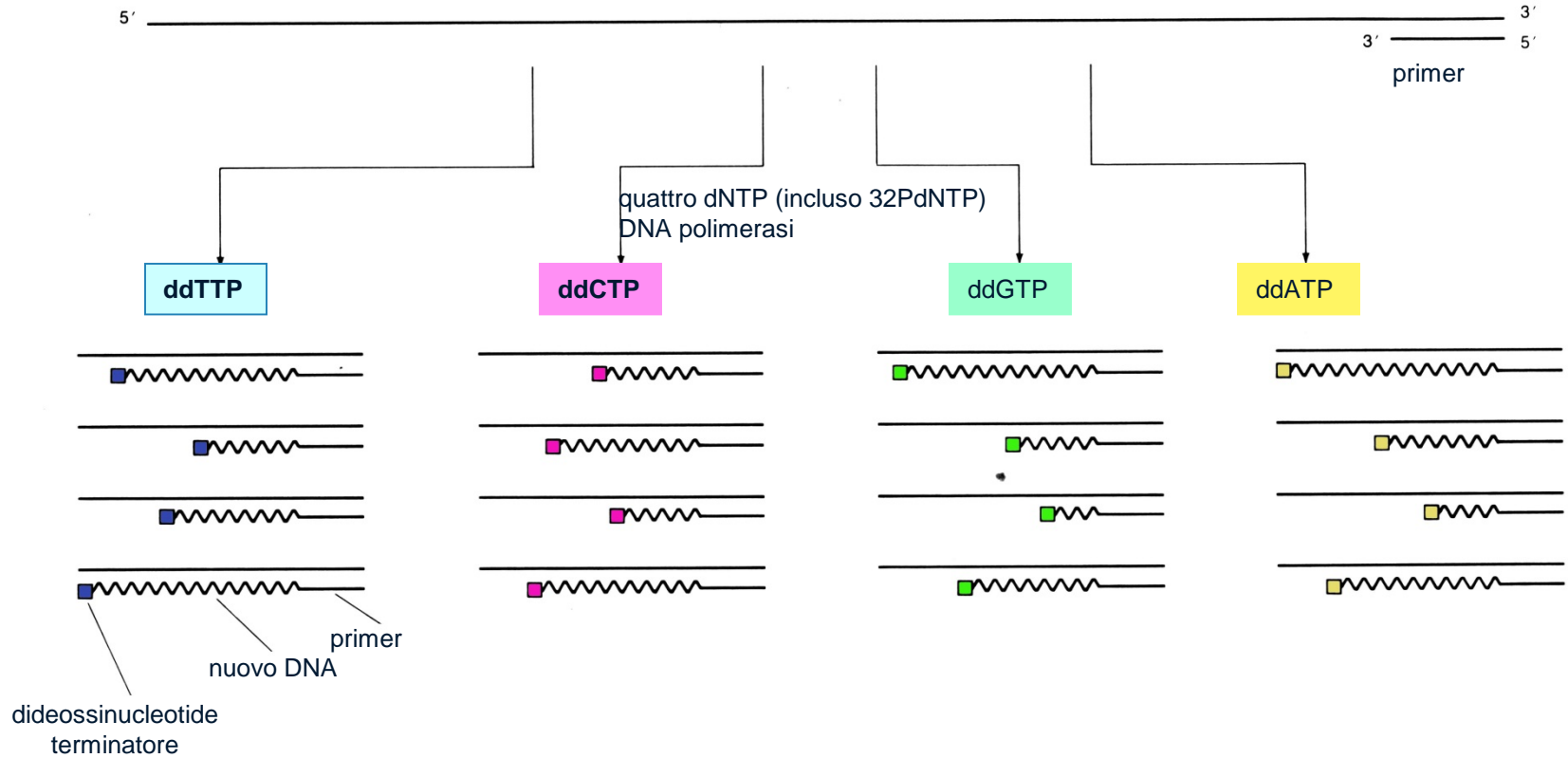


Metodi di sequenziamento

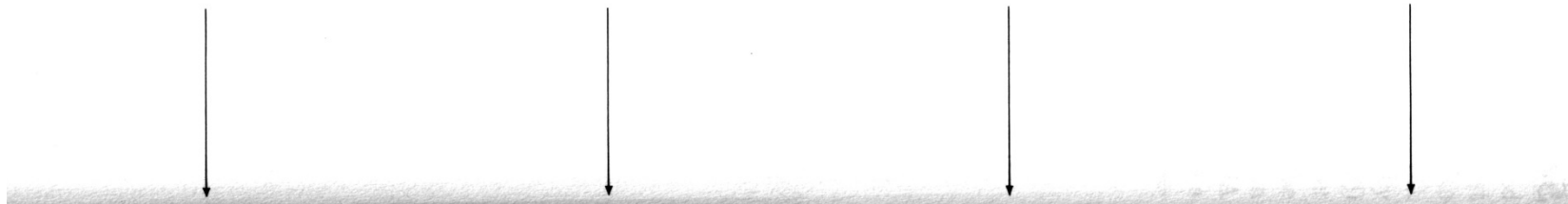
- **Sanger (enzimatico)**
- **Maxam e Gilbert (chimico)**

Metodo di Sanger



La catena neosintetizzata termina quando un ddNTP è incorporato al posto di un dNTP

Denaturare e separare su gel di poliacrilammide



Metodo di Maxam e Gilbert

³²P

DNA singolo filamento
marcato ad una estremità

G (A+G) C (C+T) A > C

4 o 5 reazioni di modificazione
base-specifiche

³²P A C A C T G A A C G T T C A T G T C G A

↑
me

³²P A C A C T G A A C G T T C A T G T C G A

↑
me

³²P A C A C T G A A C G T T C A T G T C G A

↑
me

³²P A C A C T G A A C G T T C A T G T C G A

↑
me

³²P A C A C T

³²P A C A C T G A A C

³²P A C A C T G A A C G T T C A T

³²P A C A C T G A A C G T T C A T G T C

Es. metilazione delle G con
dimetilsolfato

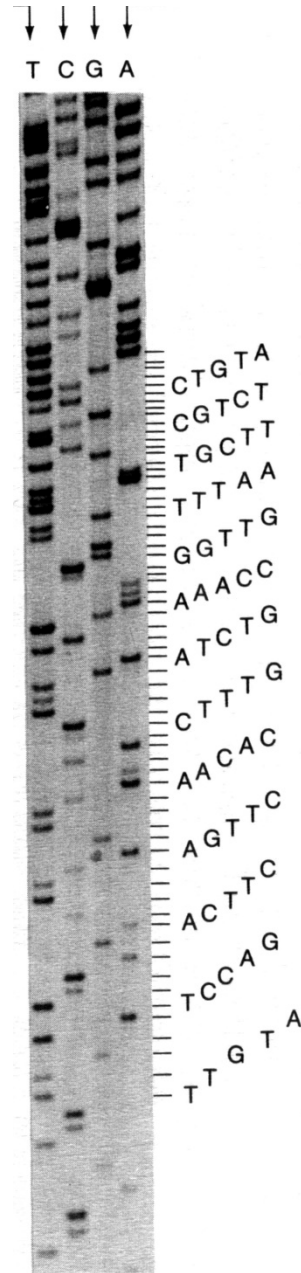
Rottura del filamento in
corrispondenza della base
modificata mediante piperidina

Separare i frammenti marcati su gel
di acrilammide

FIGURE 13.2

Sequencing by the Maxam-Gilbert chemical degradation of DNA method.

Gel di poliacrilammide di sequenza



Confronto metodi di sequenziamento

Sanger

- ❖ rapida e semplice attuazione
- ❖ disponibilità di kit
- ❖ necessità di primer
- ❖ sensibile a strutture secondarie

Maxam e Gilbert

- ❖ lunga preparazione del DNA
- ❖ reazioni da mettere a punto
- ❖ relativamente economico
- ❖ strutture non influenti
- ❖ utilizzabile per oligonucleotidi

Sequenziamento automatico

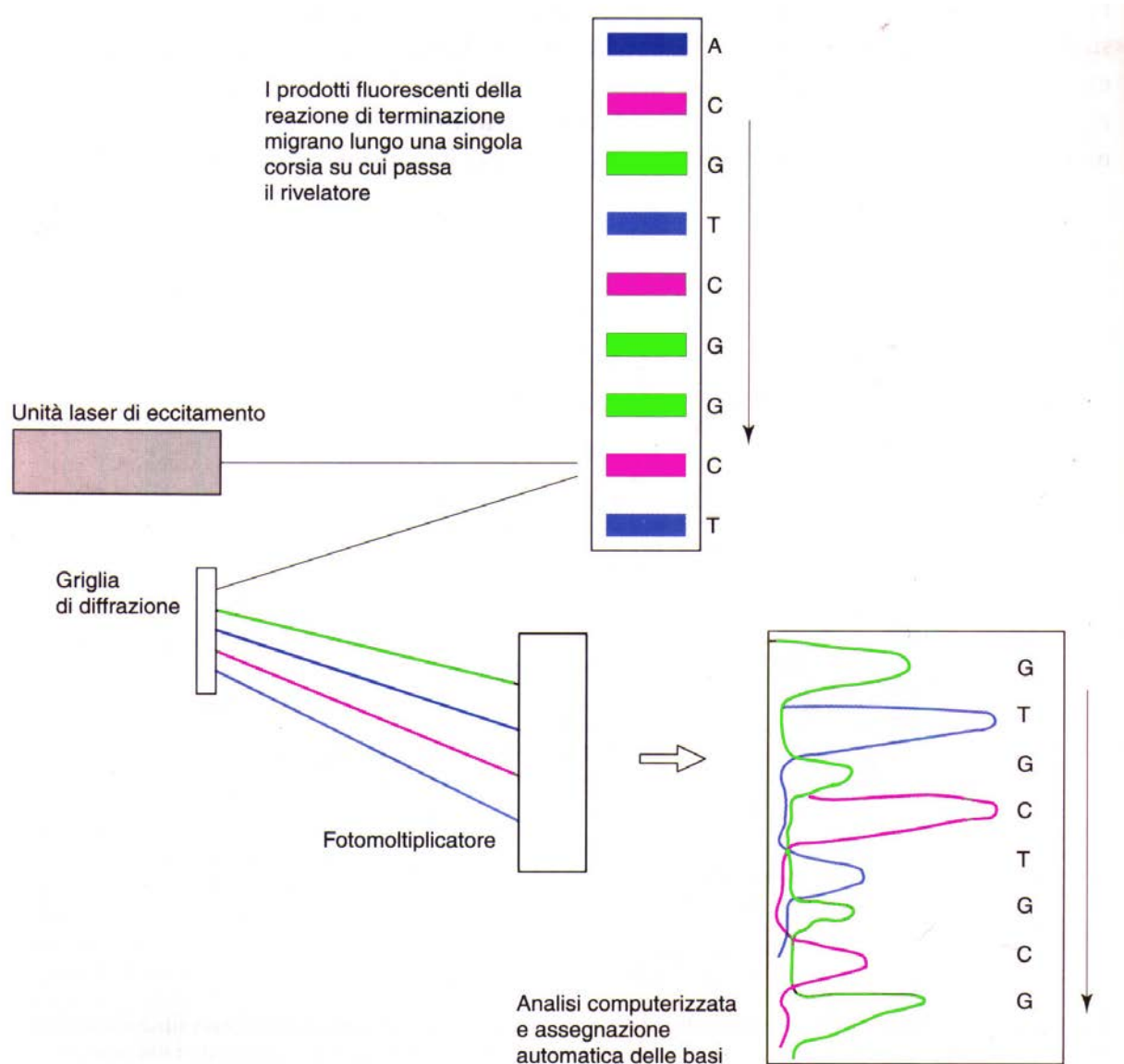


Figura 2.39 Rivelazione automatizzata della fluorescenza di sequenza, utilizzando una singola corsia di un gel e un fotomoltiplicatore.

Sequenziamento con Taq polimerasi

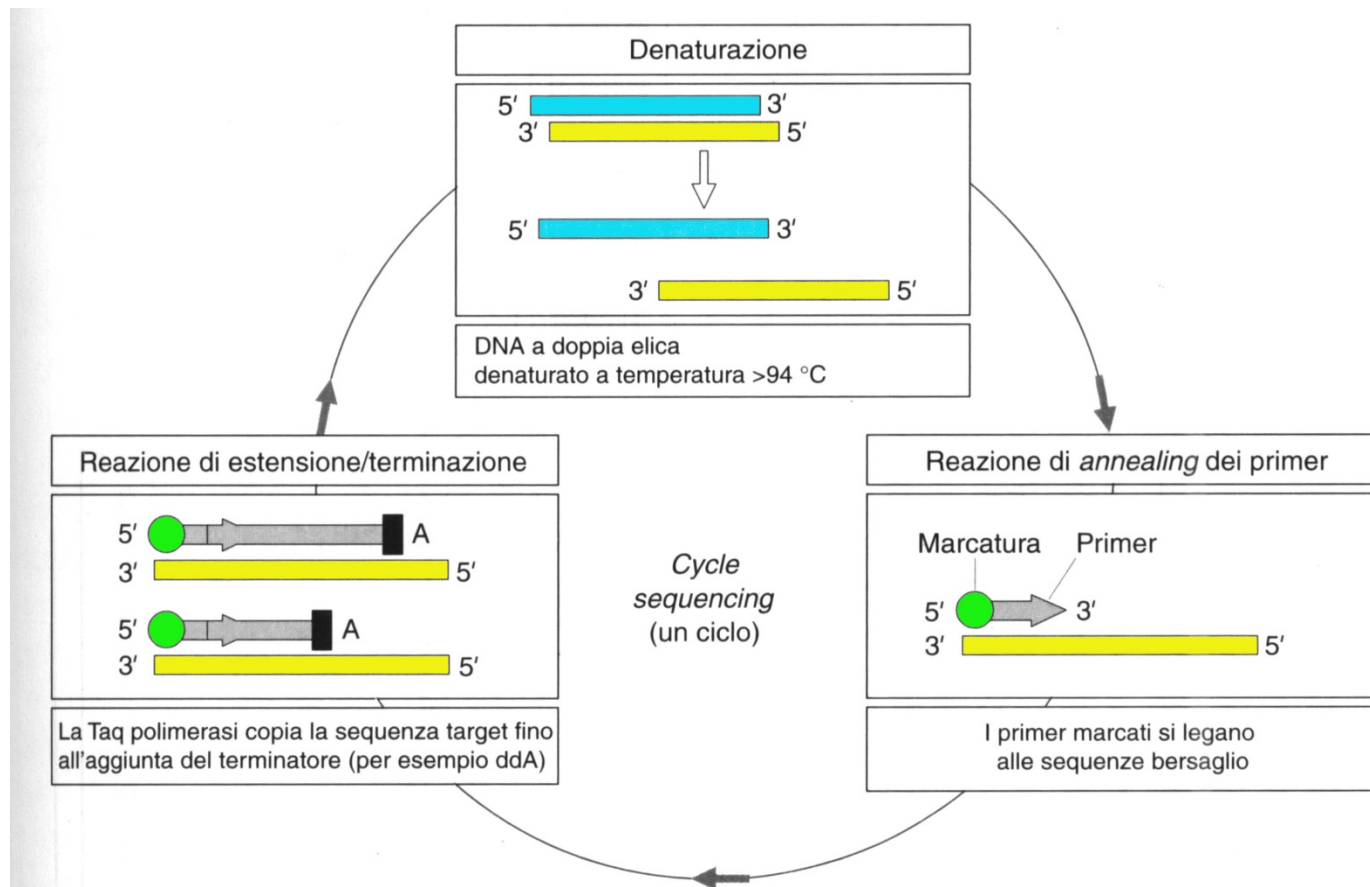
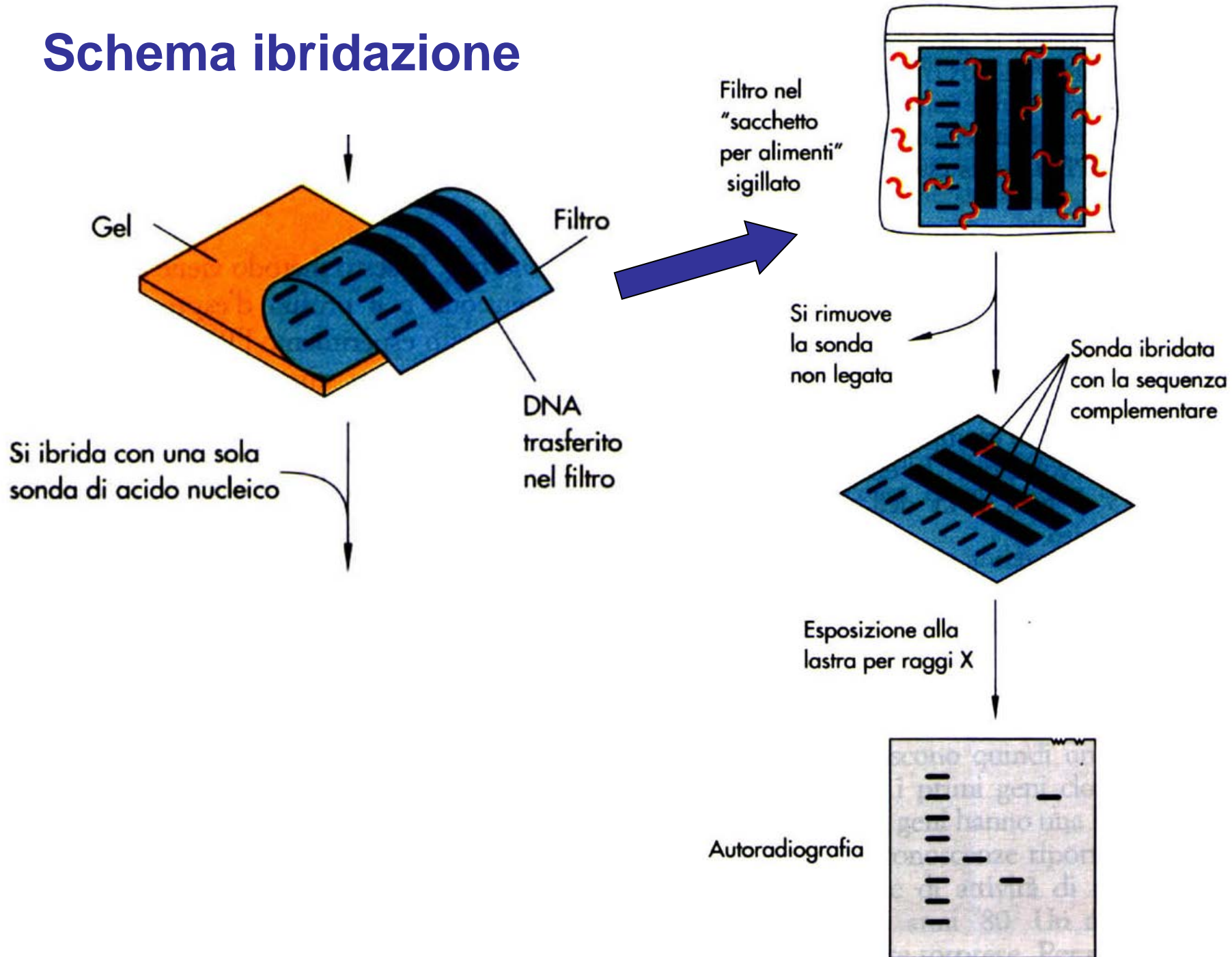


Figura 2.38 Schema semplificato del *cycle sequencing*. I primer marcati consentono l'amplificazione lineare. Durante le reazioni di estensione e terminazione, si incorporano nella sequenza crescente i didesossiribonucleotidi, terminatori della catena. Questo avviene in quattro reazioni separate (A, C, G e T). Si separano poi i prodotti su gel di poliaccrilammide e si analizza la sequenza. Il diagramma indica solo gli eventi che avvengono nella reazione A.

Trasferimento di acidi nucleici (Blotting)

- Southern
- Northern

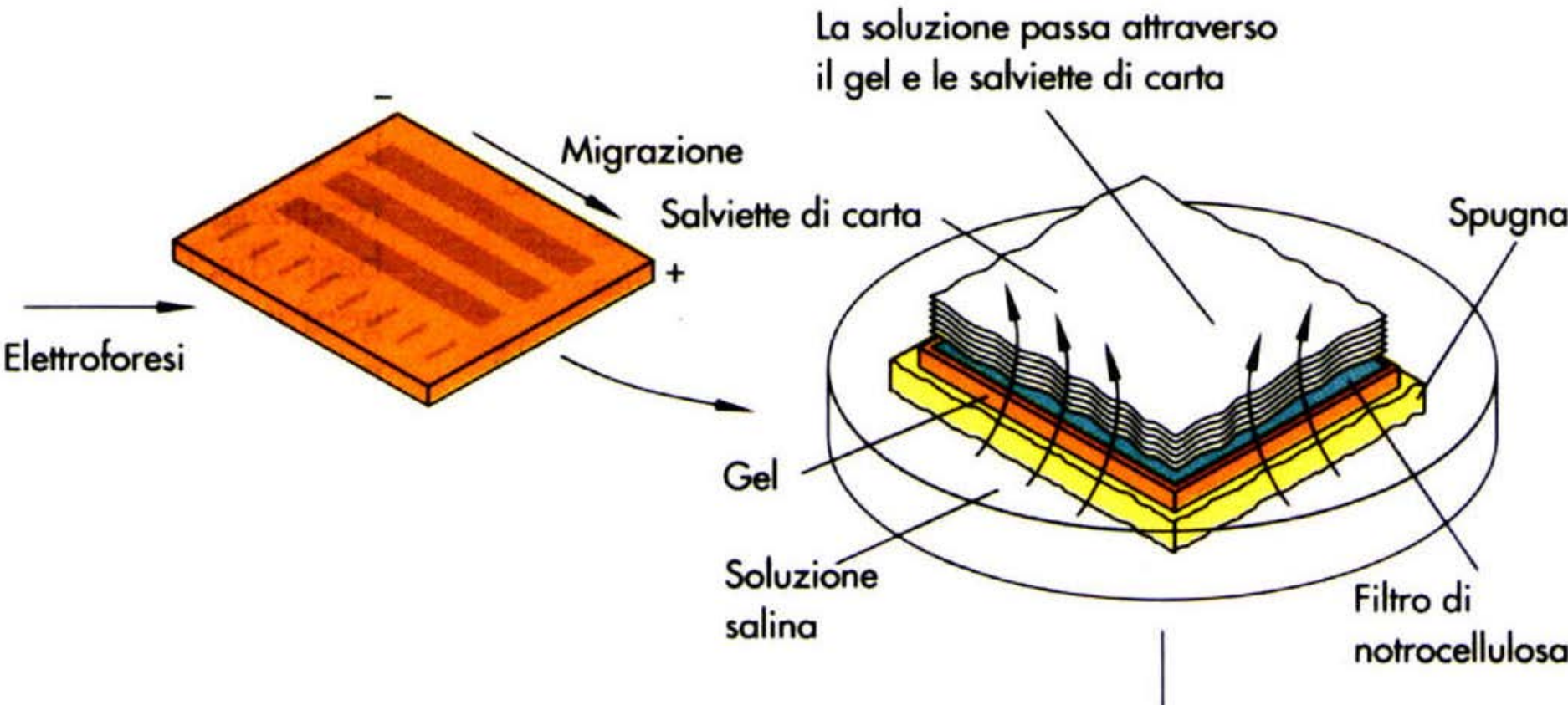
Schema ibridazione



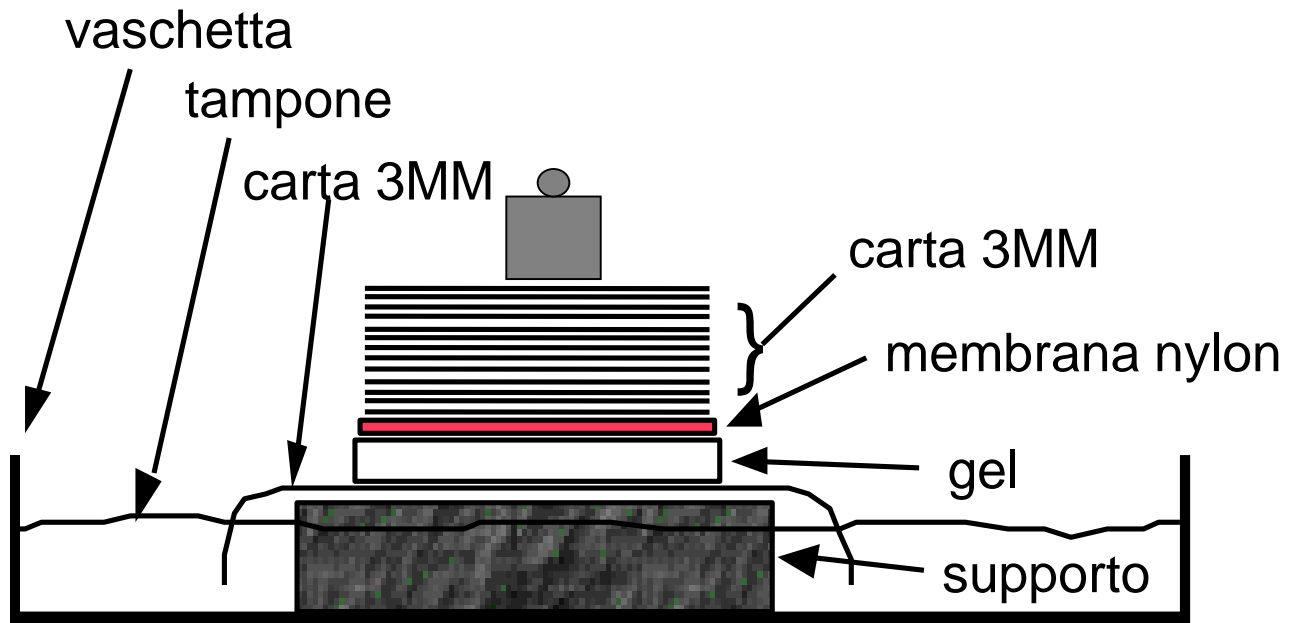
Metodi di trasferimento

- **Capillare**
- **Elettroblot**

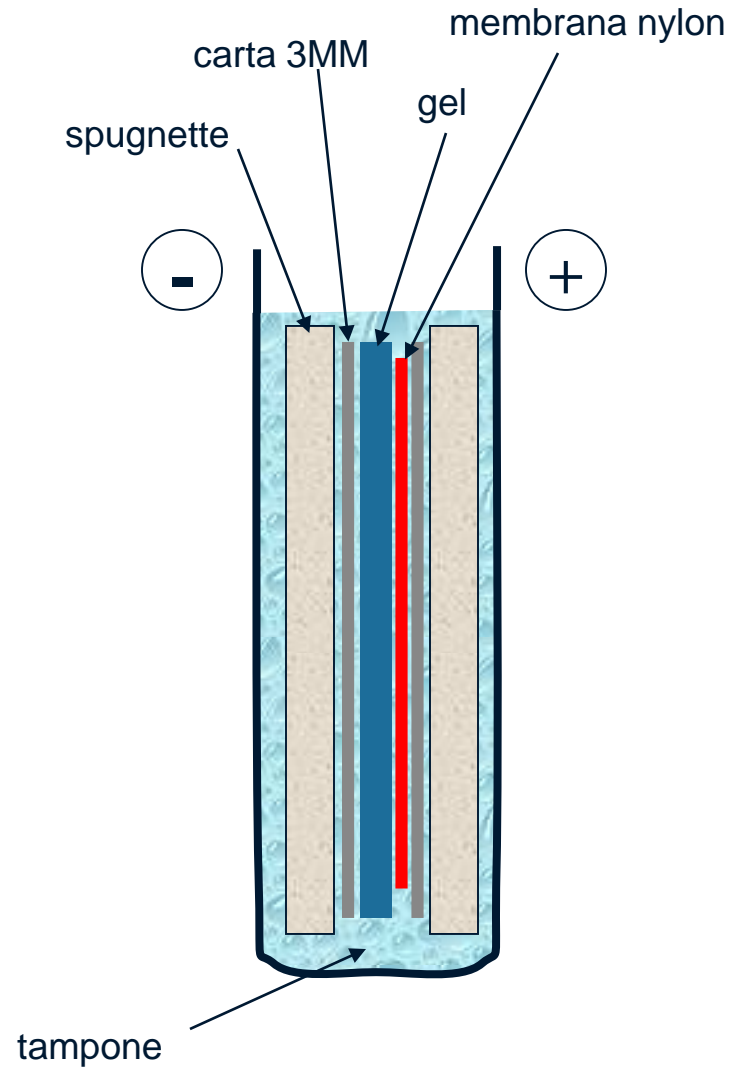
Schema trasferimento



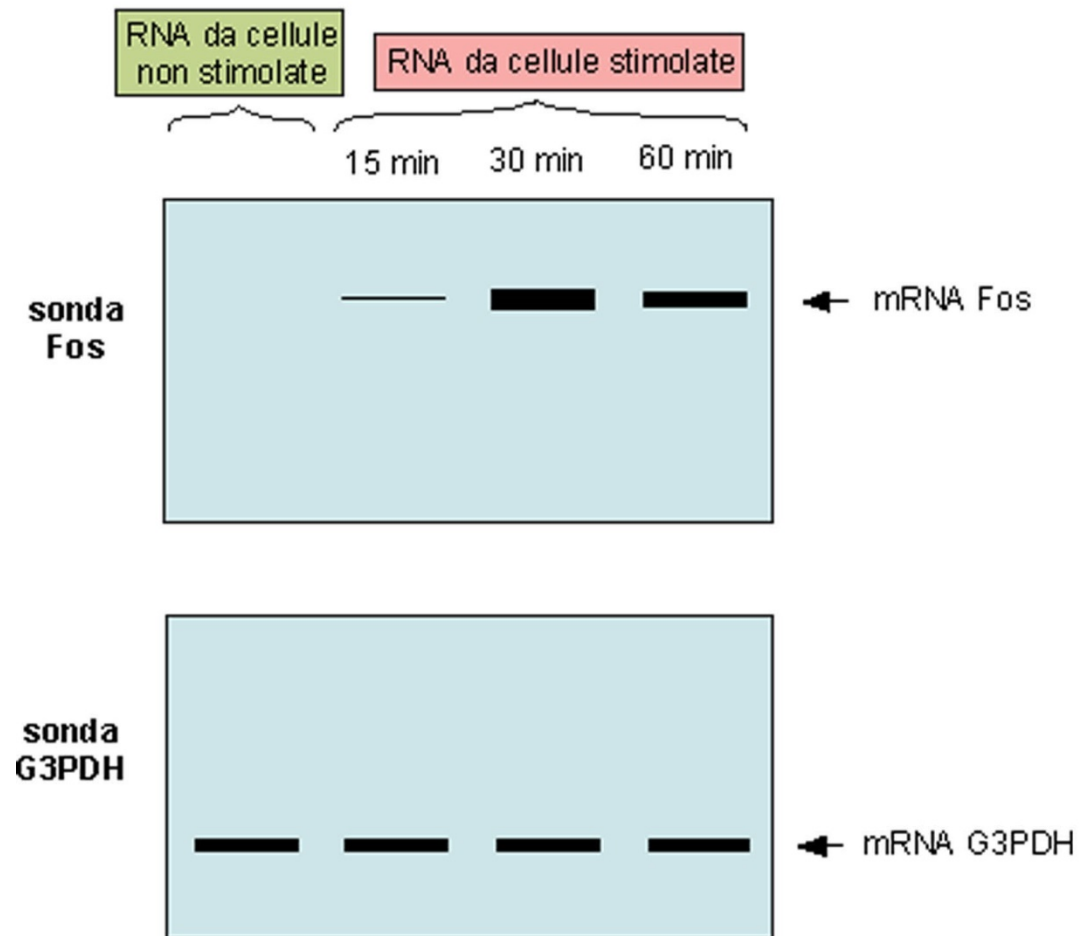
Assemblaggio del blot capillare



Assemblaggio dell'elettroblot



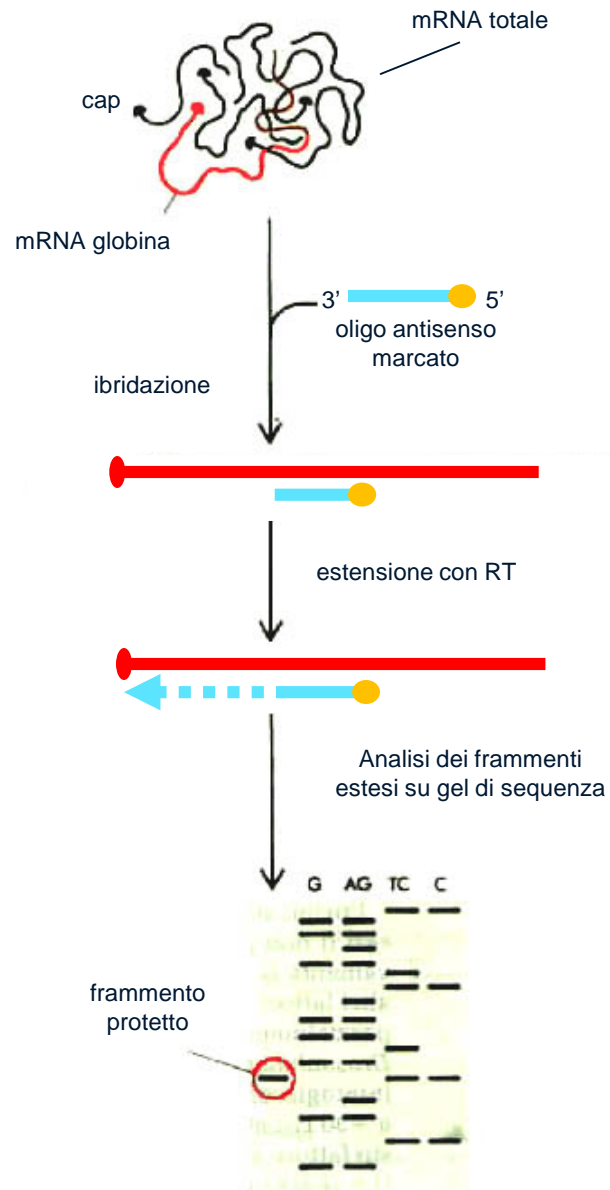
Analisi di espressione con Northern blot



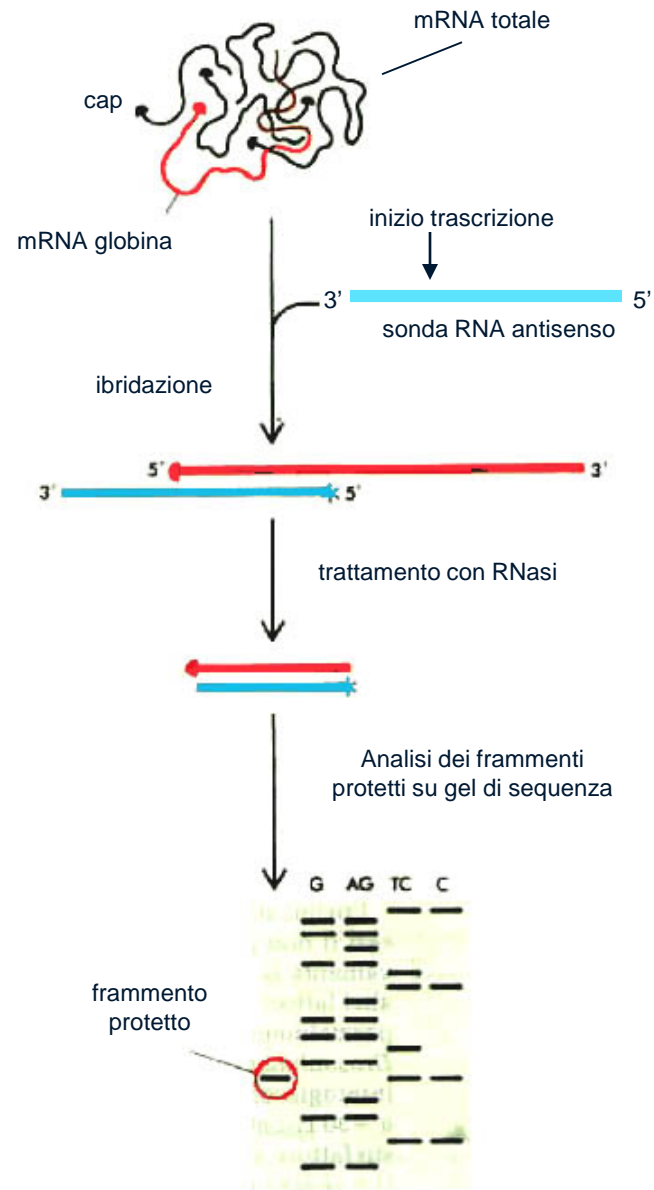
Altre tecniche di analisi

- **Estensione del primer (primer extension)**
- **Protezione dalla S1/RNasi (mapping)**
- **RT-PCR**

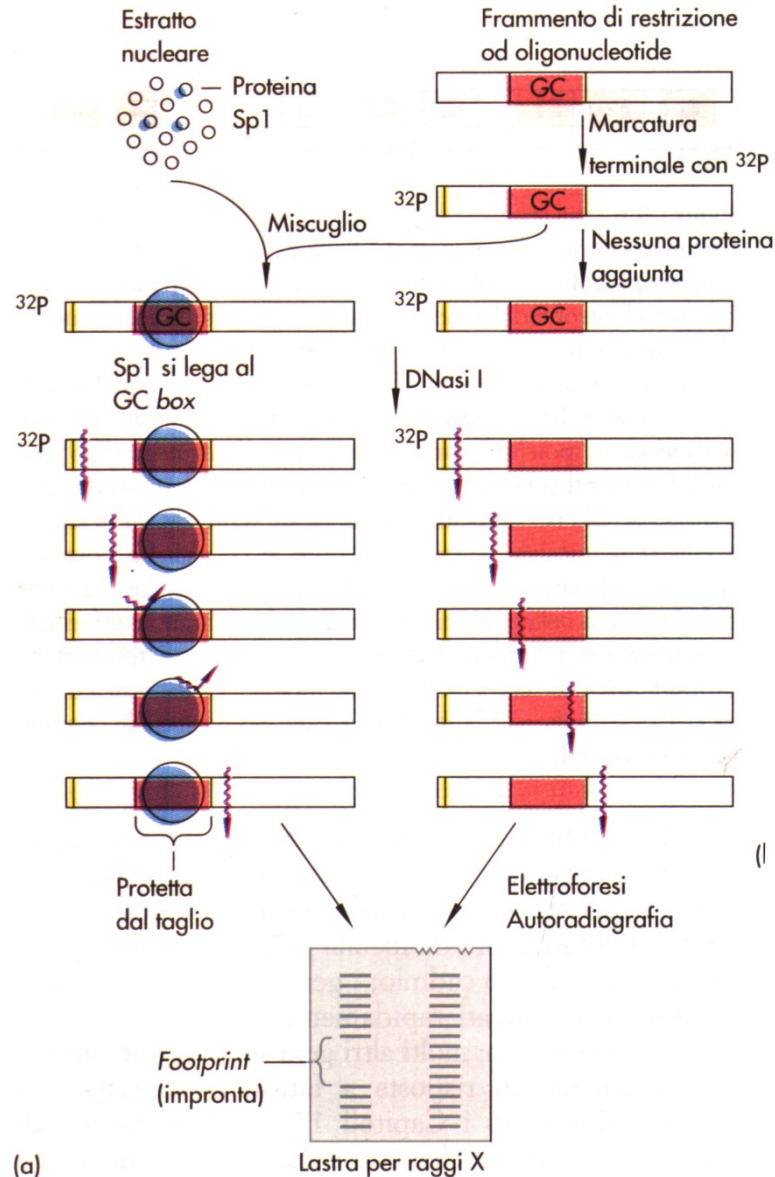
Estensione del primer



Protezione da RNasi (RNase Protection)



Analisi interazioni DNA-proteine: saggio di footprinting



Analisi interazioni DNA-proteine: saggio EMSA

