

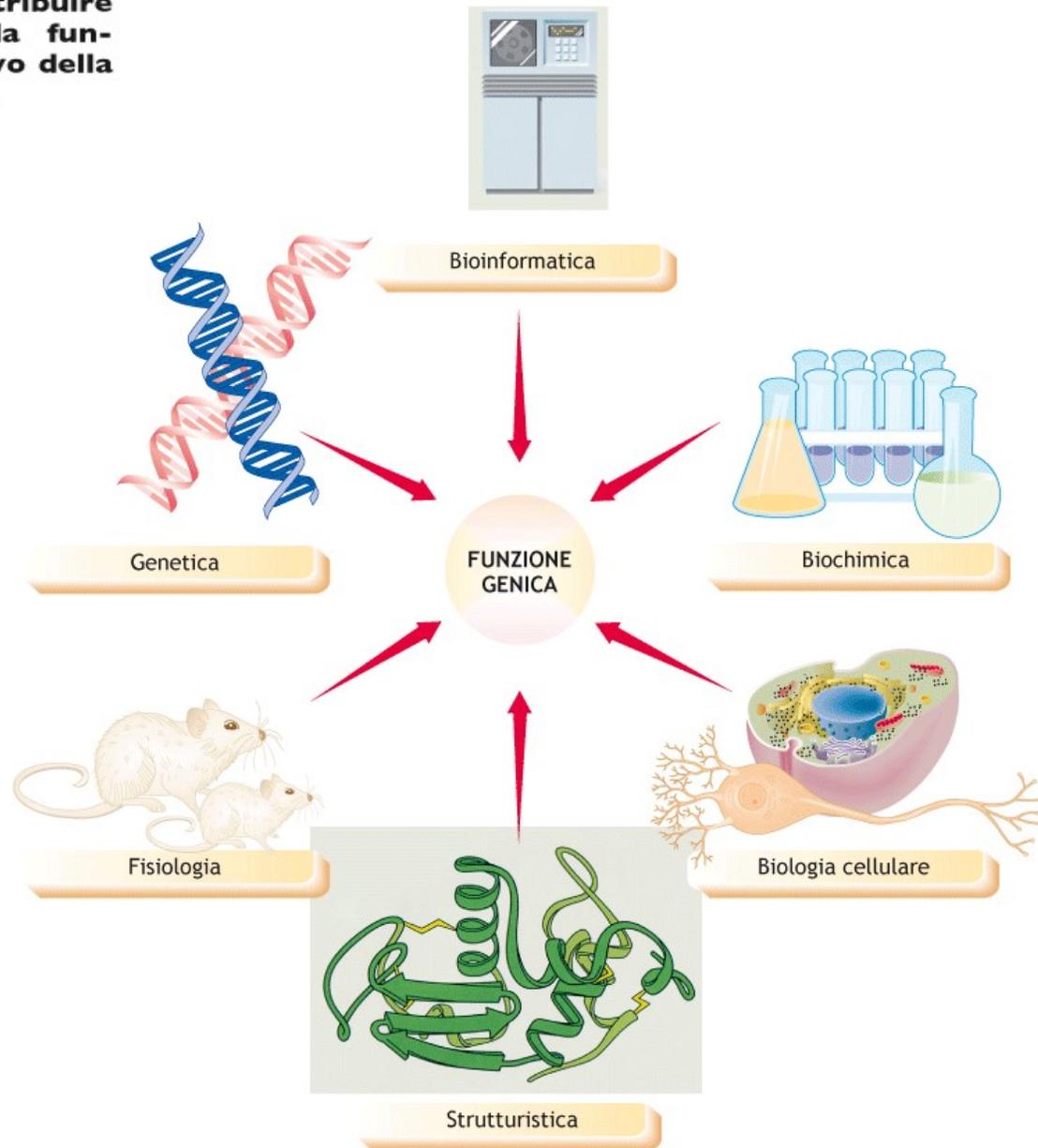


Tecnologia del DNA e la genomica

Principi di Biologia e Genetica
Scienze Motorie
a.a 2021-22
Dr ssa Elisa Mazzoni, PhD



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



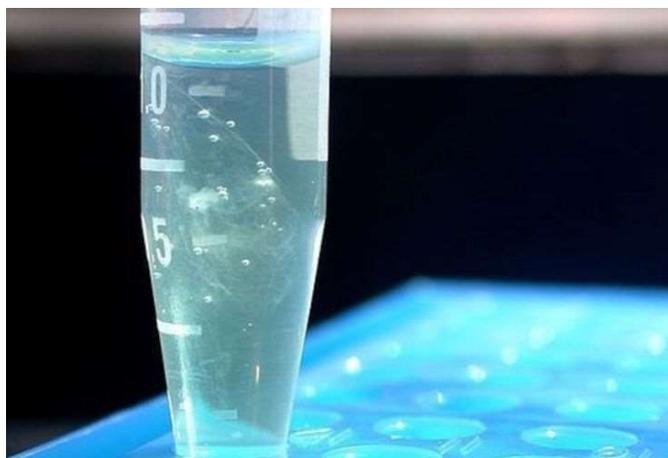
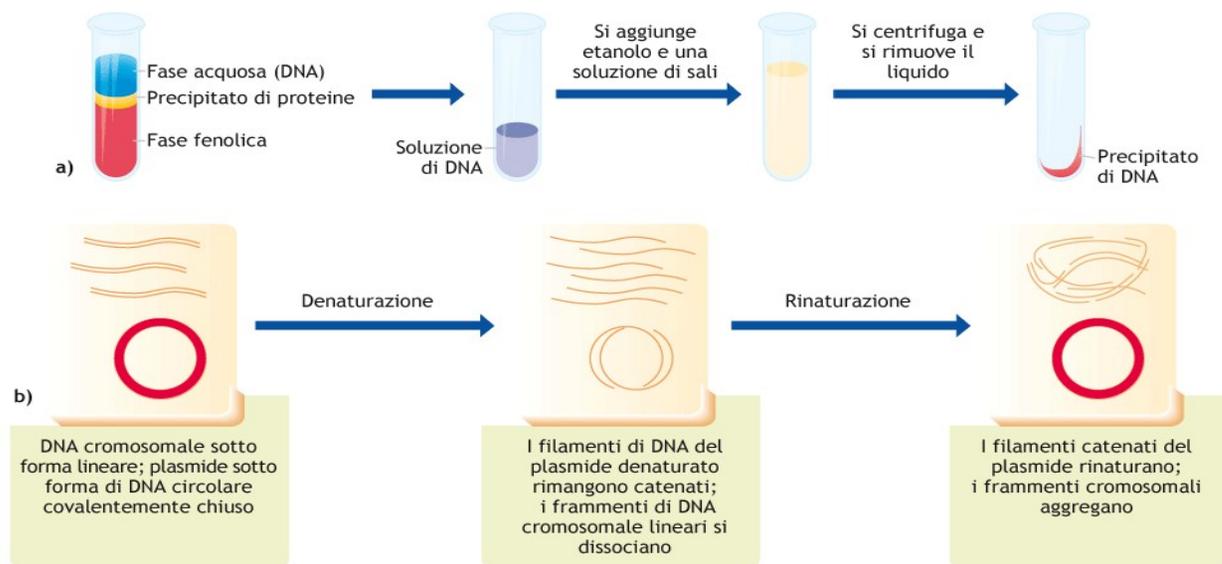
Alcune Tecnologie del DNA

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



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/clorofornio. 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 ridissolto. **(b) Il metodo della lisi alcalina per la purificazione di DNA plasmidico da cellule batteriche.**



Estrazione del DNA mediante kits



QIAamp Procedures

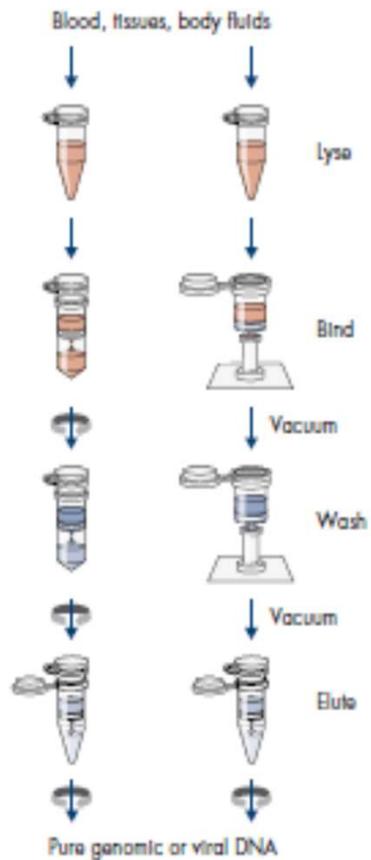


Figure 3. Fully automated nucleic acid purification using QIAamp genomic DNA kits. The QIAcube enables walkaway automation of many QIAGEN spin-column procedures. Visit www.qiagen.com/MyQIAcube for more information.

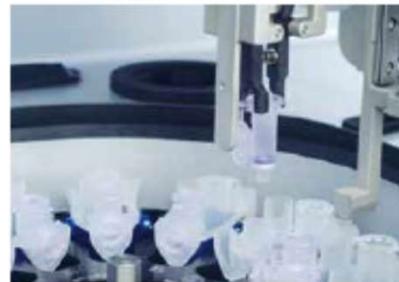
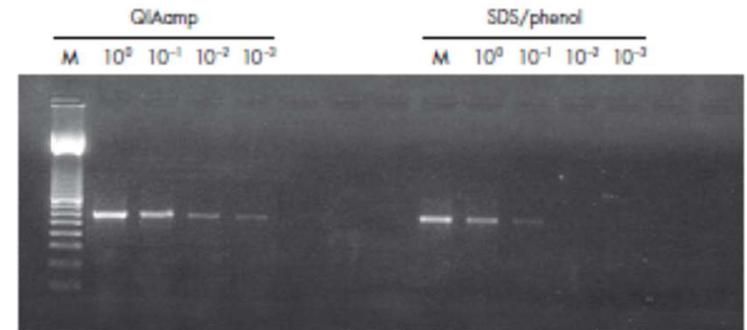
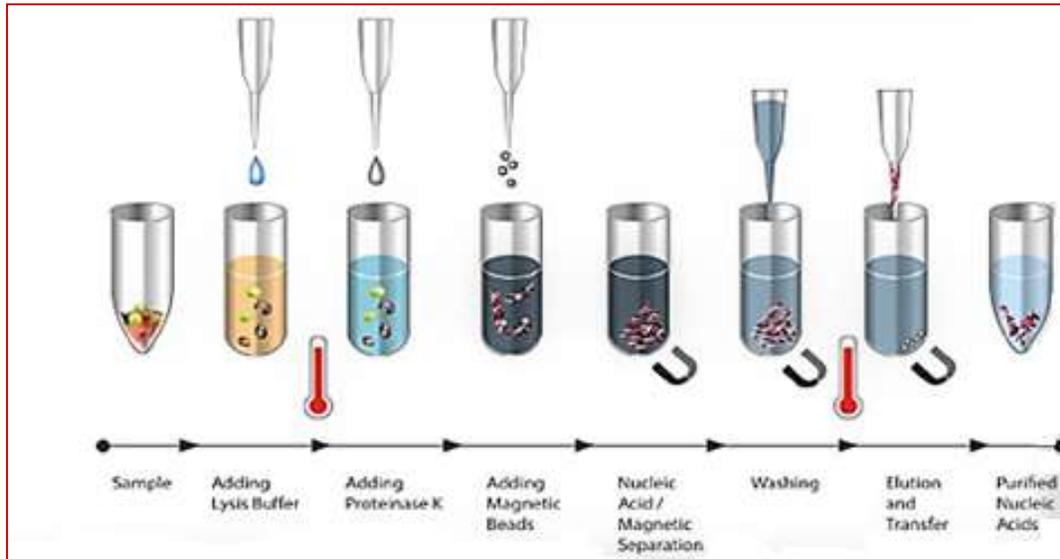
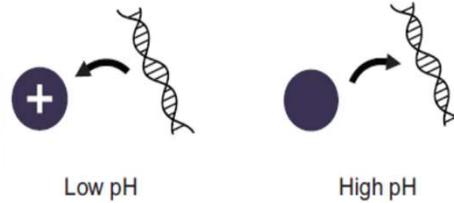


Figure 5. Freedom from laborious manual tasks. The QIAcube is equipped with an automated centrifuge and pipetting system. No manual handling steps are required during the QIAcube run.



Estrazione di DNA da siero



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



Taglio del DNA con enzimi di restrizione

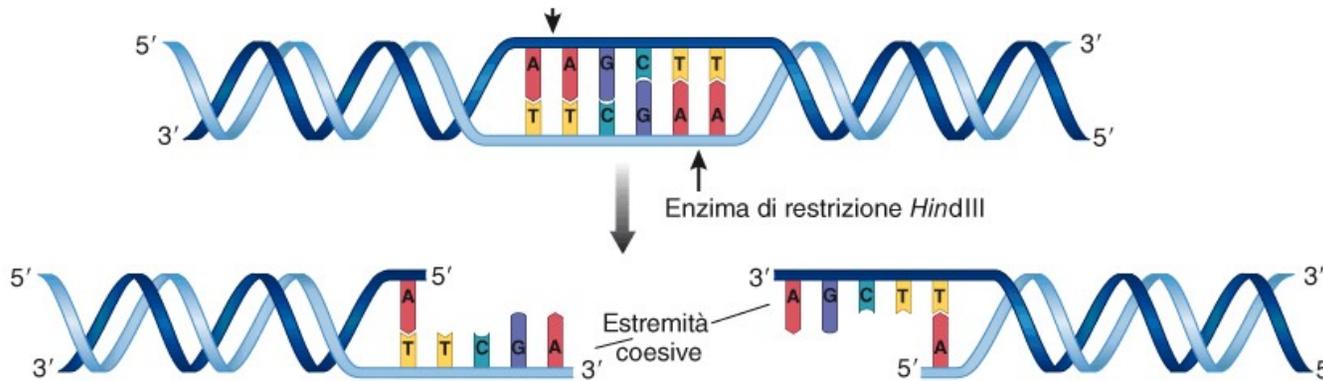


Figura 15-1
Taglio del DNA con un enzima di restrizione

Molti enzimi di restrizione, come *Hind*III, 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

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 AATTCTTCTAGCT
TCCGAGATCTTAA GAAGATCGA

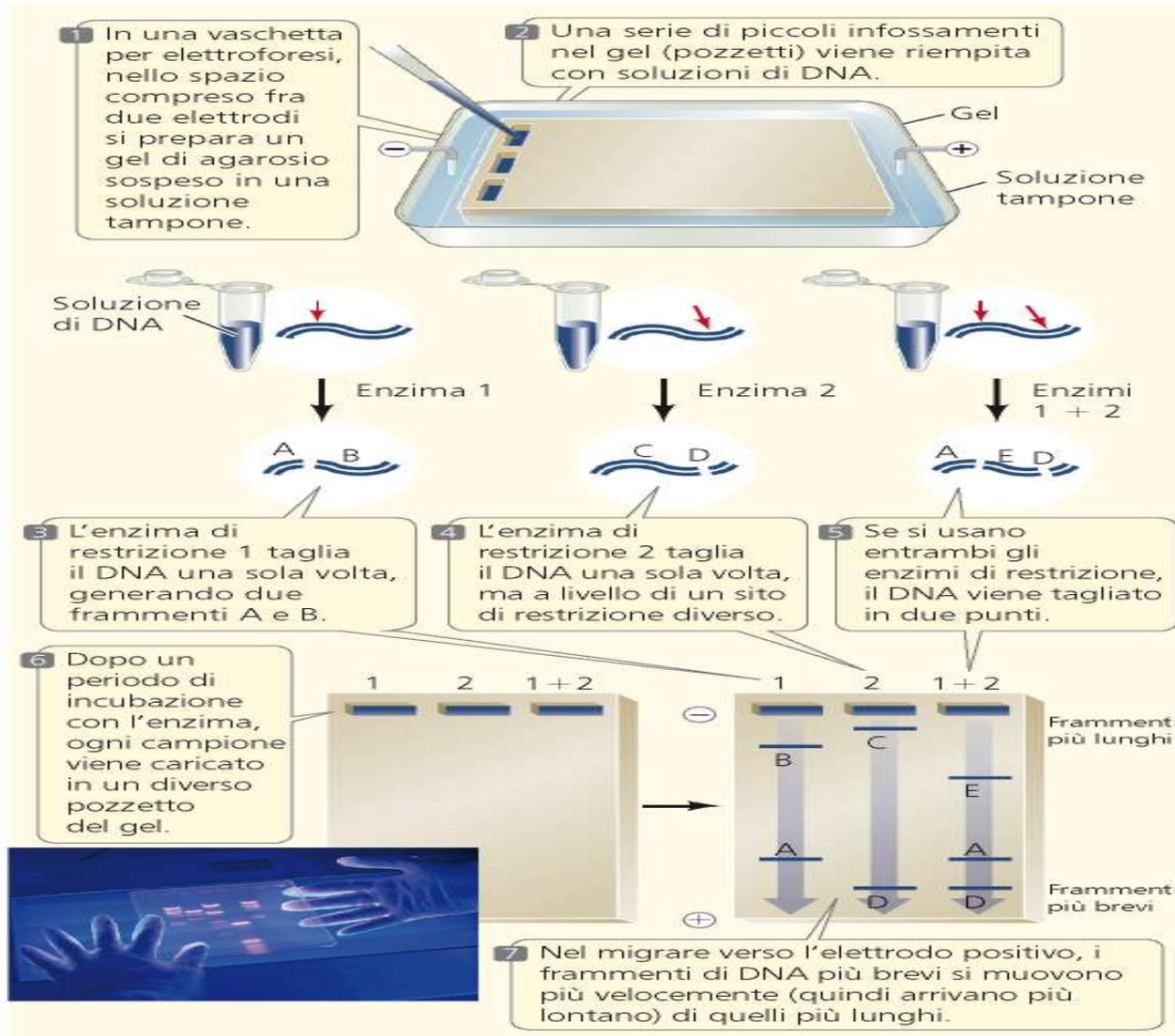
CGATCCAGGAATTCTTCTAGCT
GCTAGGTCCTTAAGAAGATCGA

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.

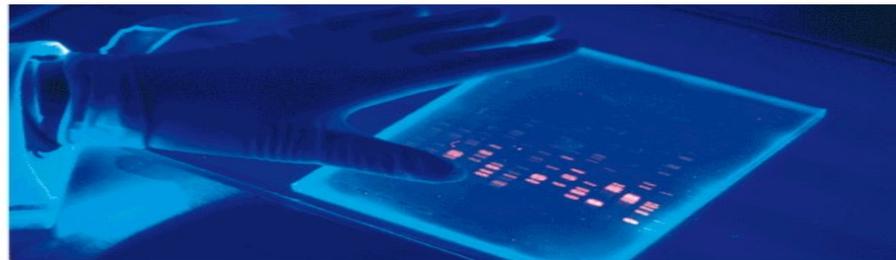
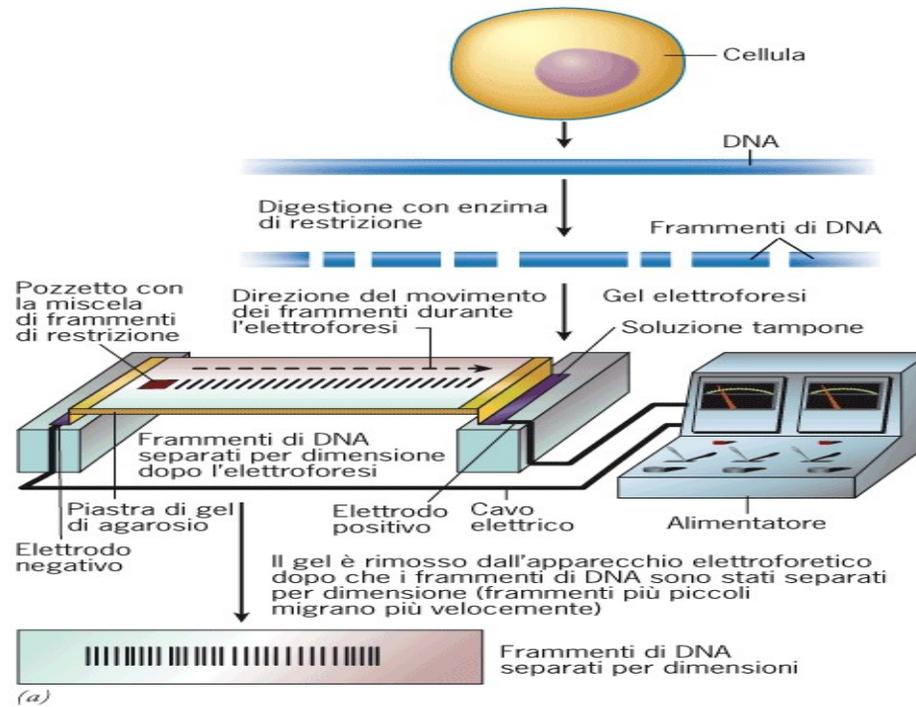
2 I due frammenti separati del DNA portano appendici di basi non appaiate, che costituiscono "estremità adesive".



Taglio del DNA con enzimi di restrizione



Elettroforesi su gel



(b)

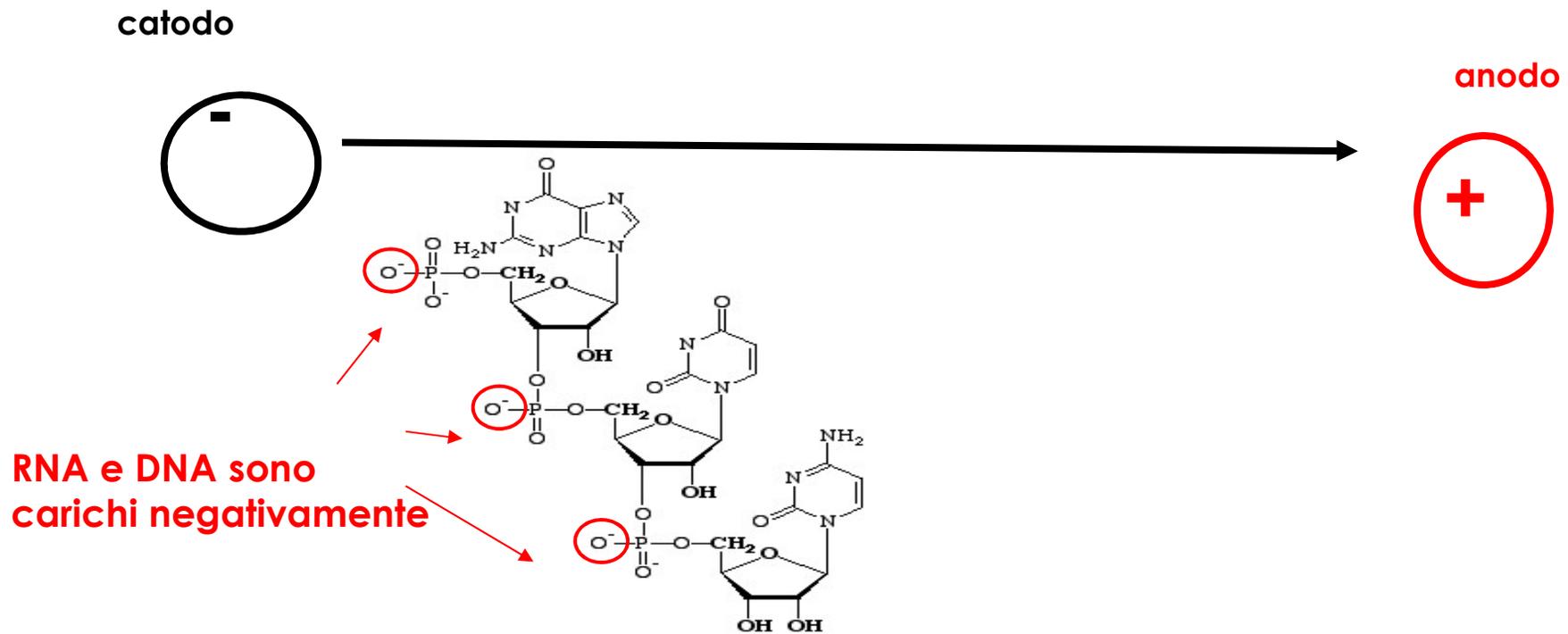
Figura 18.34 Separazione di frammenti di restrizione di DNA con elettroforesi su gel. (a) Il DNA è incubato con un enzima di restrizione, che lo taglia in frammenti. La miscela di frammenti è introdotta in un pozzetto su una lastra di agarosio e viene applicata corrente. Le molecole di DNA cariche negativamente 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).



Elettroforesi

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

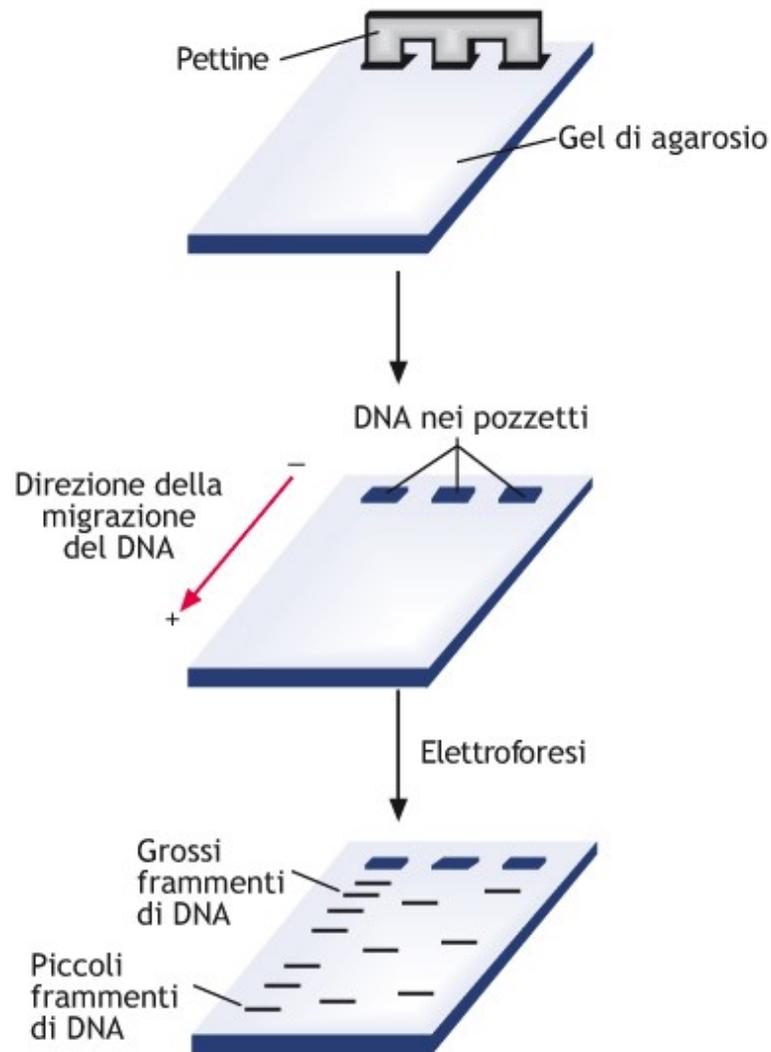


Figura I.14.2.1 Gel elettroforesi in agarosio. L'agarosio disciolto è colato in uno stampo che contiene un pettine. Dopo che il gel si è formato, il pettine è rimosso per creare i pozzi nei quali saranno caricati i campioni di DNA. Si applica quindi una corrente elettrica per spostare il DNA carico negativamente 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

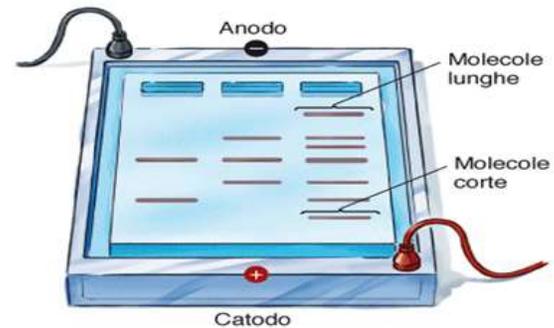
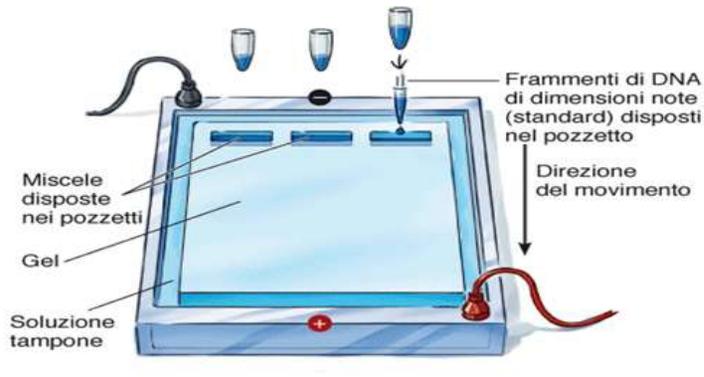
Perché si usa?

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 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.



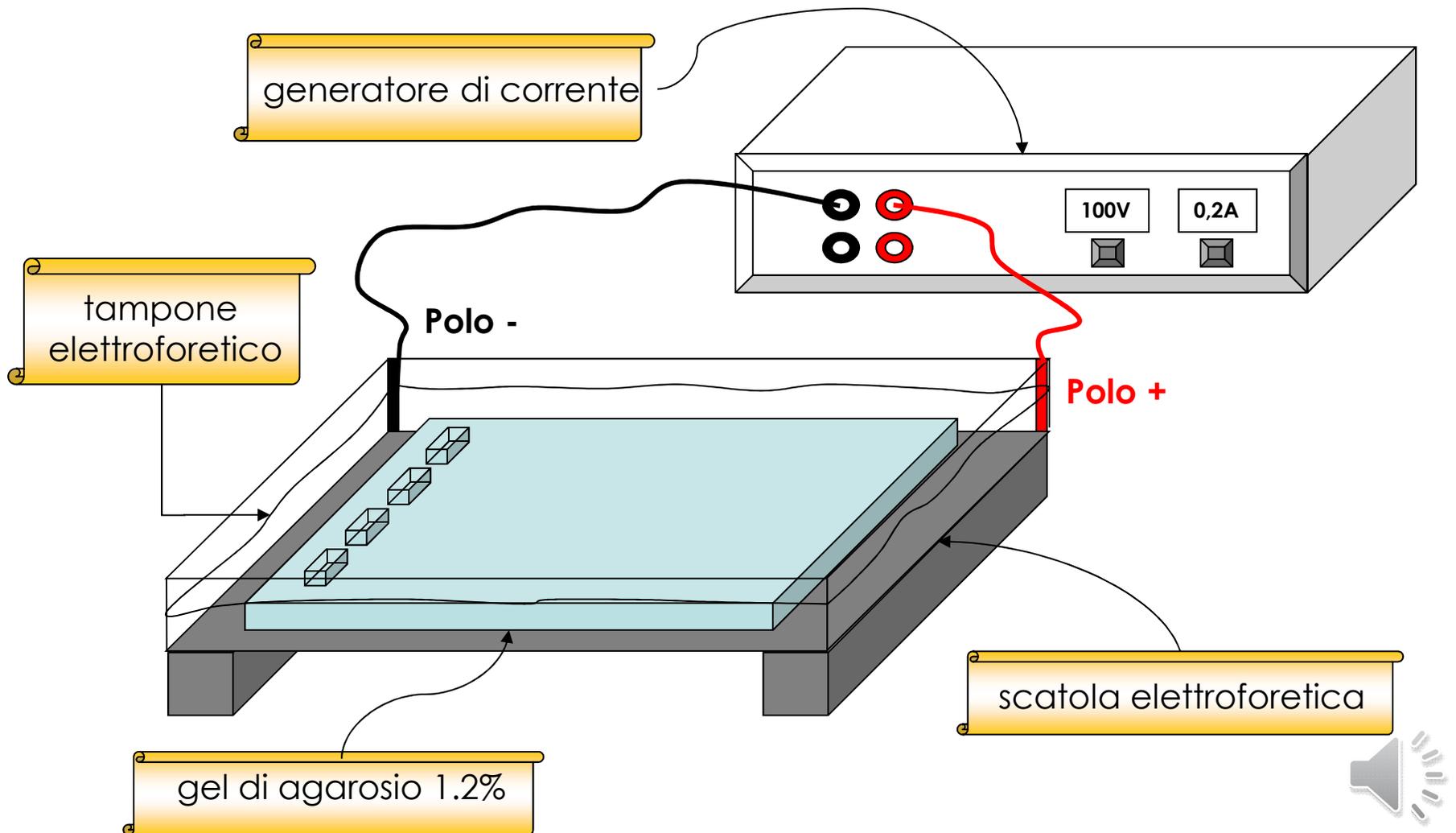
3 Questo gel contiene frammenti di DNA separati per elettroforesi. Il gel è colorato con bromuro di etidio, un colorante che lega il DNA ed è fluorescente quando esposto a luce UV.



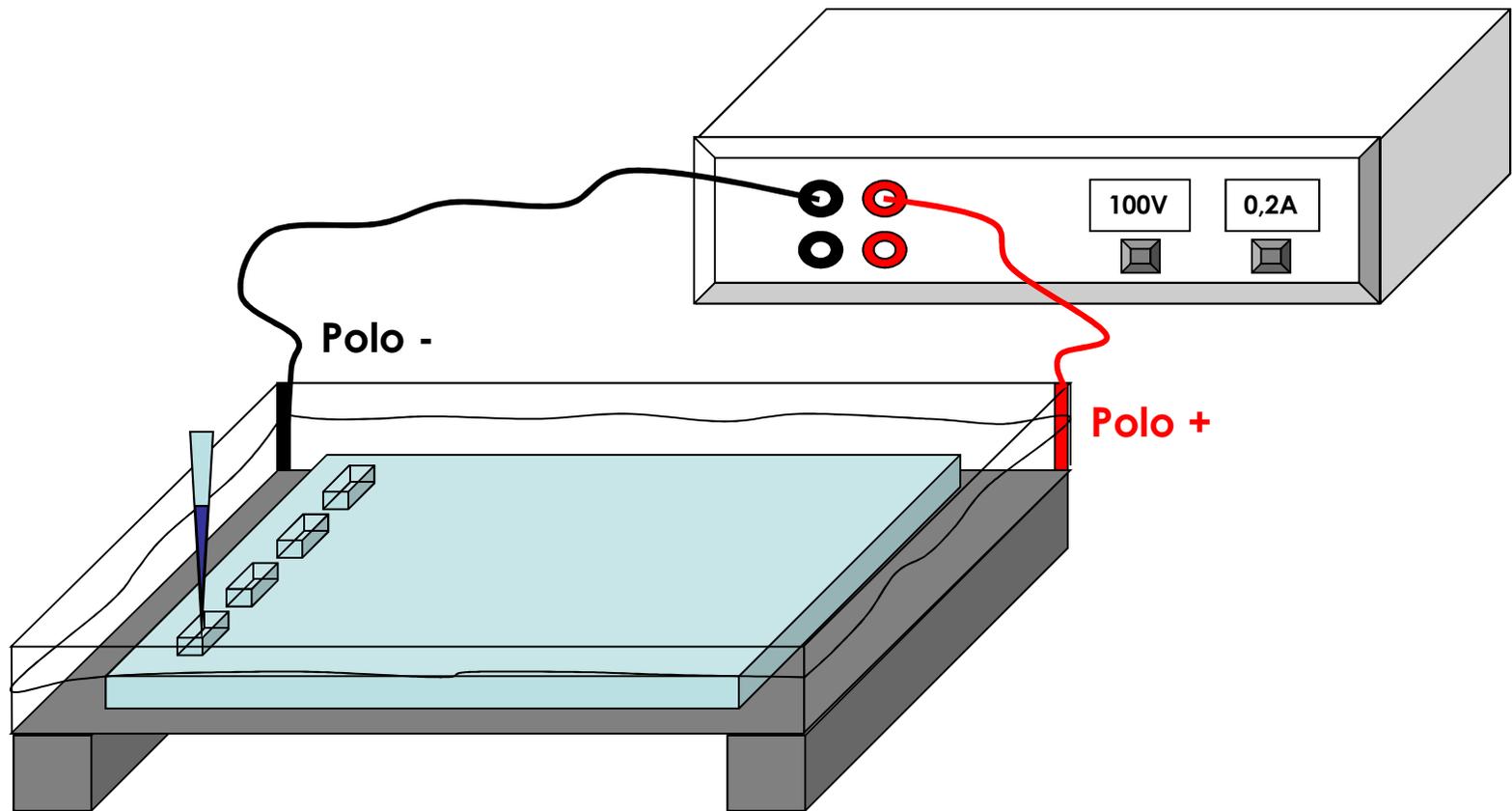
FIGURA 15-8 L'elettroforesi su gel



SCHEMA APPARATO PER ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



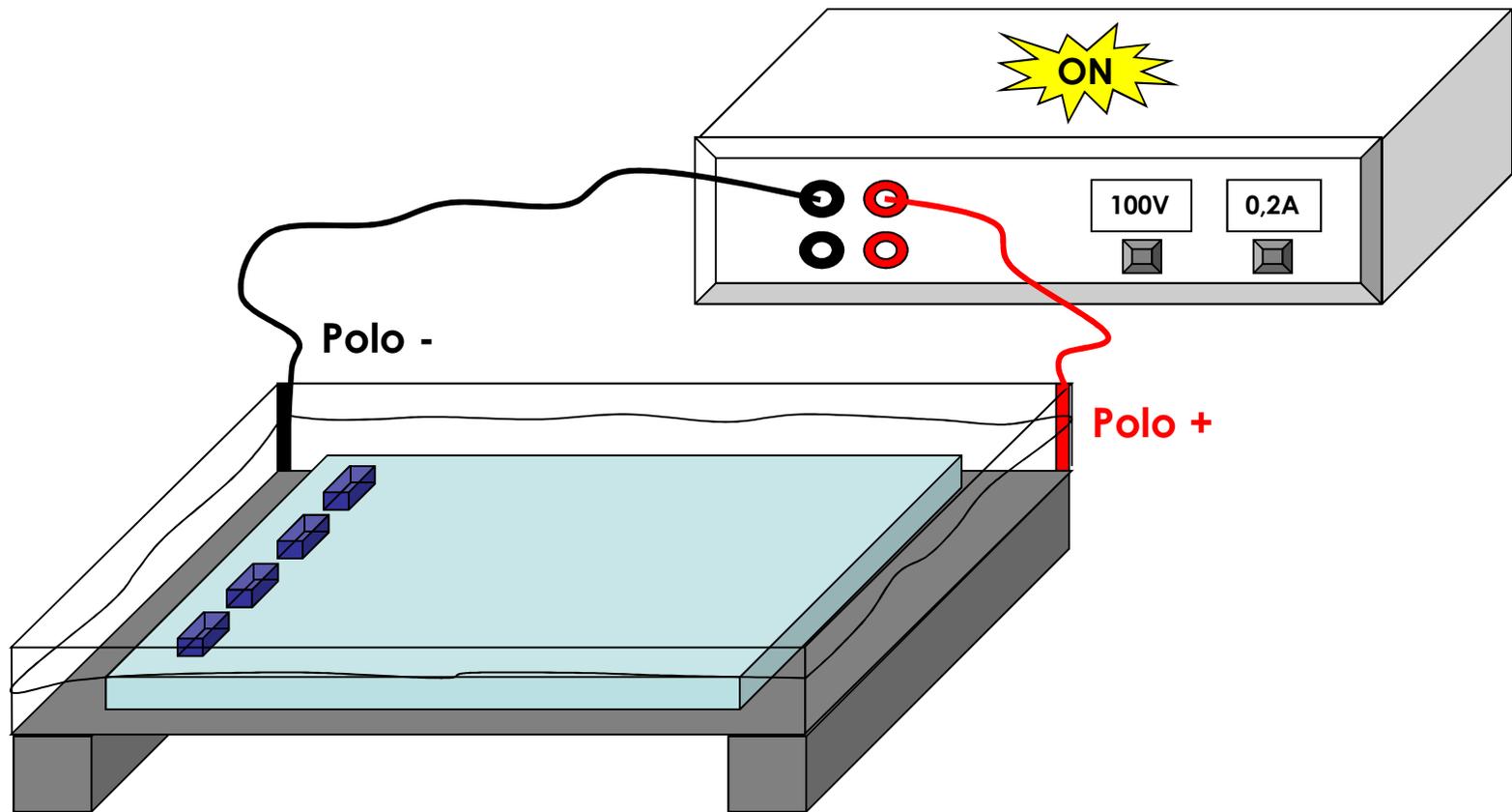
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



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.



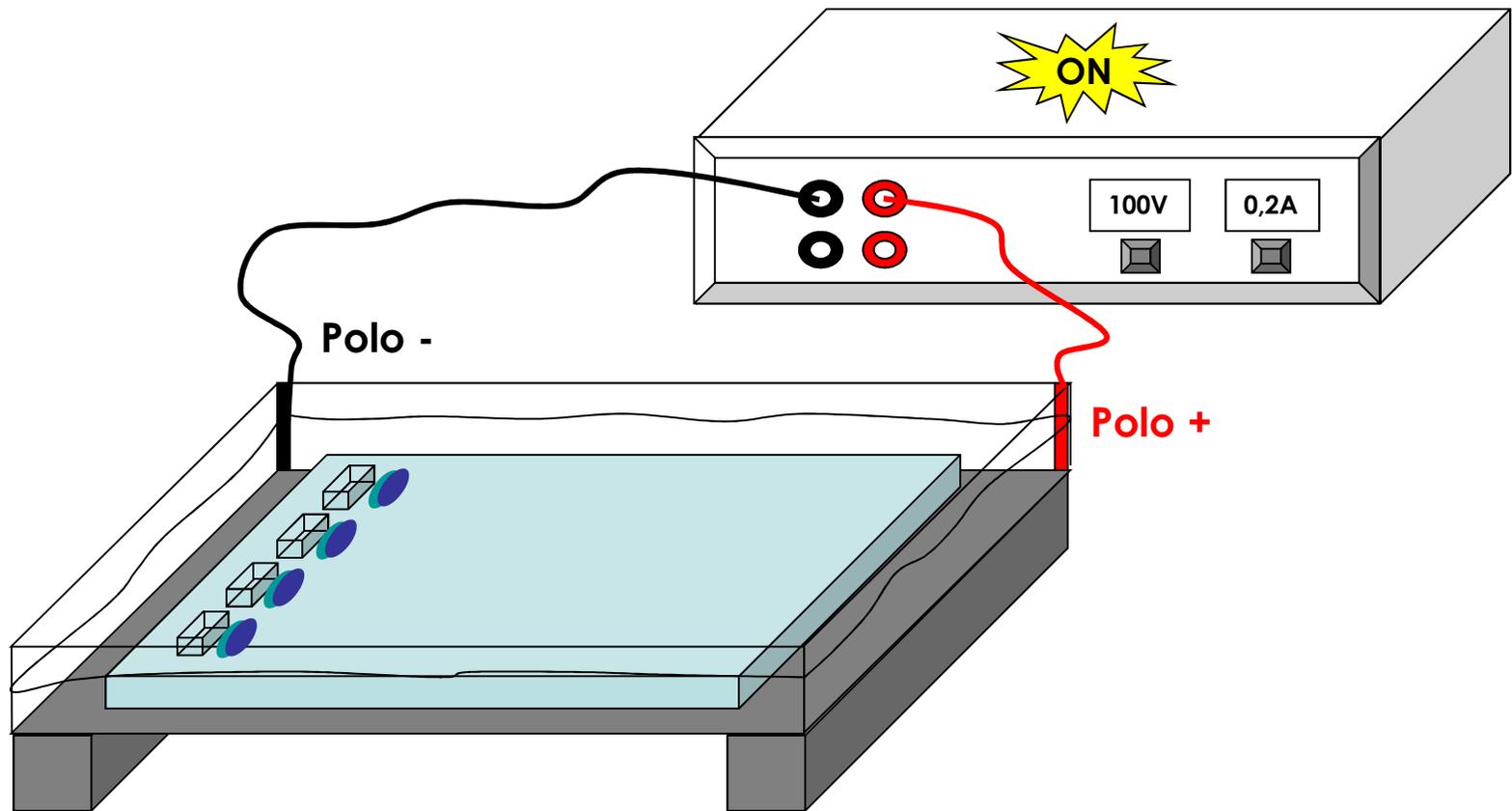
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



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.

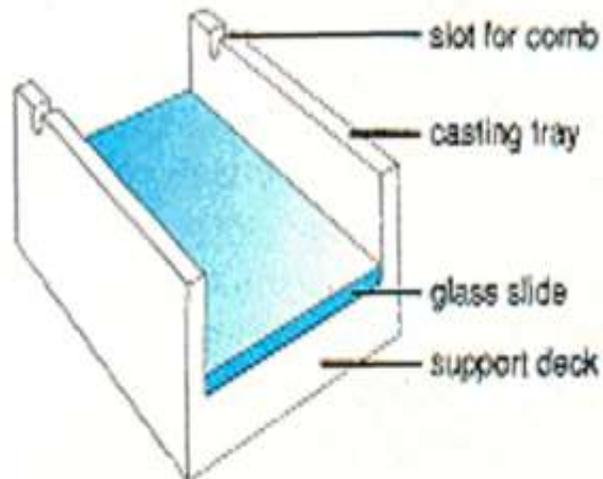


METODO: FORMAZIONE DEL GEL DI AGAROSIO

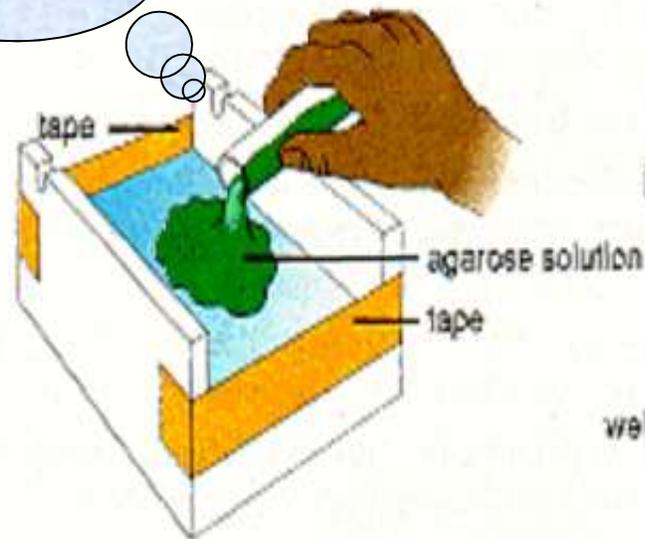
1. Si scioglie l'agarosio in polvere in una soluzione tampone a 100°C
2. Alla soluzione d'agarosio sciolta vi si aggiunge **Etidio Bromuro (EtBr)** o altro intercalante FLUORESCENTE

3. Si versa l'agarosio sciolto nella vaschetta elettroforetica

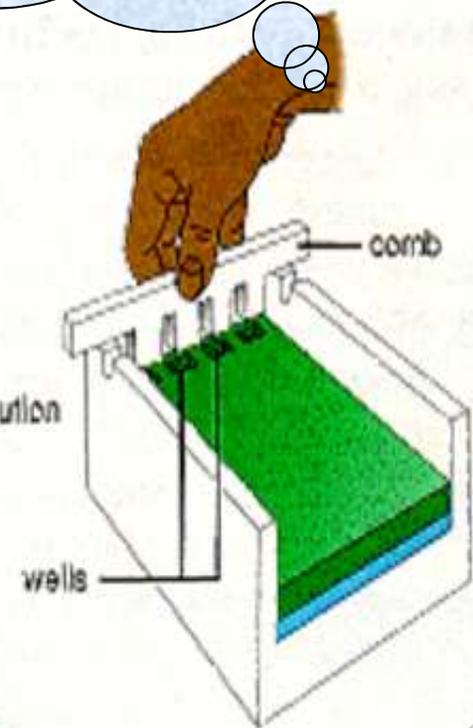
4. Quando il gel è gelificato, Si levano "i pettini"



a. Casting tray for making gel slab



b. Agarose solution poured into casting tray



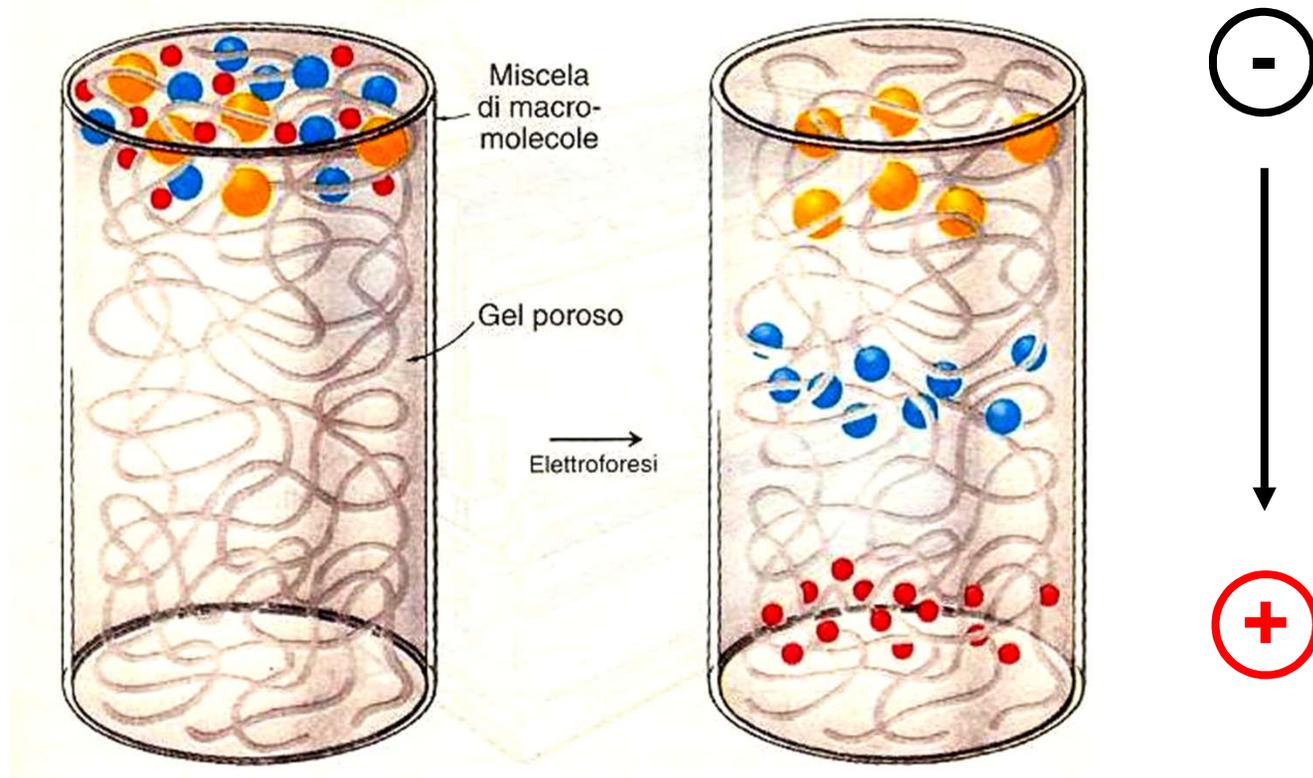
c. Comb that forms



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)



INTERCALANTI DEL DNA : Etidio Bromuro (EtBr)

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

Permette di

A. visualizzare il campione di DNA e RNA

B. quantificare il campione

L'intensità della fluorescenza è, infatti,
proporzionale alla quantità del campione!!!

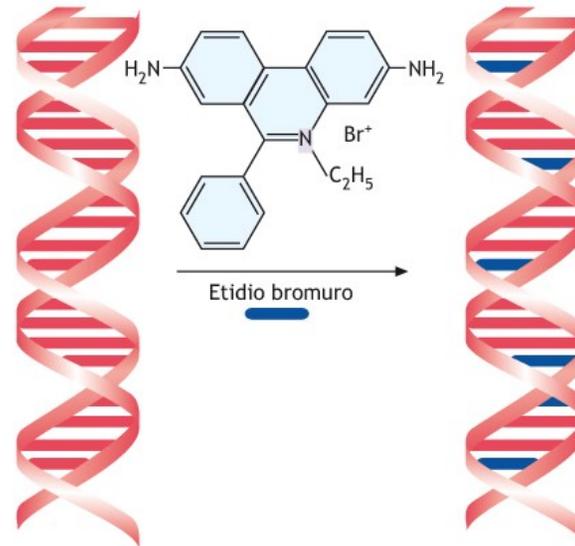


Figura I.14.2.2 Il legame dell'etidio bromuro al DNA.
L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato con luce ultravioletta.

Concentrazione
agoroso

0.8% : 0.5 - 20 kb

2% : 0.1 - 3 kb

Risoluzione



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

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

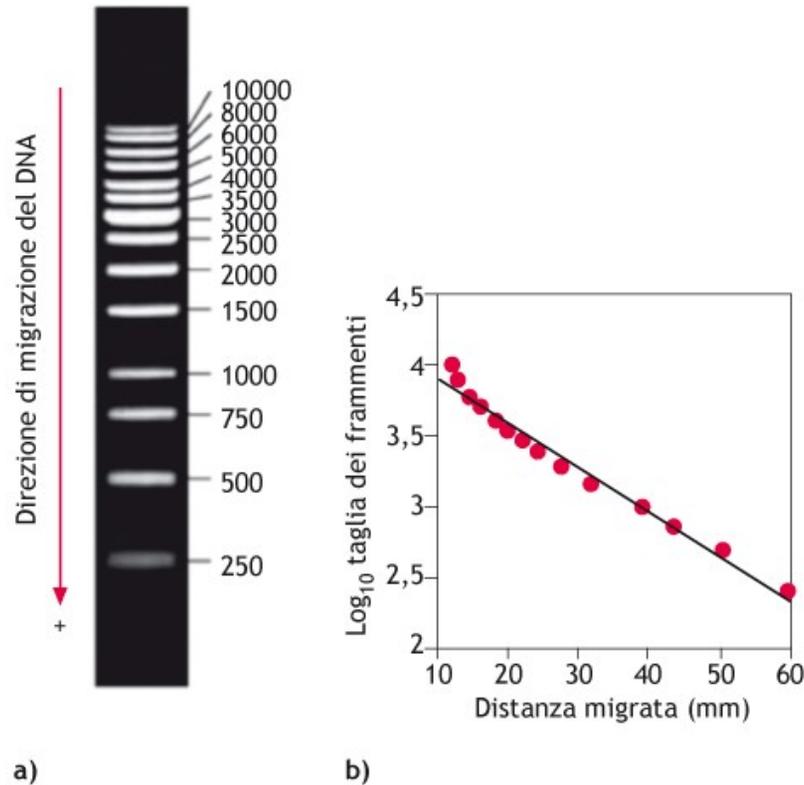
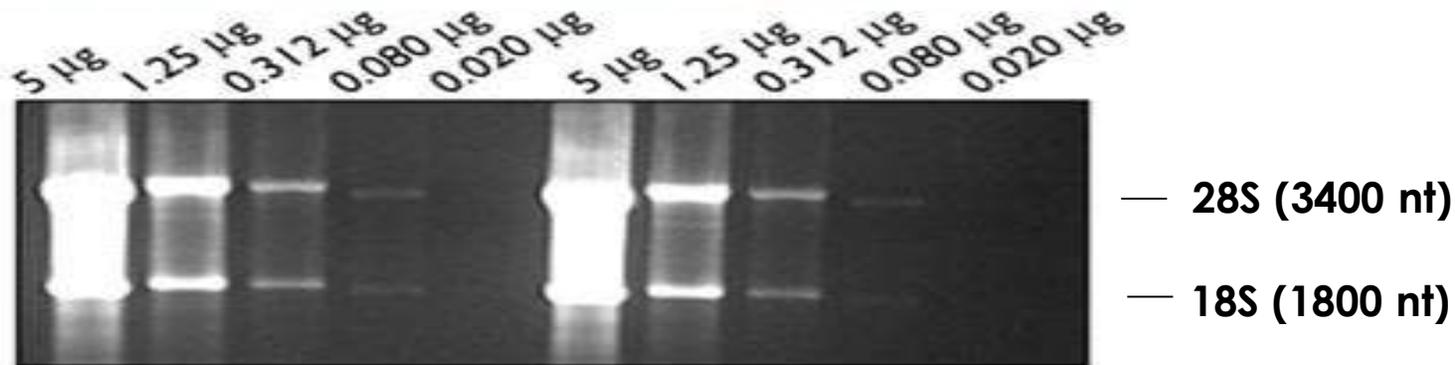


Figura 14.4 Migrazione dei frammenti di DNA attraverso un gel di agarosio. (a) Un gel di agarosio che mostra la separazione di frammenti di DNA con dimensione nota. **(b)** Grafico della relazione tra il \log_{10} della dimensione dei frammenti (in ordinata) e la distanza di migrazione (in ascissa) che mostra la correlazione inversa tra i due parametri.



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**.



Generazione del DNA ricombinante



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.

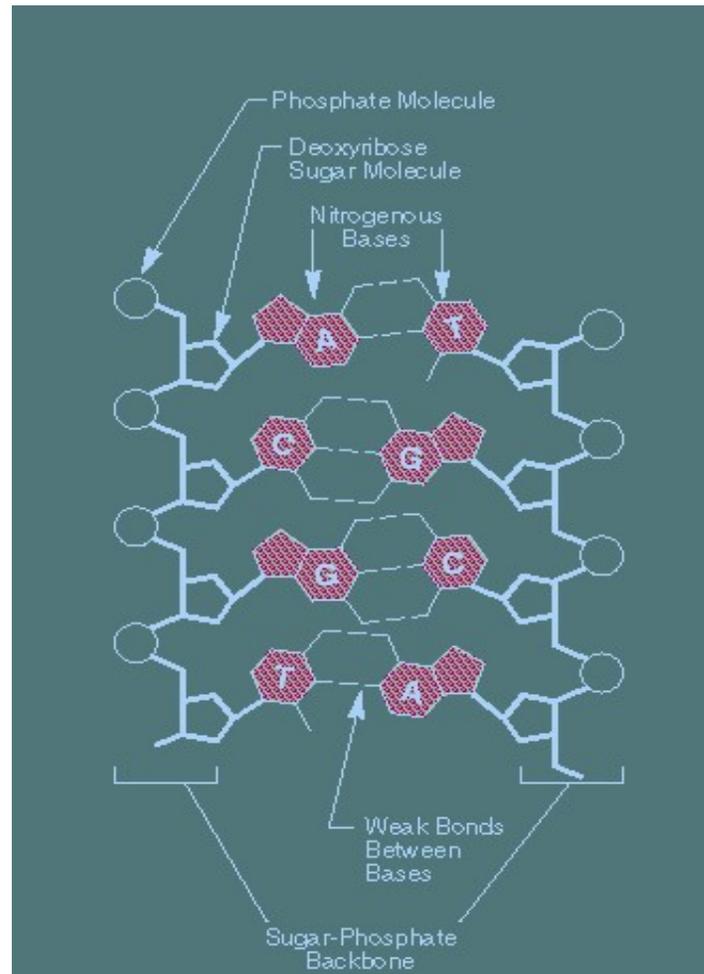
Ideata da Kary Mullis nel 1983

La prima pubblicazione è apparsa nel 1985

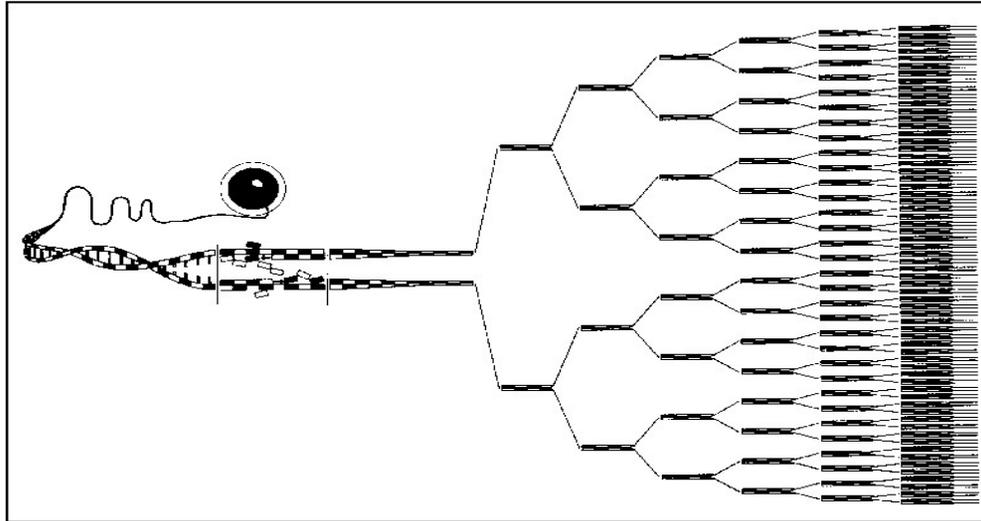
Premio Nobel per la chimica nel 1993



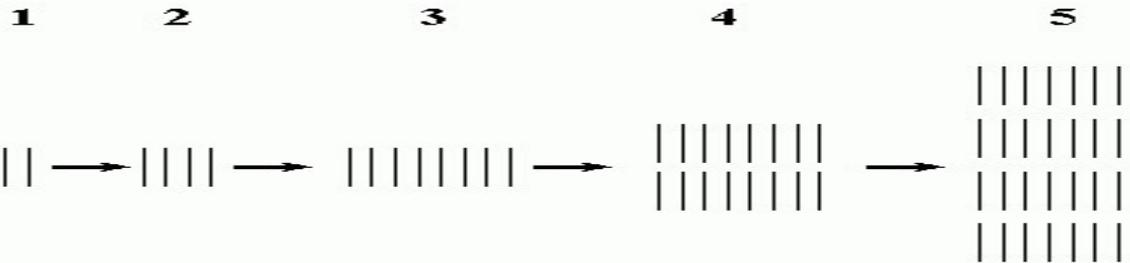
La PCR è basata sulla complementarietà delle basi



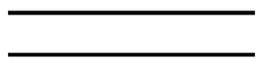
Polymerase Chain Reaction - PCR



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

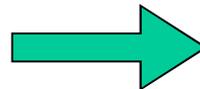


DNA

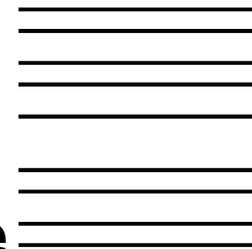


(singola molecola)

PCR



amplificazione



Molte
molecole

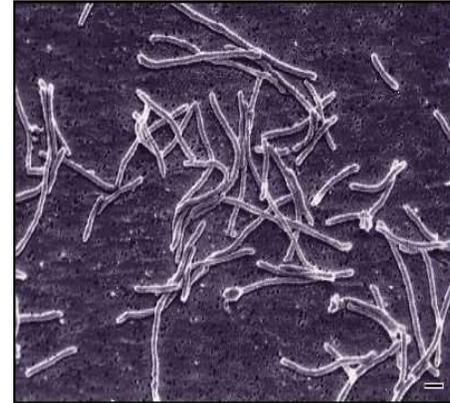


Com'era l'analisi genetica prima della PCR?

- 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 del *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).

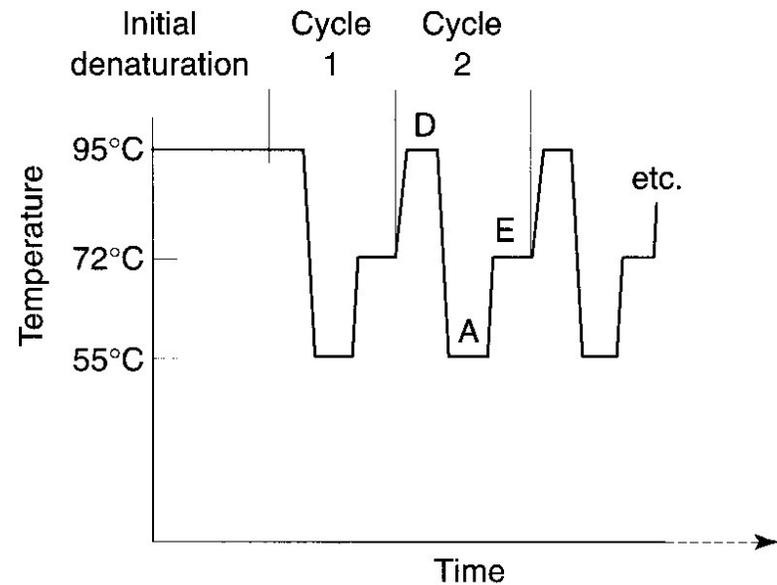
È divenuto famoso nel campo della biologia molecolare dopo la sensazionale invenzione di Kary Mullis, la reazione a catena della polimerasi (PCR), che ha rivoluzionato il modo di fare ricerca in questo ed in molti altri settori e che portò l'eccentrico scienziato al premio Nobel per la chimica nel 1993; 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.



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 e dal tipo



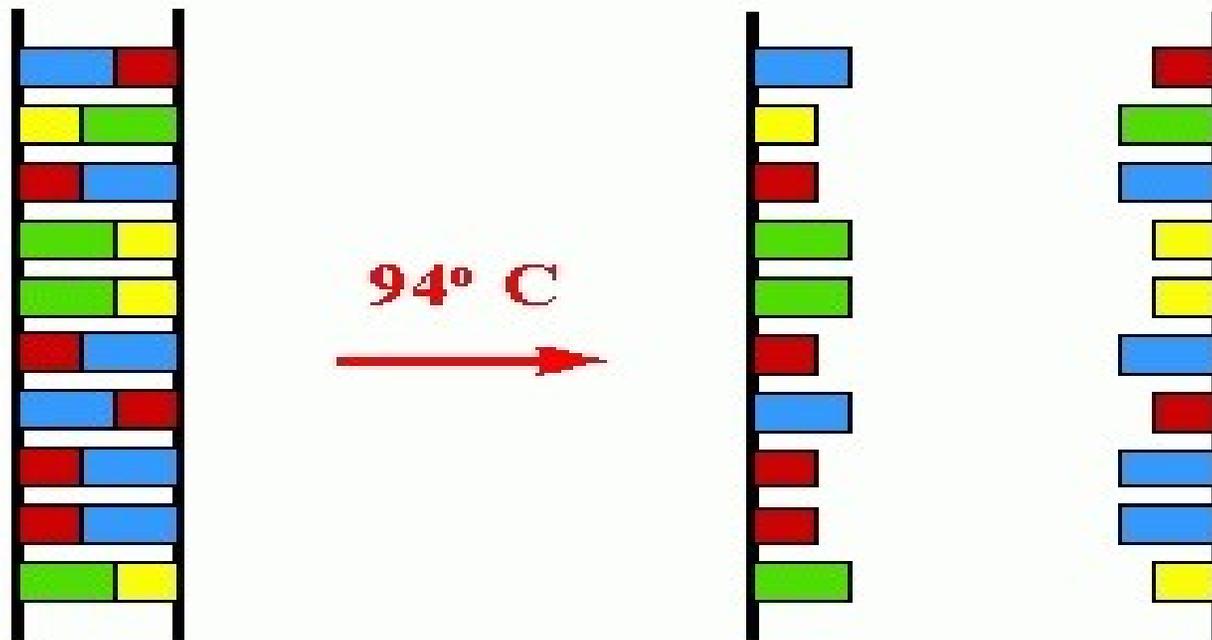
- La PCR può amplificare fino ad ottenere una quantità utilizzabile di DNA (visibile su gel) in meno di 2 ore
- Lo stampo di DNA non necessita di particolari purificazioni se il frammento da amplificare è di dimensioni ridotte (fino a 1000bp)
- Il prodotto della PCR può essere digerito con enzimi di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



fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore

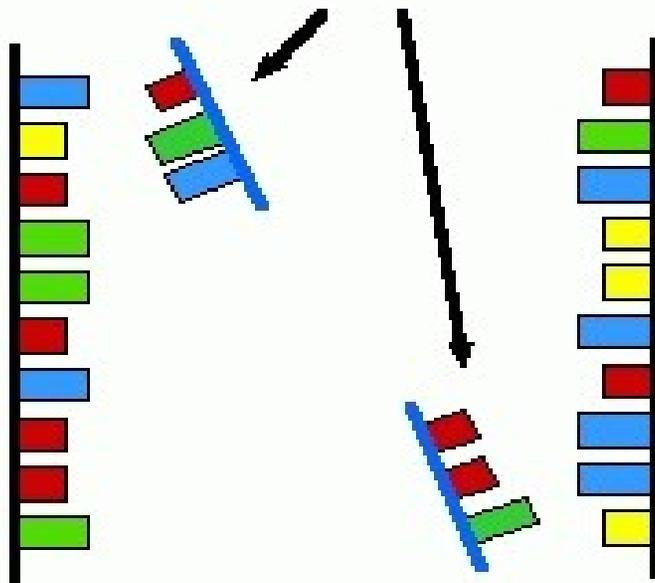
**DNA STRANDS ARE SEPARATED
BY HEATING**



fase 2: ANNEALING

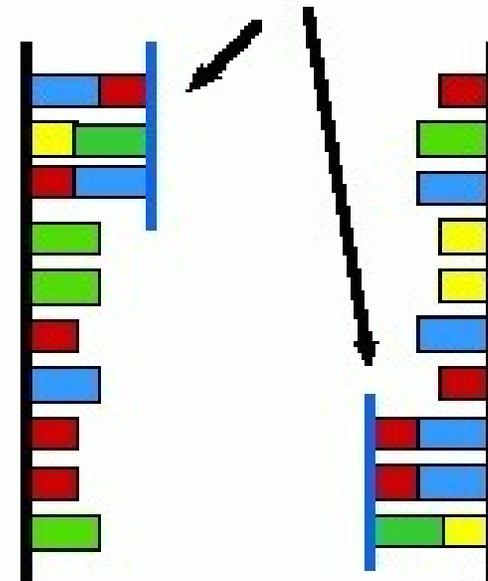
I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

**UNATTACHED
PRIMERS**

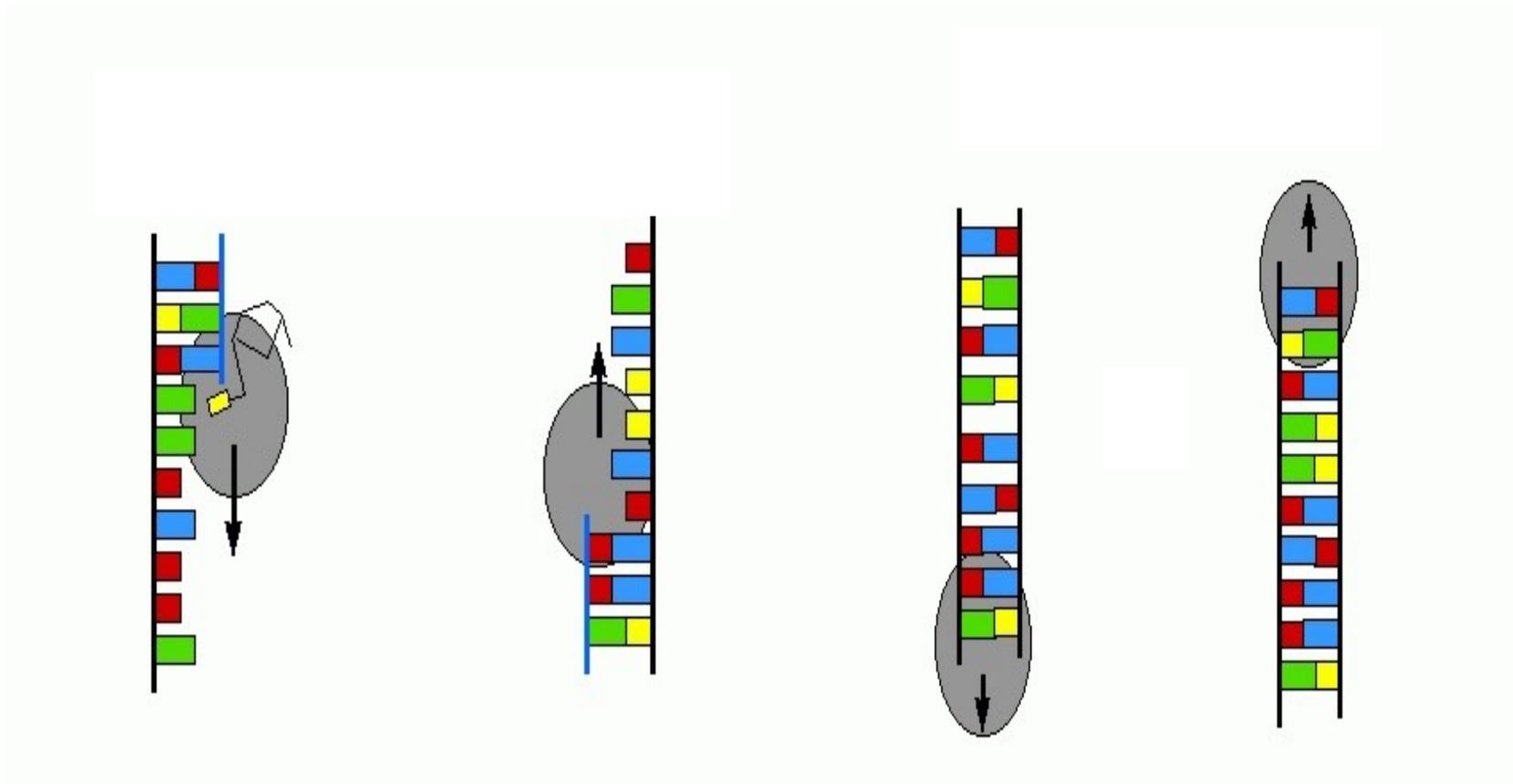


55-60°C
54° C

**ANNEALED
PRIMERS**

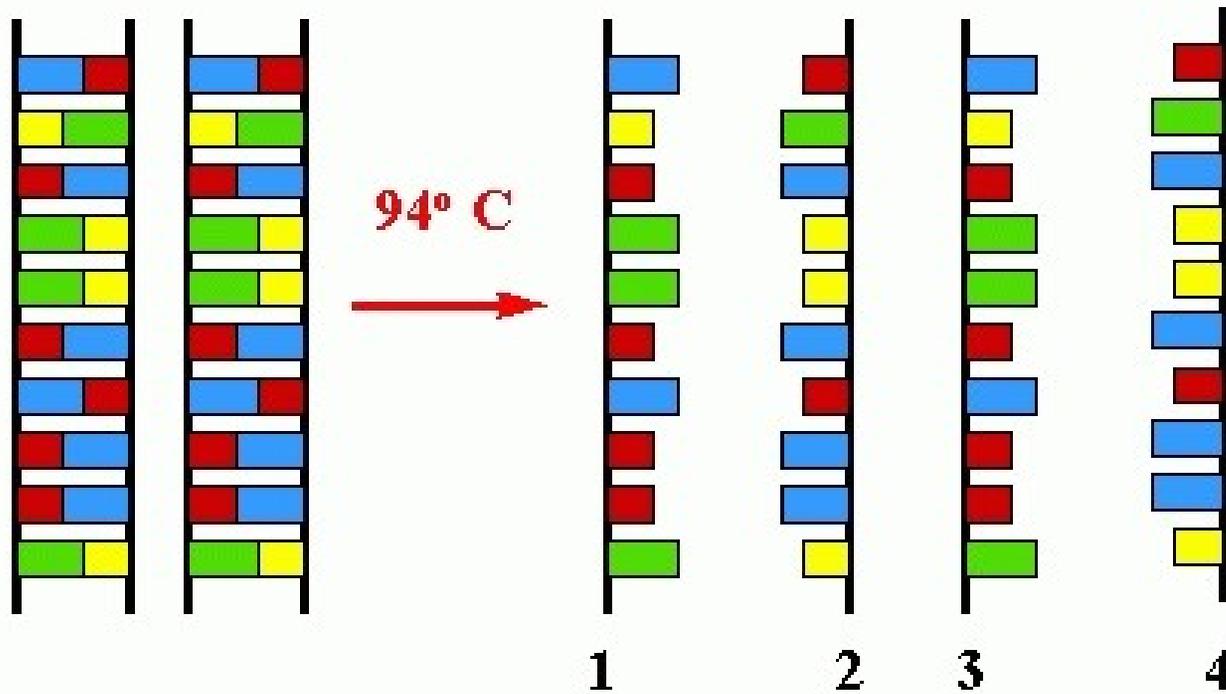


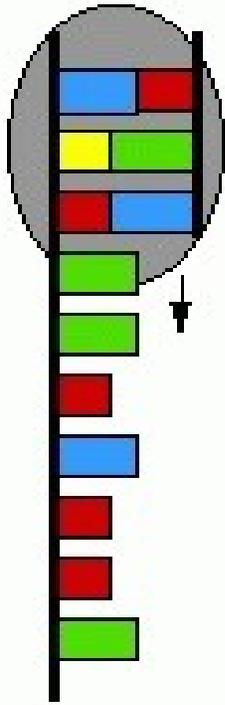
fase 3: ESTENSIONE
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



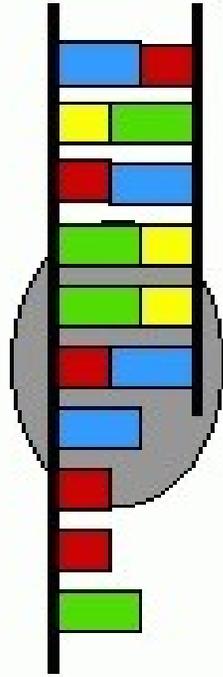
IL PROCESSO SI RIPETE

THE PROCESS IS REPEATED.

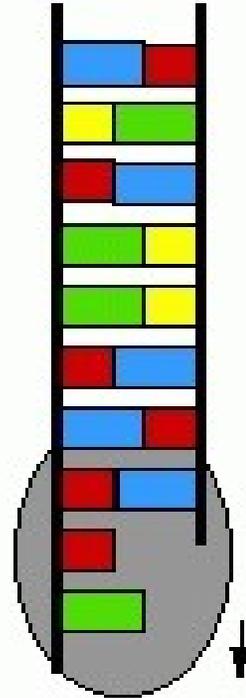




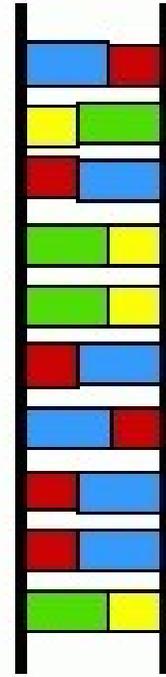
1



2

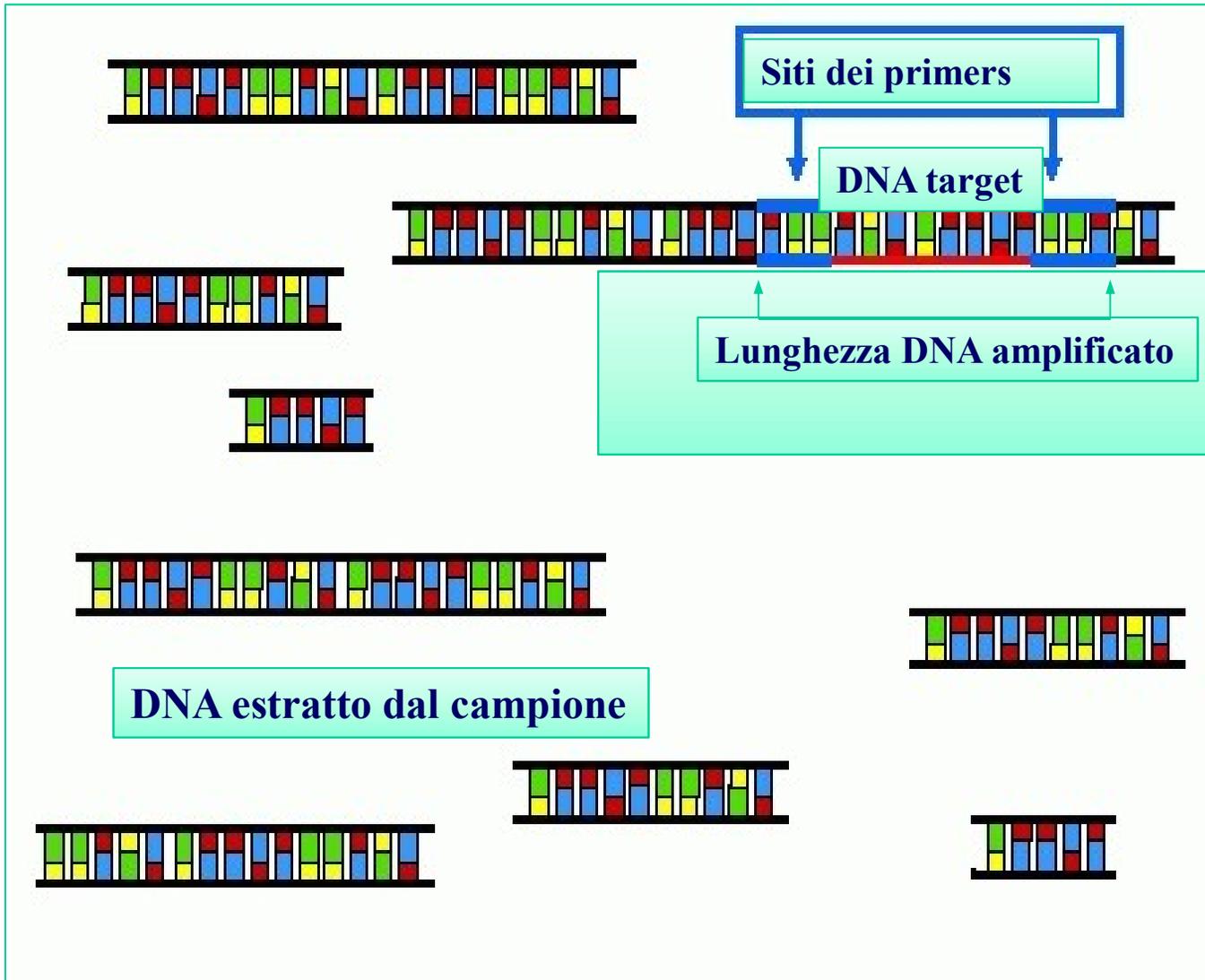


3

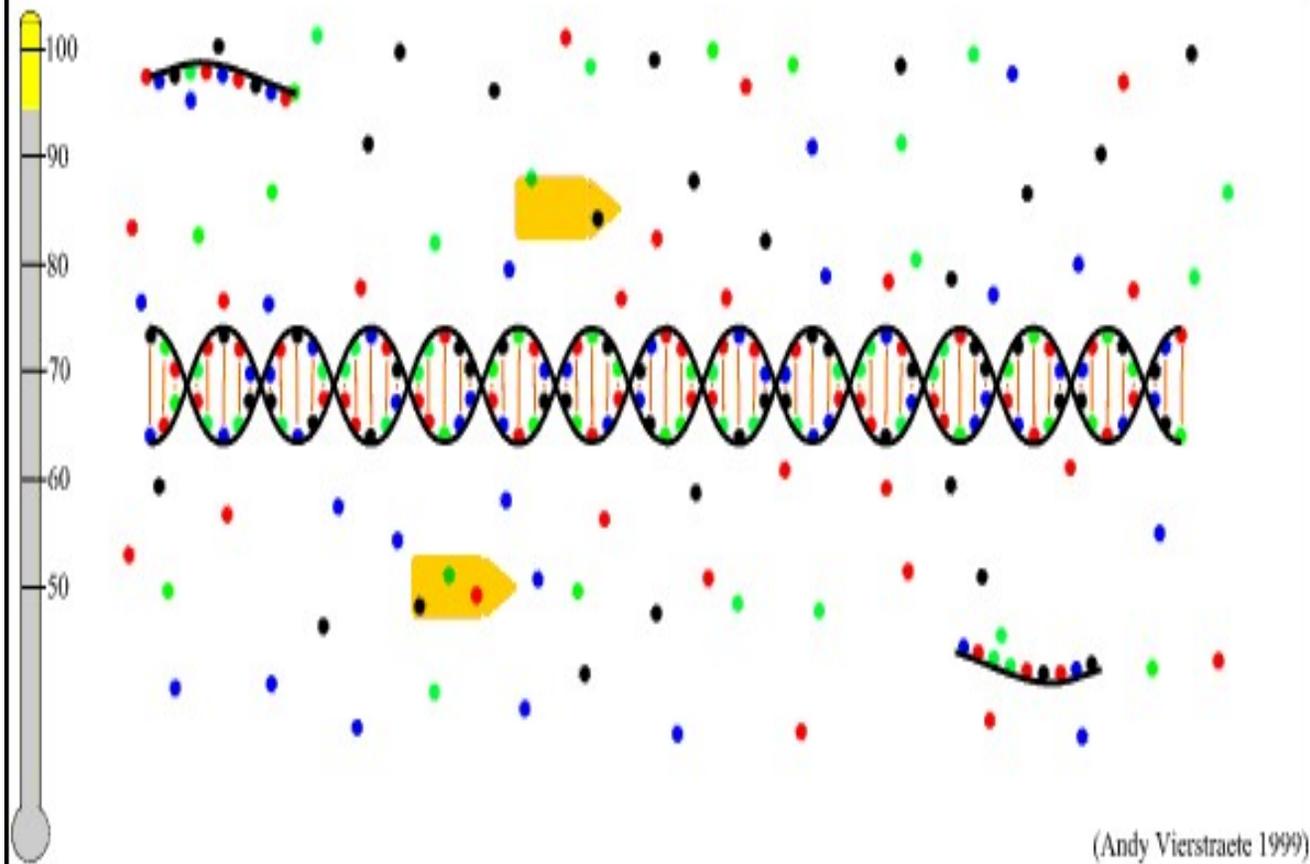


4



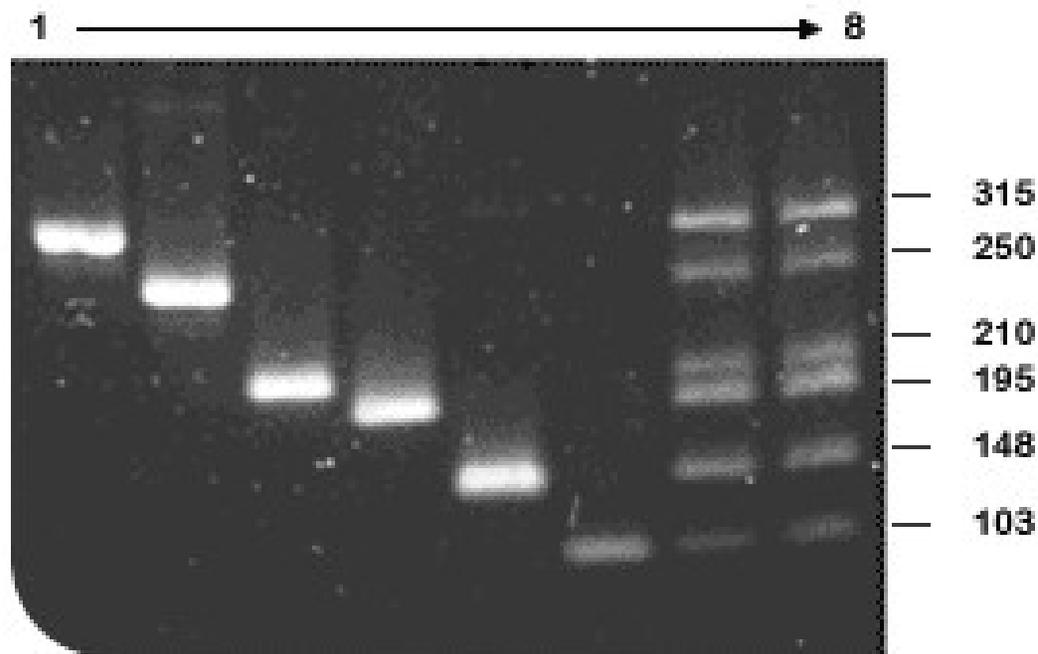


PCR : Denaturation 94°C



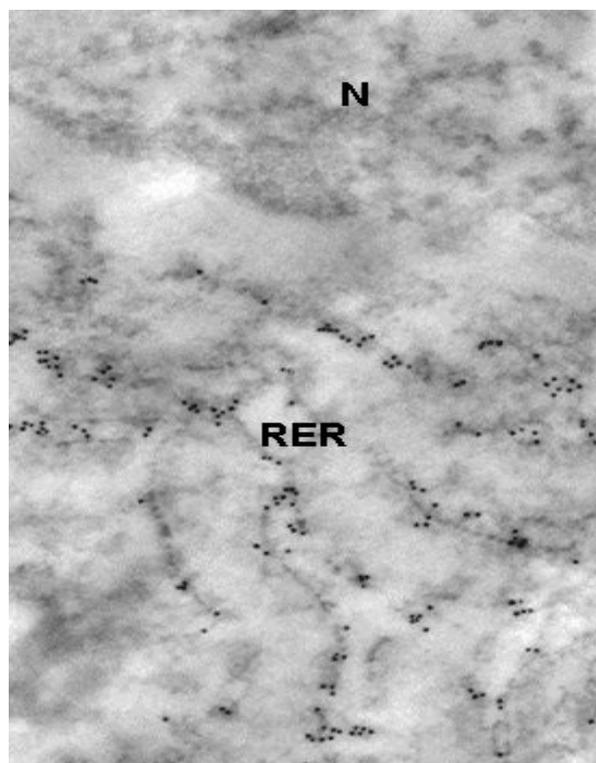
PCR MULTIPLEX

- 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



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

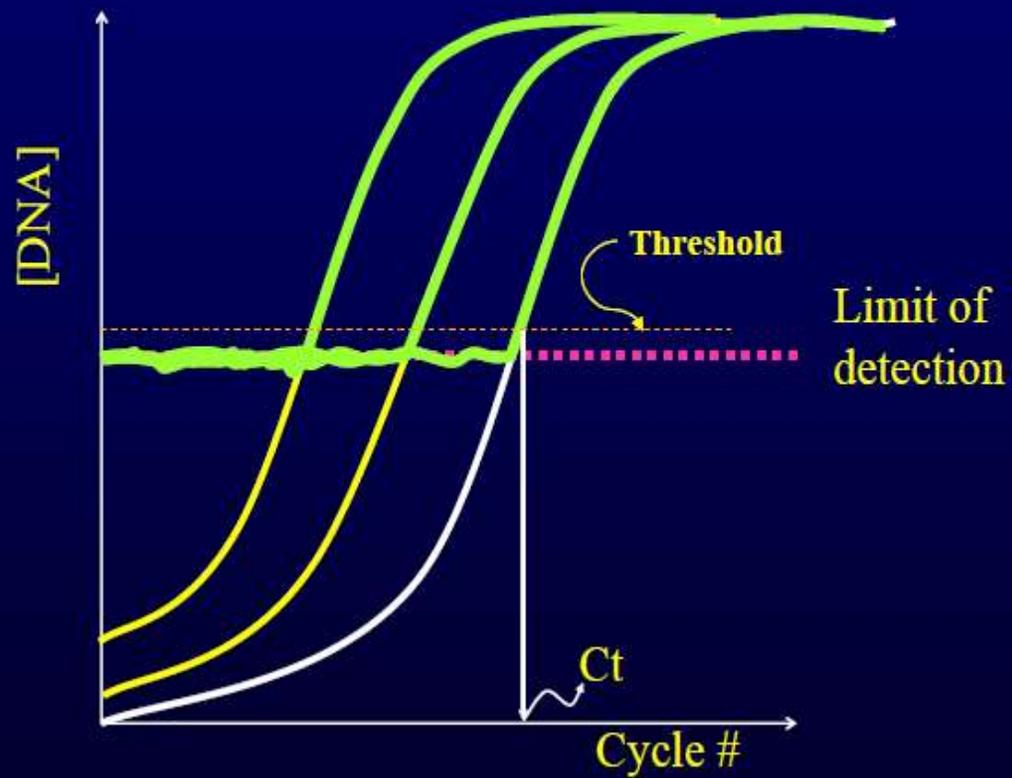
Ct (ciclo soglia) è il ciclo soglia al di sopra del quale si ha l'esponenziale aumento della quantità di DNA prodotto per PCR.

Il ciclo soglia correla con il DNA iniziale

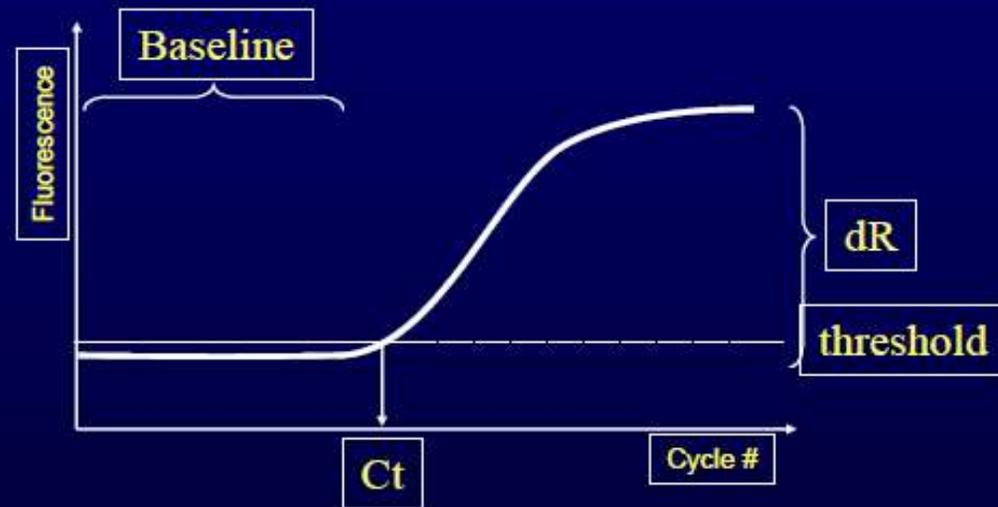
A concentrazione alta di DNA iniziale si un basso ciclo soglia.



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

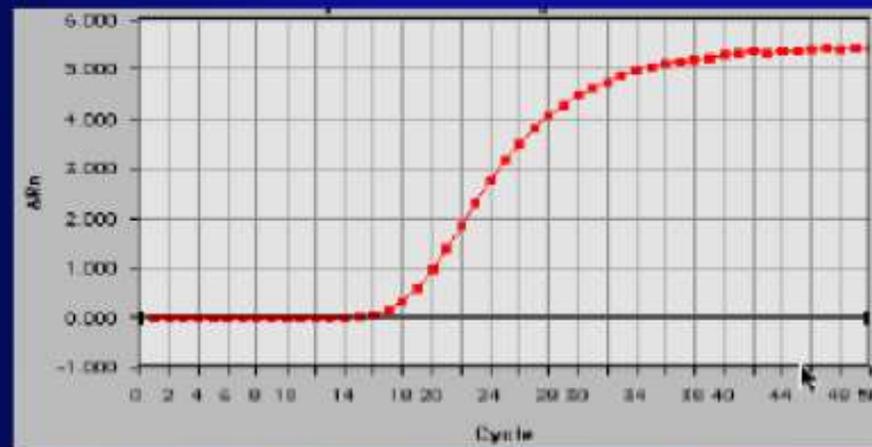


Real-time PCR is kinetic

- 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

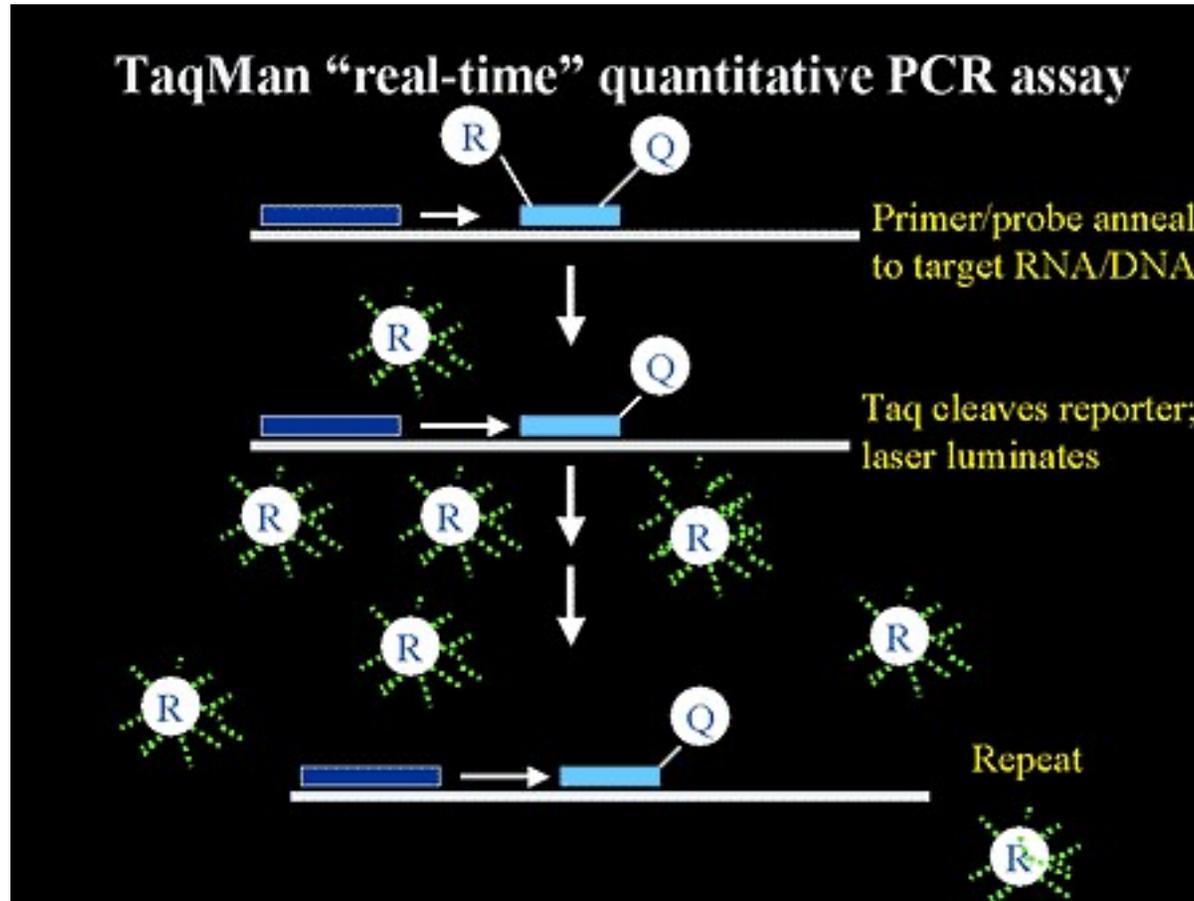
Linear plot



PCR cycle

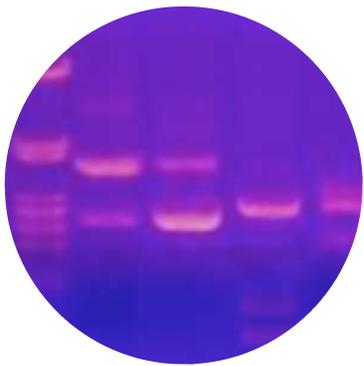


Real Time PCR



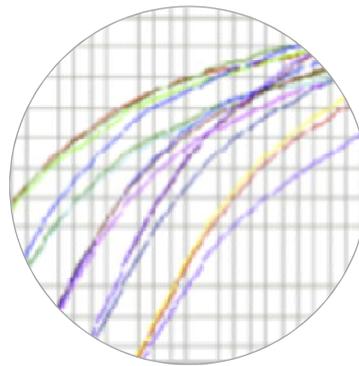
Droplet Digital PCR (ddPCR)

Prima
1983



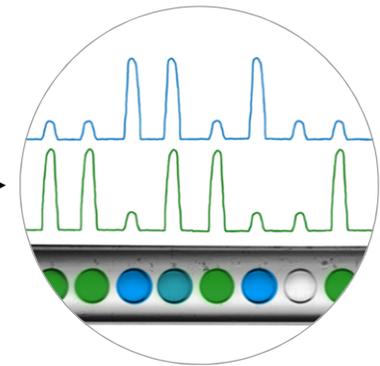
PCR
Qualitativa

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



V
S



ddPCR

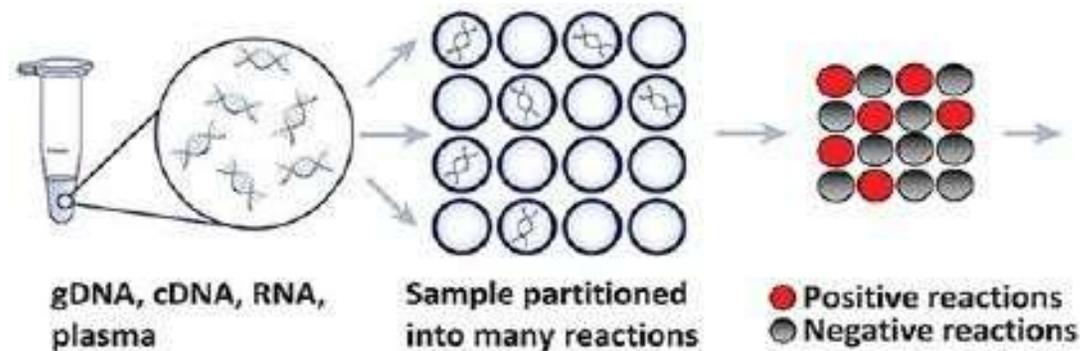
- ✓ Campione
- ✓ Primers
- ✓ Sonda Fluorescente
- ✓ DNA Polimerase
- ✓ dNTPs

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 **ultrasensibili 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

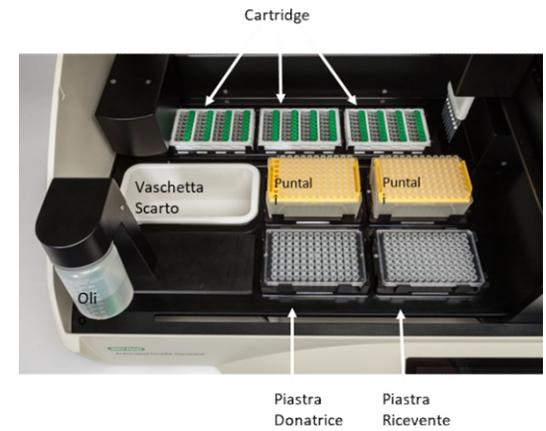
Emulsiona il campione dividendo la reazione in migliaia di goccioline



Cartridge

Termociclatore

Formazione della goccia



Sealer

Legge la fluorescenza delle singole droplet

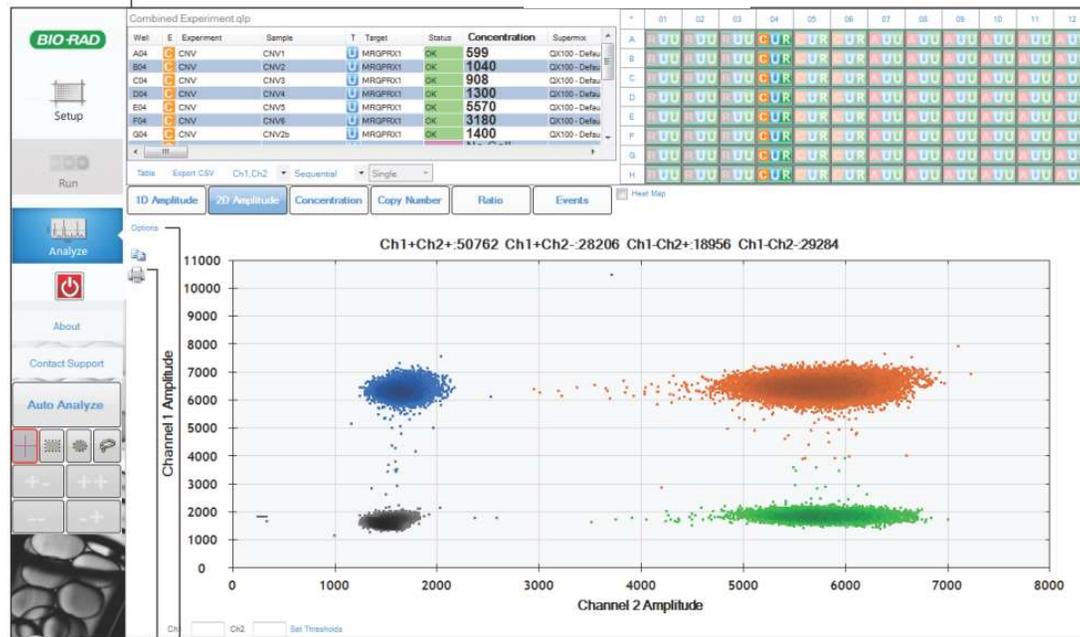


Sistema Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR

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**



Il DNA fingerprinting presenta numerose applicazioni

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

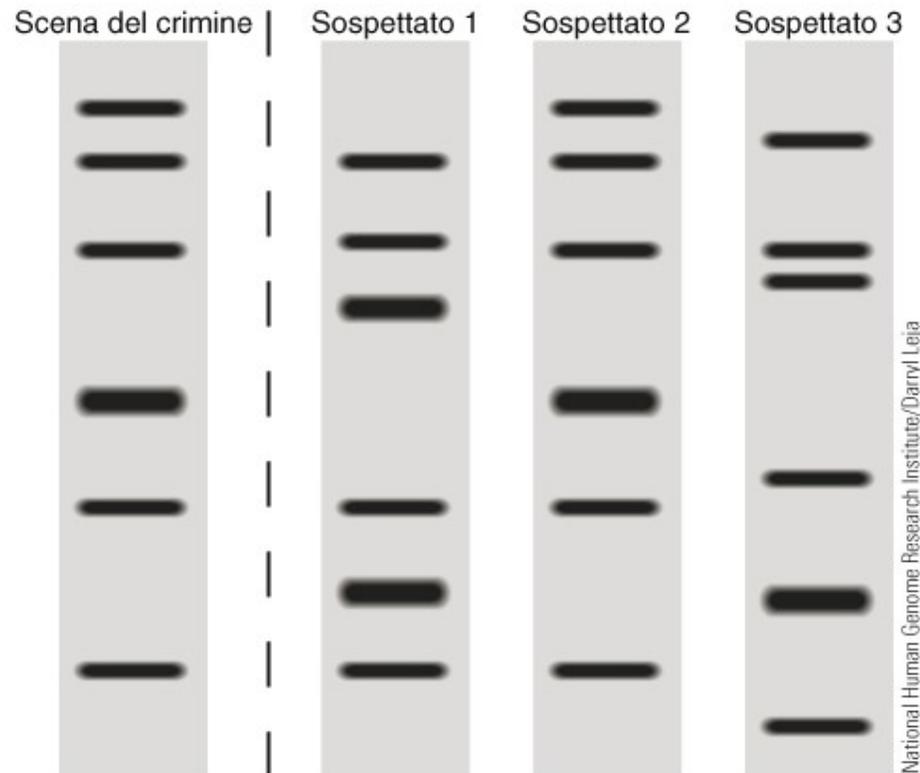


Figura 15-13 Fingerprinting del DNA

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?



- **Formazione del cDNA**

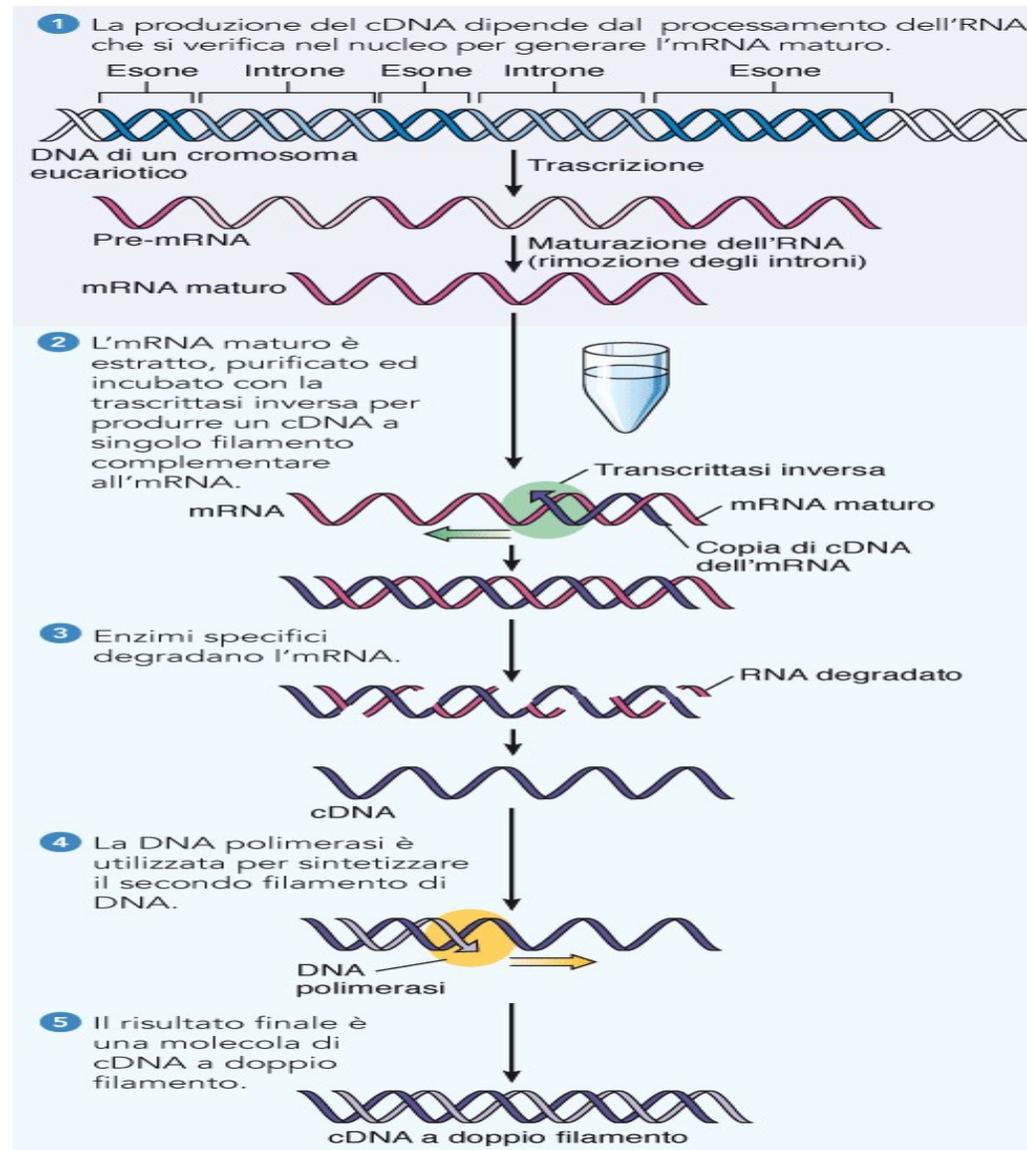
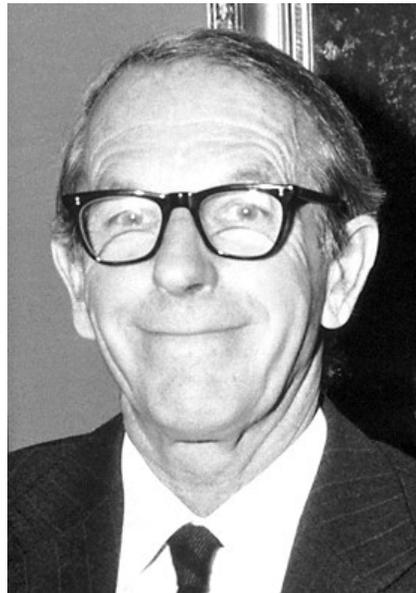


FIGURA 15-6 Formazione del cDNA



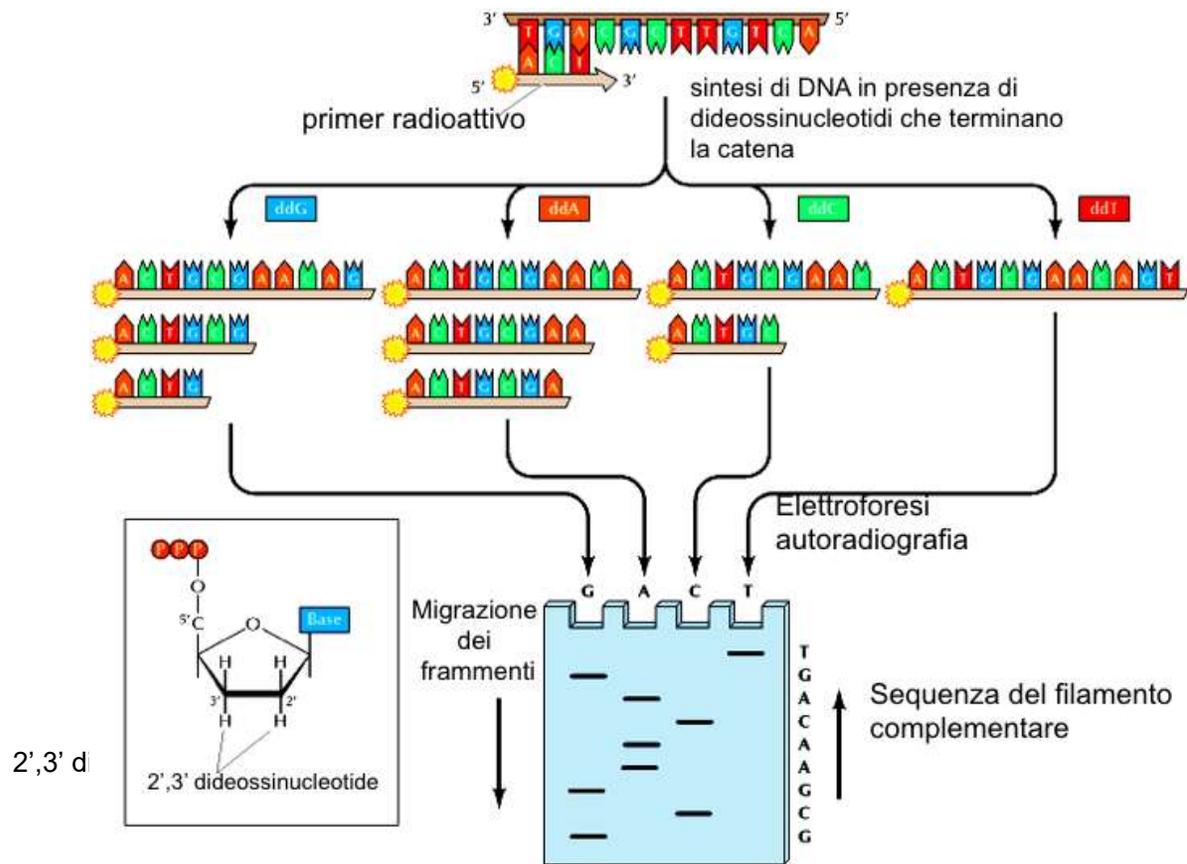
Analisi di mutazioni tramite il sequenziamento del DNA: il metodo di Sanger



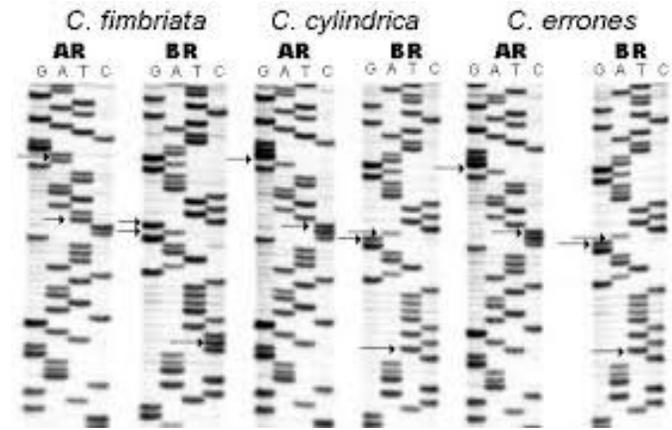
**The Nobel Prize in Chemistry 1980
Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick
Sanger**



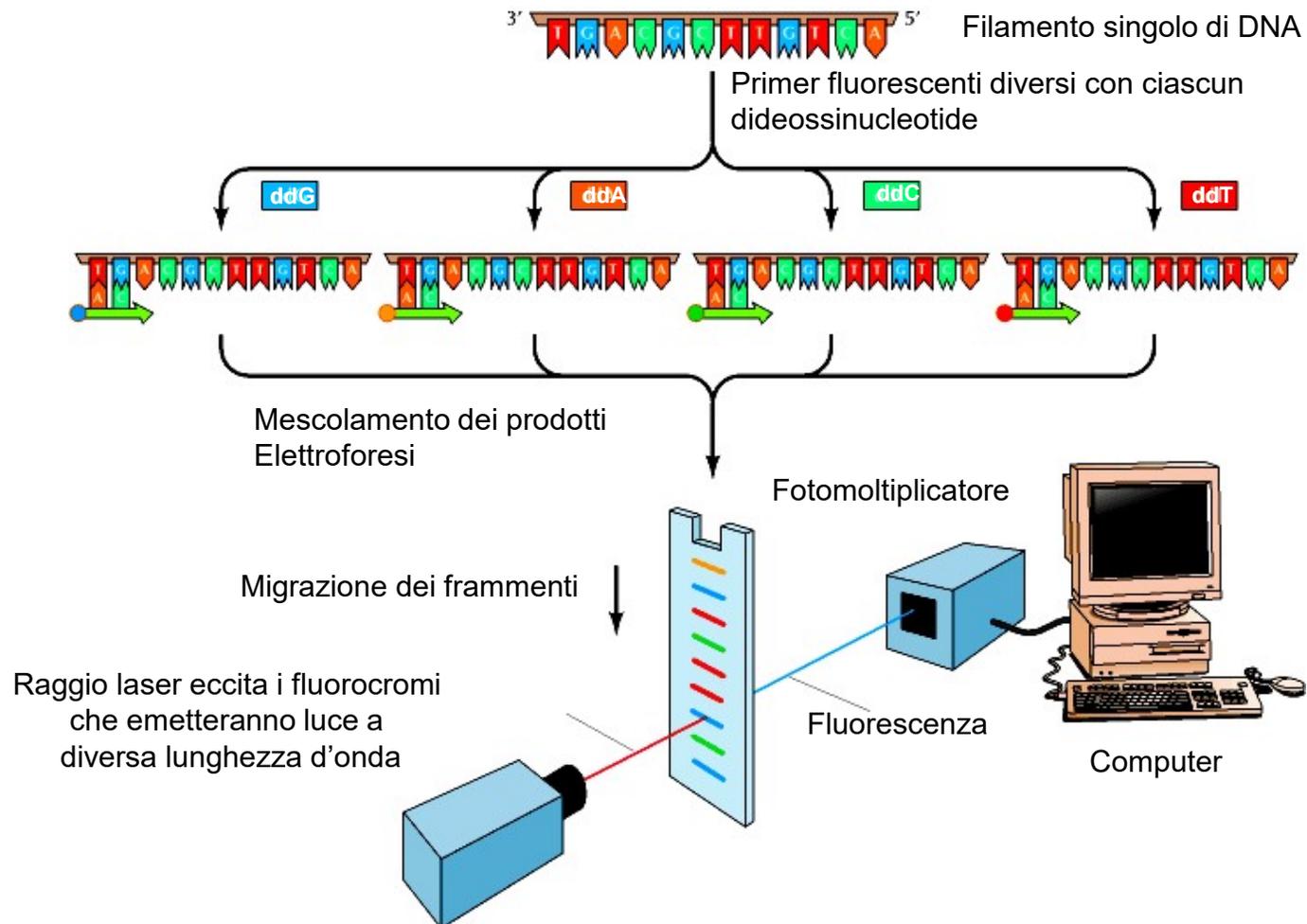
**Il sequenziamento si basa sulla duplicazione del DNA quindi utilizza:
DNA da sequenziare, enzima (DNA polimerasi), primer, deossinucleotidi**



1000 pb (1 Kb)
in 5 giorni



Sequenziamento automatico del DNA: 1 Kb in 2 giorni

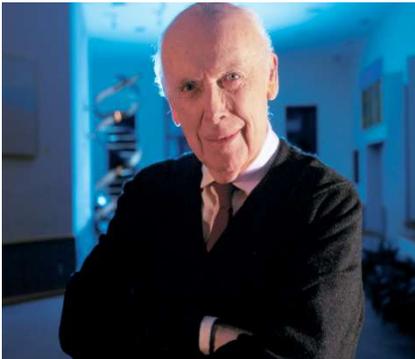


Human Genome Project

The Human Genome Project (HGP) refers to the International effort, formally begun in October 1990 and completed in 2003 with the aims:

- 1) to determine the complete sequence of the genome
- 2) to discover all the estimated 20,000-25,000 human genes
- 3) to make them accessible for further biological study

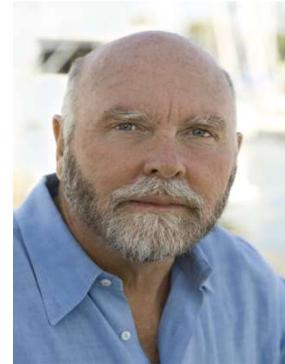
James Watson



Francis Collins (NIH)



John Craig Venter (Celera)



NEXT GENERATION SEQUENCING

- ❖ E' una tecnica in grado di sequenziare in breve tempo milioni di frammenti di DNA
- ❖ Può essere impiegata per sequenziare
 - il genoma
 - gli esoni
 - il trascrittoma- cioè tutto l'RNA presente nella cellula



Informatics is needed to deal with very large datasets



Alan Turing
(1912-1954)



Mainframe
digital
computers
1940s



Steve Jobs
(1955-2011)



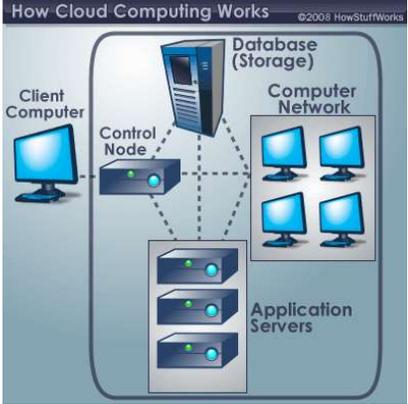
Personal
computers
1980s



Bill Gates
(1955-)



INTERNET



Cloud
computing
2010s



Informatics is needed to deal with very large datasets



Alan Turing
(1912-1954)



Mainframe
digital
computers
1940s



Steve Jobs
(1955-2011)



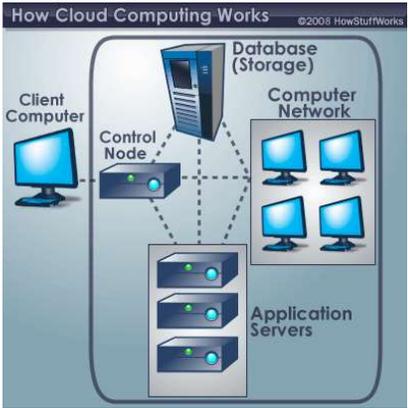
Personal
computers
1980s



Bill Gates
(1955-)

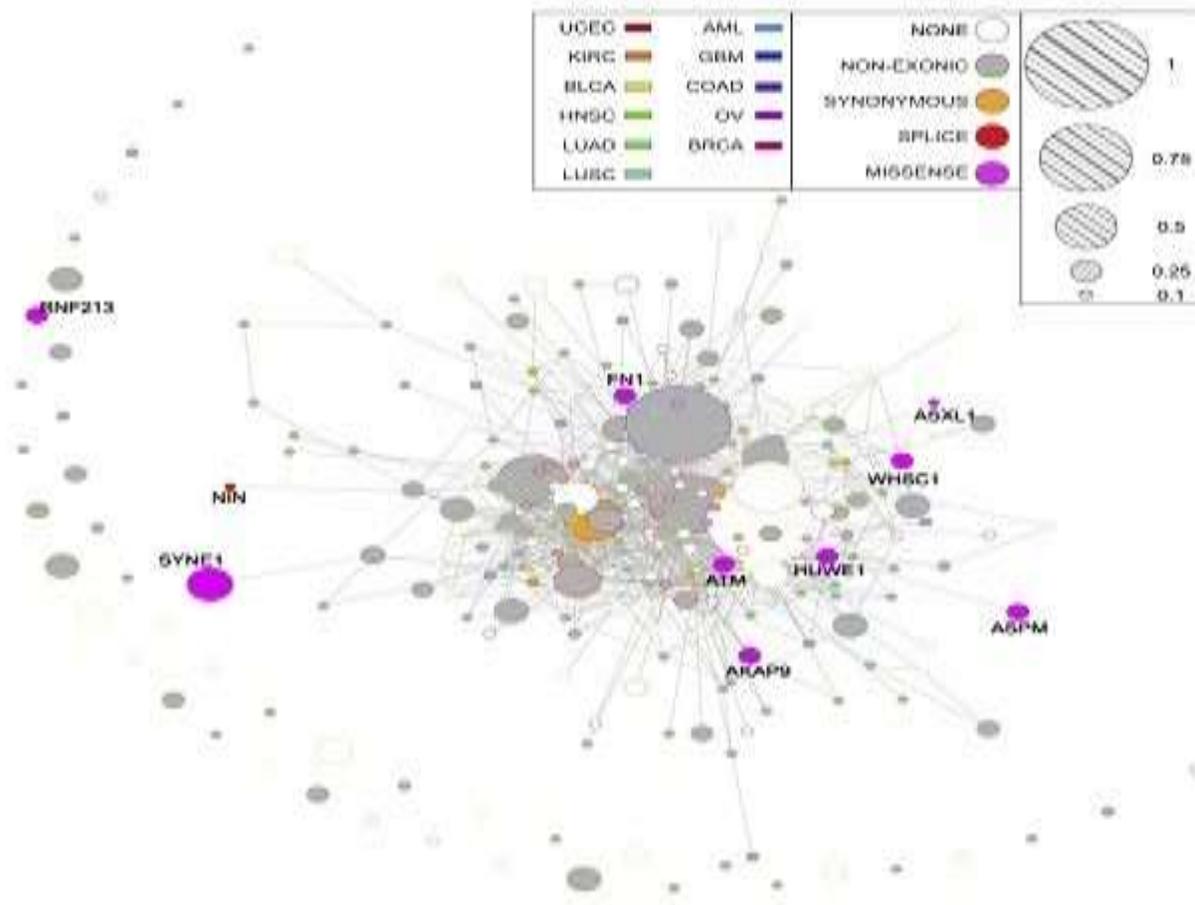


INTERNET



Cloud
computing
2010s





Aggiornare la mappatura delle mutazioni genetiche per ampliare la lista di quelle che potrebbero avere conseguenze sulla salute umana. E' il compito del software sviluppato dai ricercatori

