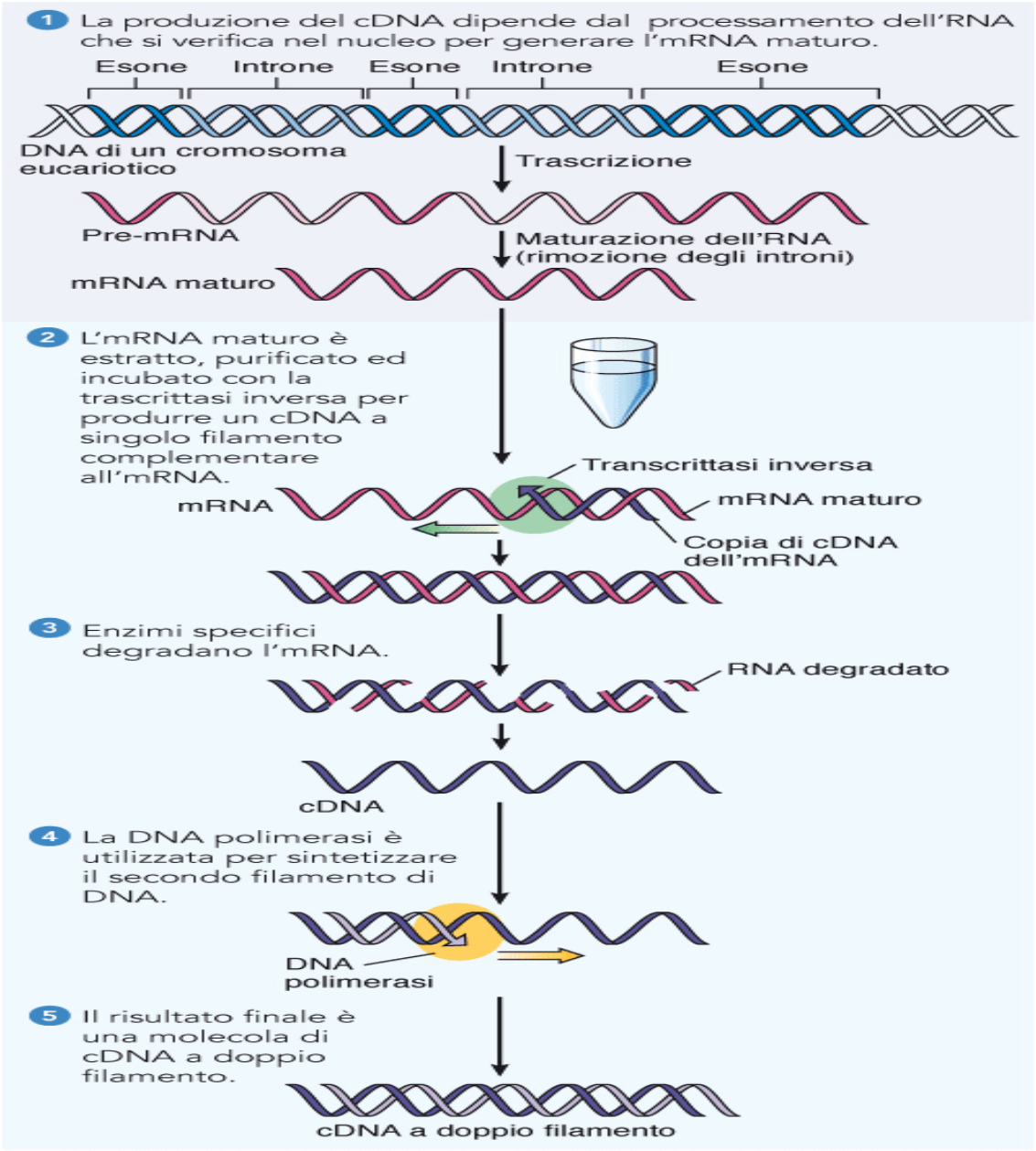


FIGURA 15-6 Formazione del cDNA

Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

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

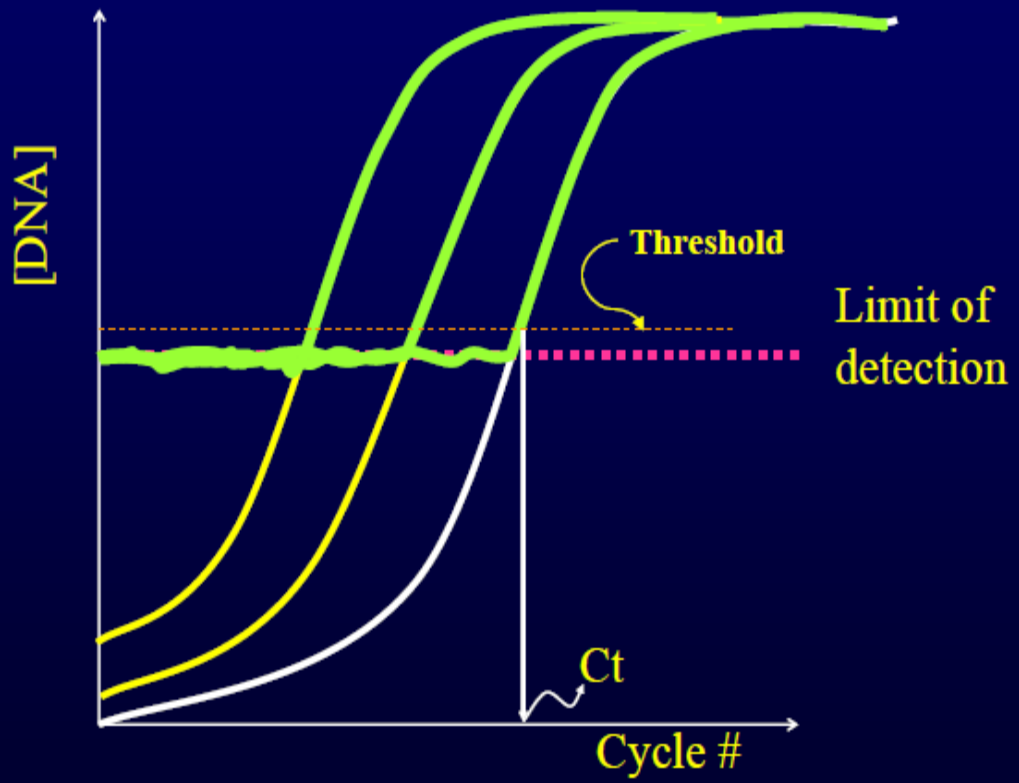
Basata sulla quanficazione di fluorescenza

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

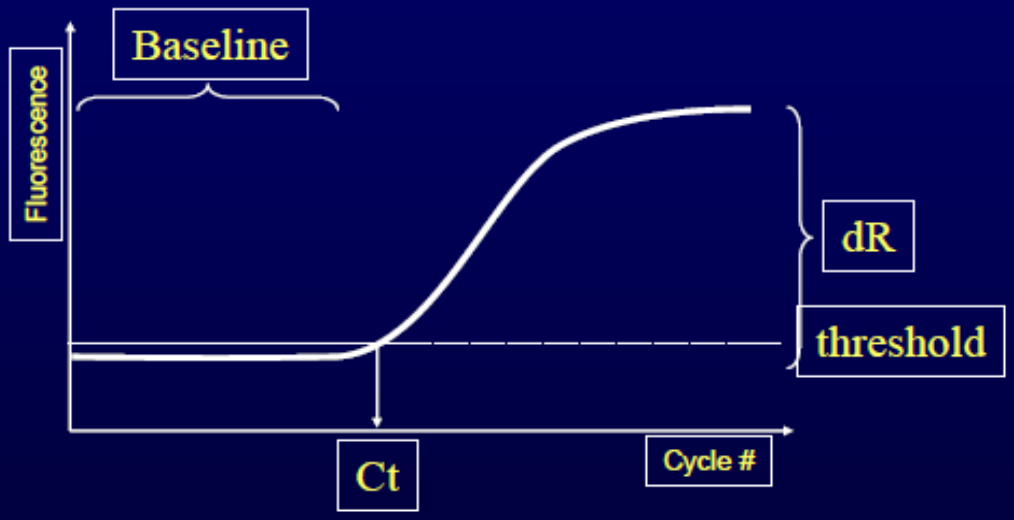
Il ciclo soglia correla con il DNA iniziale

A concentrazione alta di DNA iniziale si ha 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.

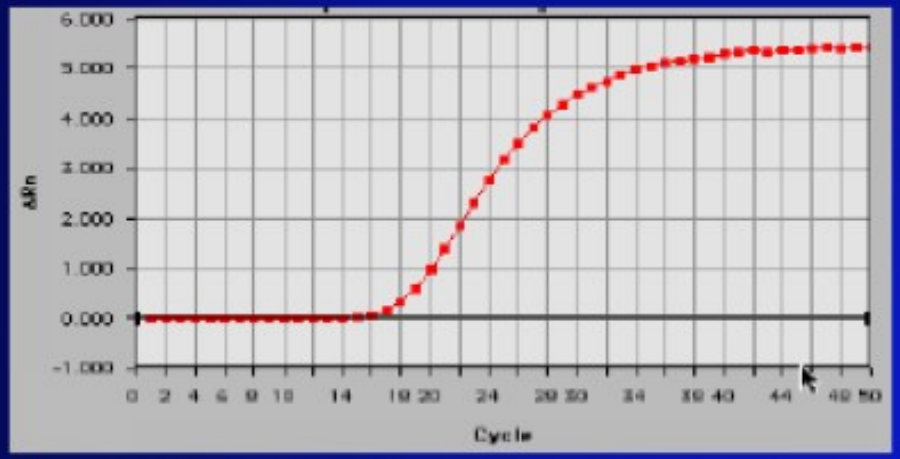
- It is the parameter used for quantitation
- C_t value of 40 or more means no amplification and cannot be included in the calculations

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

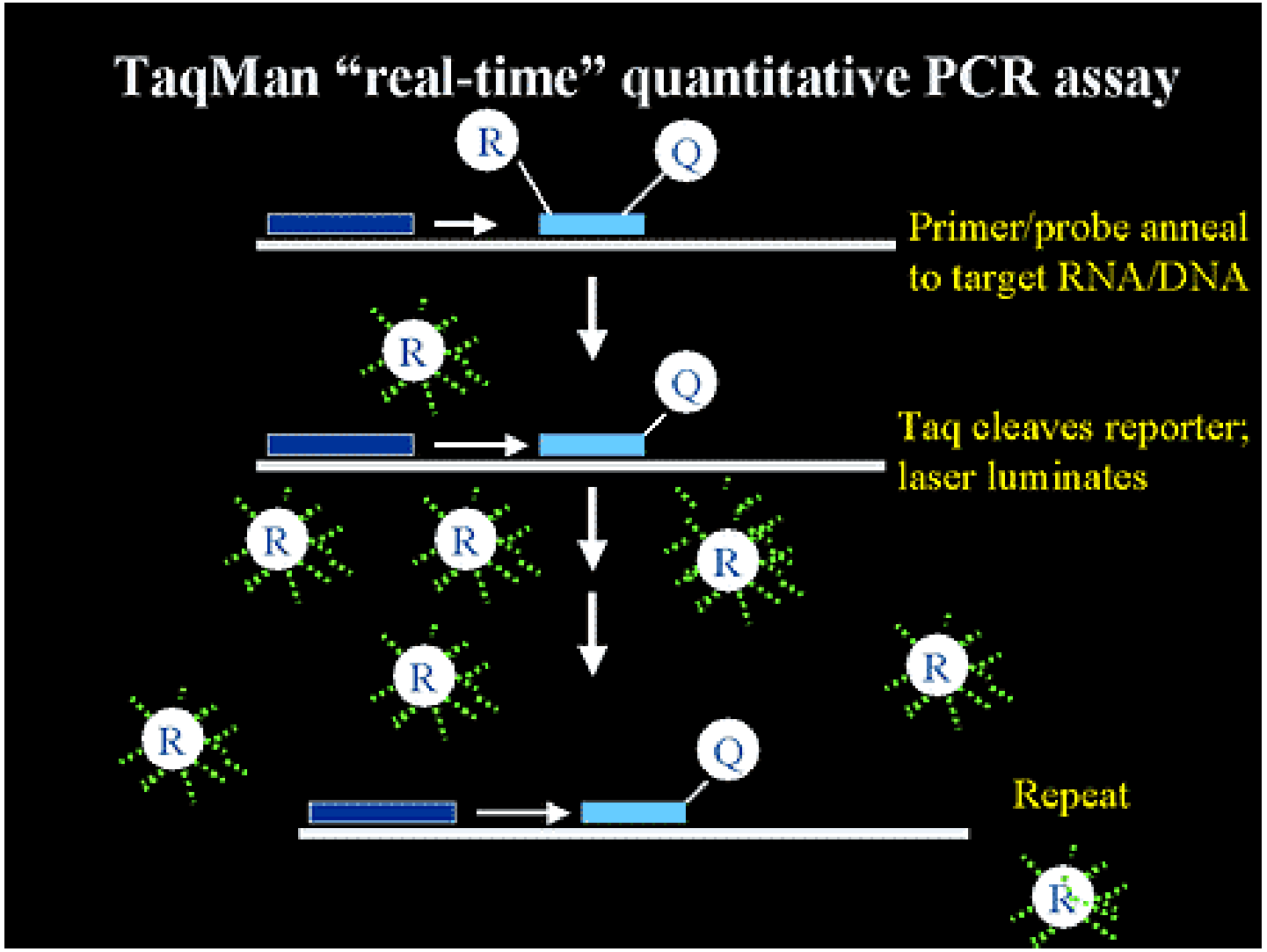
Increasing fluorescence

Linear plot



PCR cycle

Real Time PCR

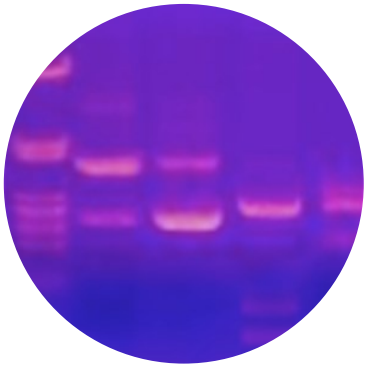


Alcune Tecnologie del DNA

- Estrazione di acidi nucleici
  - » DNA
  - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
  - Qualitativa
  - RT-PCR: Formazione del cDNA
  - Real time-PCR
  - ddPCR

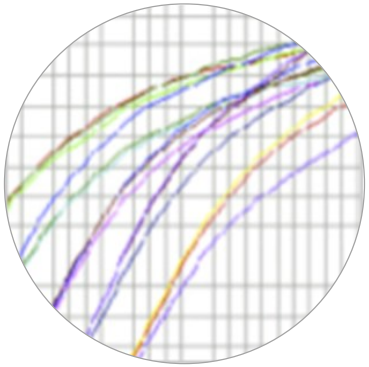
Droplet Digital PCR (ddPCR)

Prima
1983



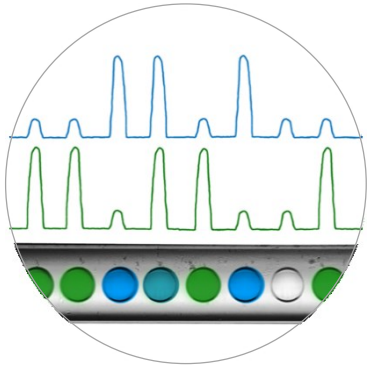
PCR
Qualitativa

Seconda
1996



Real-time PCR (RT-qPCR)
Quantificazione Relativa

Terza
2011



Droplet Digital PCR (dd PCR)
Quantificazione Assoluta

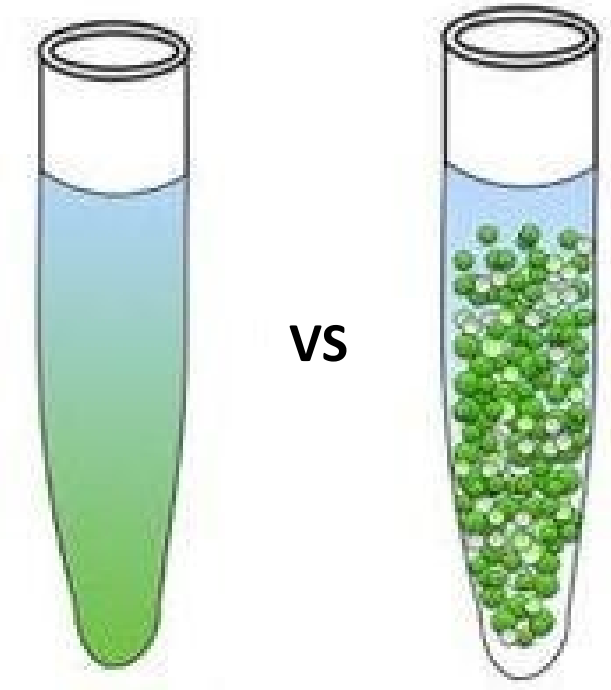
I Principi della Droplet Digital PCR

È una nuova tecnologia emergente che partiziona il campione in migliaia di piccole goccioline (droplet) indipendenti dividendo le molecole di acido nucleico in regioni distinte.

Metodi tradizionali

- ✓**Campione**
- ✓**Primers**
- ✓**Sonda Fluorescente**
- ✓**DNA Polimerase**
- ✓**dNTPs**

In un unico sistema omogeneo



VS

ddPCR

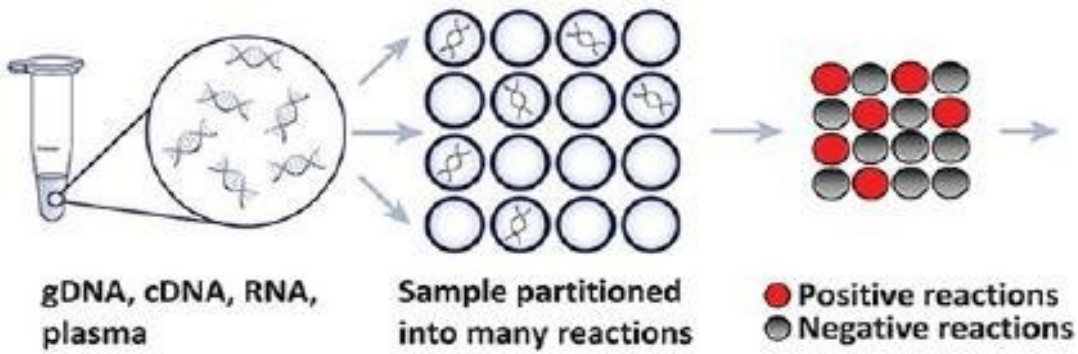
- ✓**Campione**
- ✓**Primers**
- ✓**Sonda Fluorescente**
- ✓**DNA Polimerase**
- ✓**dNTPs**

Separati in circa 20.000 goccioline

Vantaggi!

- **Conta delle molecole**, con quantificazione assoluta del campione, espressa come n° di copie/uL
- Singola amplificazione per ogni molecola di DNA riducendo i problemi di competizione
- **È ultrasensibile e più accurata** e precisa rispetto alle precedenti tecniche, permettendo di identificare eventi rari
- Ha **molte applicazioni** tra cui l'individuazione e la quantificazione:

  - ✓ dei **patogeni** di basso livello
  - ✓ di sequenze genetiche rare
  - ✓ di **variazioni del numero di copie**
  - ✓ dell'espressione genica relativa in singole cellule

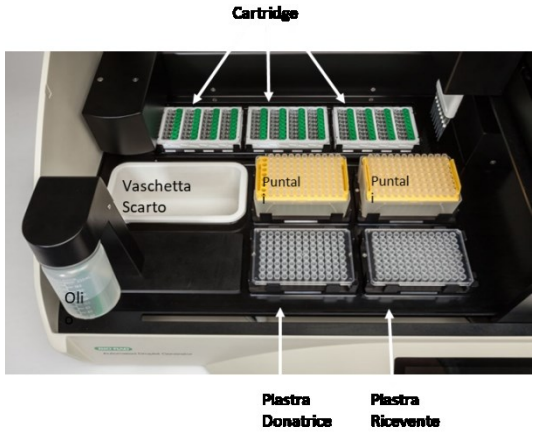


Sistema Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR

Generatore Automatico di Droplet

Emulsiona il campione dividendo la reazione in migliaia di goccioline

Formazione della goccia



Cartridge

Termociclatore

Sealer

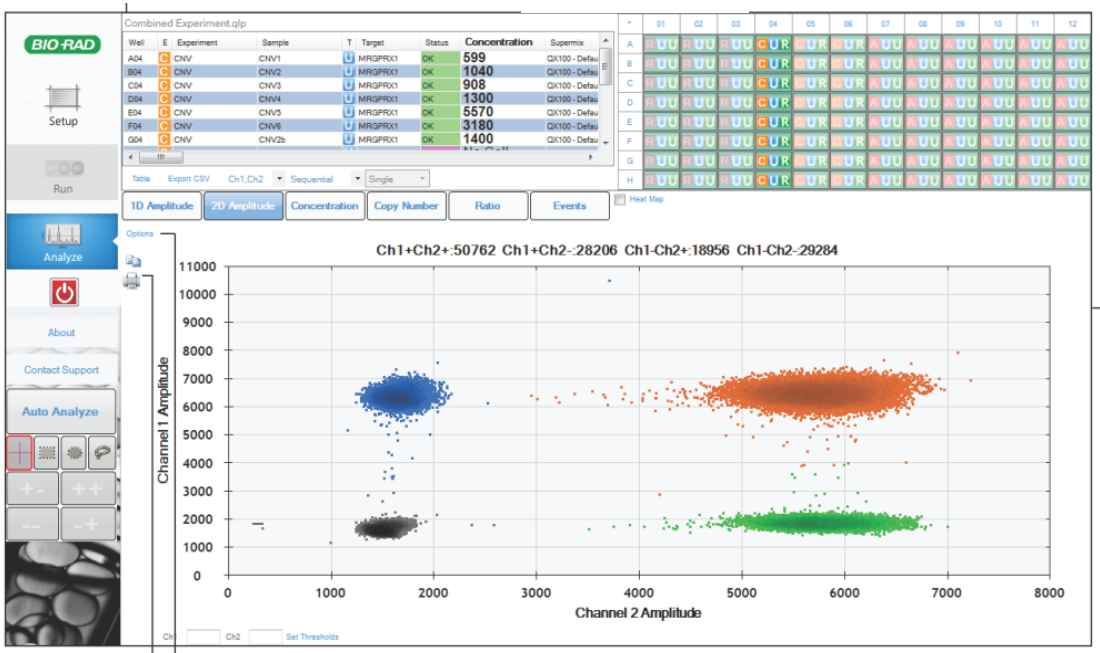
Legge la fluorescenza delle singole droplet

Sistema Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR

Analisi dei Dati

Tabella dei Dati Grezzi

Selettore di Pozzetti



Interfaccia Analisi dei Dati

Opzioni Asse delle Y

Stampa Grafico

PCR

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”).

PCR

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