

Esercitazioni di laboratorio Tecnologie Molecolari e Ricombinanti

Orari e argomenti trattati:

- **Giorno 1: Estrazione di microRNA da plasma e Retro-trascrizione miRs**
(laboratorio didattico, dipartimento SVeB, mammuth, ultimo piano, sez Biochimica e biologia molecolare)

22 (turno A) e 27 (turno B) marzo 2017 dalle 14.00 alle 18.30

- **Giorno 2: Allestimento reazione ddPCR**
(laboratorio didattico, dipartimento SVeB, Mammuth, ultimo piano, sez Biochimica e biologia molecolare, al termine dell'allestimento della reazione ci si sposterà, presso laboratorio di Bio Tech, palazzina ex macello, piano rialzato)

24 (turno A) e 29 (turno B) marzo 2017 dalle 14.00 alle 18.30

- **Giorno 3: Analisi dei dati ottenuti** (auletta didattica, presso palazzina ex macello piano rialzato)

26 (turno A) e 31 (turno B) marzo 2017 dalle 14.00 alle 18.30

Scopo dell'esercitazione

Valutare l'espressione del miR-210 nel plasma di 2 gruppi pazienti β -talassemici:

- ✓ **Pazienti β -talassemici con alti livelli di emoglobina fetale (HbF)**
- ✓ **Pazienti β -talassemici con bassi livelli di emoglobina fetale**

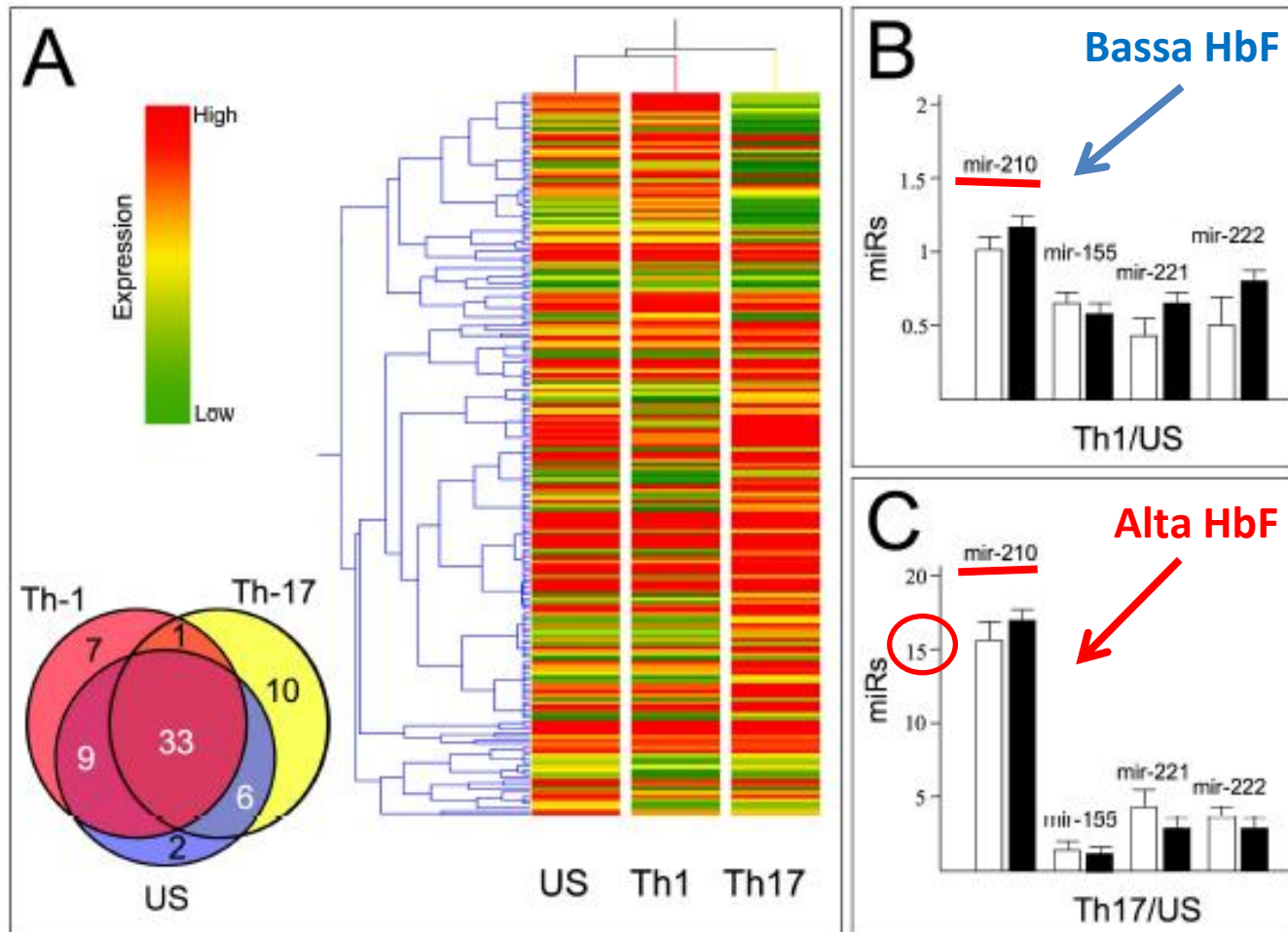
Esiste una correlazione tra livelli di miR-210 ed emoglobina fetale?

Background

BMB
reports

Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression

Nicoletta Bianchi¹, Cristina Zuccato¹, Ilaria Lampronti¹, Monica Borgatti¹ & Roberto Gambari^{1,2,*}



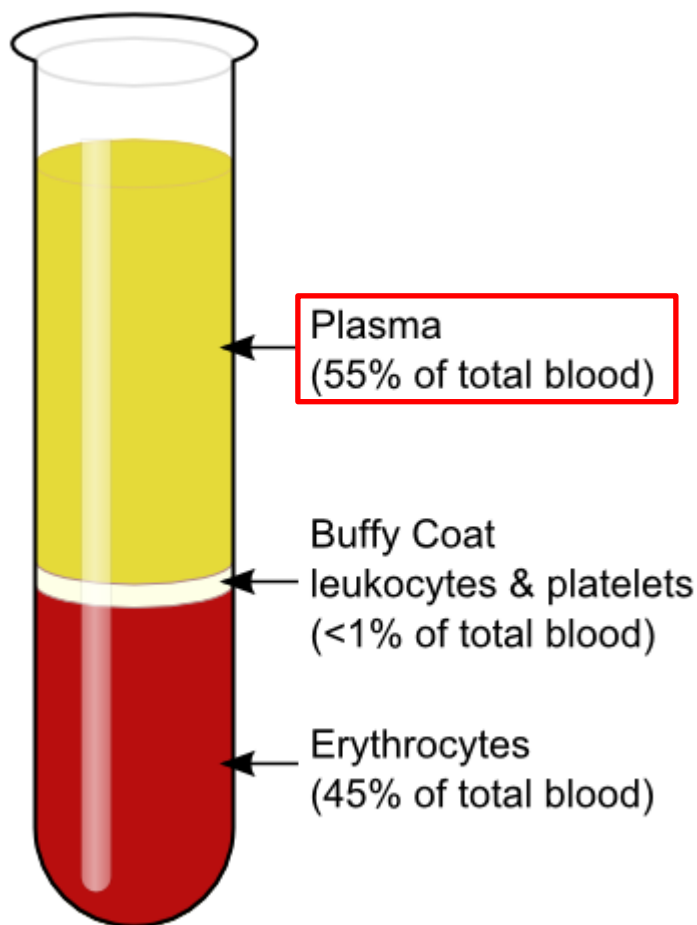
Isolamento del Plasma da sangue periferico

2 tipi di campioni

- ✓ Pazienti β -talassemici con alti livelli di emoglobina fetale
- ✓ Pazienti β -talassemici con bassi livelli di emoglobina fetale

Protocollo

1. Raccolta sangue totale in provette con EDTA
2. Centrifugazione 2.000 g per 10 minuti
3. Recupero della fase superiore (gialla)
4. Centrifugata 16.000 g per 10 minuti
5. Recupero del surnatante
6. Conservare il plasma a -80°C



Plasma o Siero?

Plasma

✓ No coagulazione
del sangue

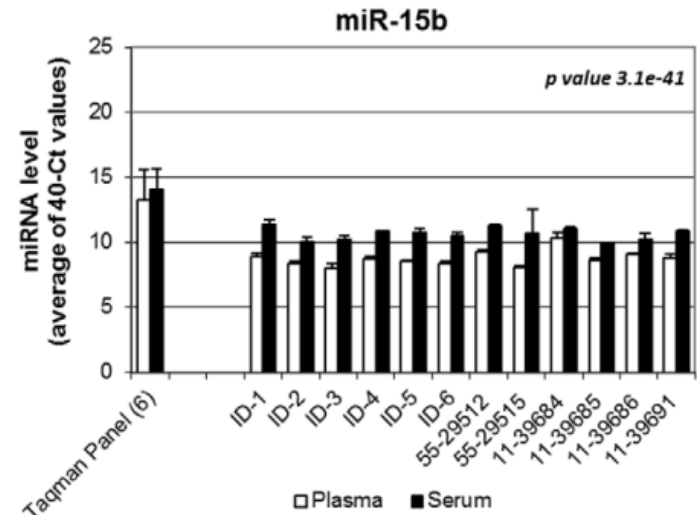
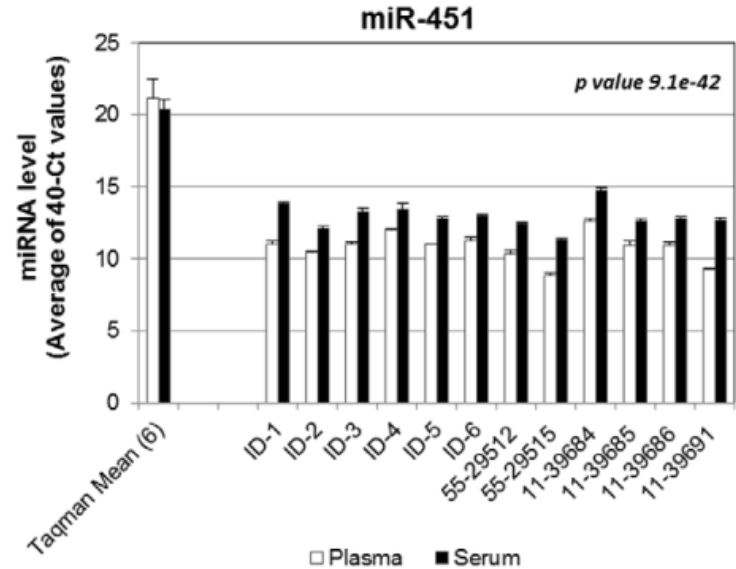
VS

Siero

✓ Sangue subisce
processo di
coagulazione

Protocollo per isolare plasma

1. Raccolta sangue totale in provette con EDTA
2. Far coagulare a temperatura (15-25°C) ambiente per 1 ora
3. Centrifugazione 2.000 g per 10 minuti
4. Recupero della fase superiore (gialla)
5. Centrifugata 16.000 g per 10 minuti
6. Recupero del surnatante
7. Conservare il plasma a -80°C



miRNA

I **microRNA** sono molecole di RNA a singolo filamento (ssRNA), di lunghezza variabile dai 20 ai 25 nucleotidi (scoperti da Ambros, 1993).

✓ Attualmente ne sono conosciuti circa 2500 (www.miRBase.org)



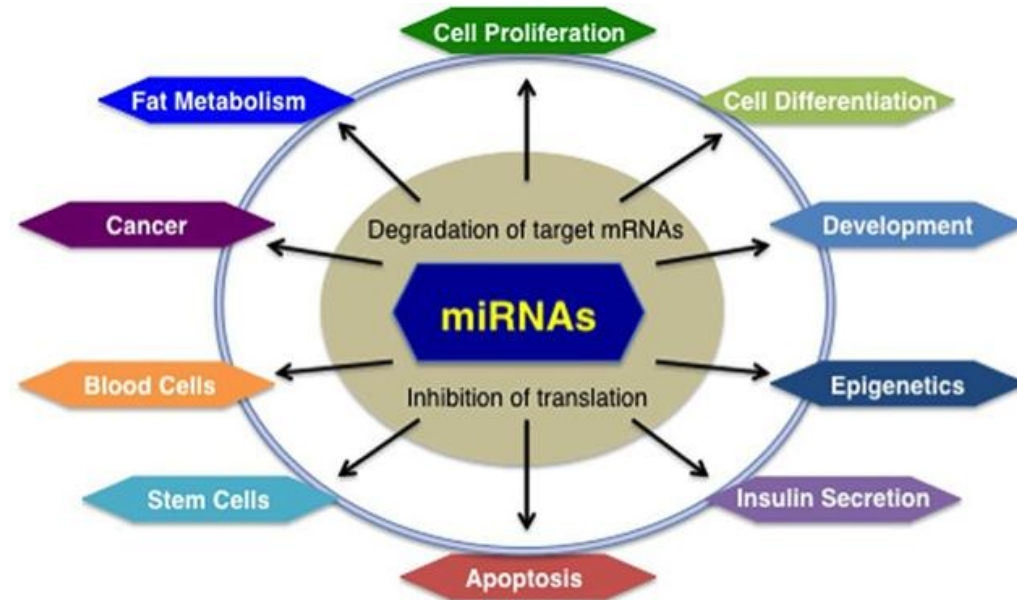
✓ La loro funzione principale è quella di regolare negativamente l'espressione di proteine target, agendo a livello della fase post-trascrizione

✓ Controllano diverse funzioni a livello cellulare

- il ciclo cellulare
- processi metabolici
- la proliferazione cellulare
- il differenziamento cellulare
- i processi di apoptosi

e a livello dell'intero organismo

- lo sviluppo embrionale
- la risposta immunitaria



Cell Free miRNA (cfmiRNA)

/ miRNA sono stabili in diversi fluidi biologici

Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma

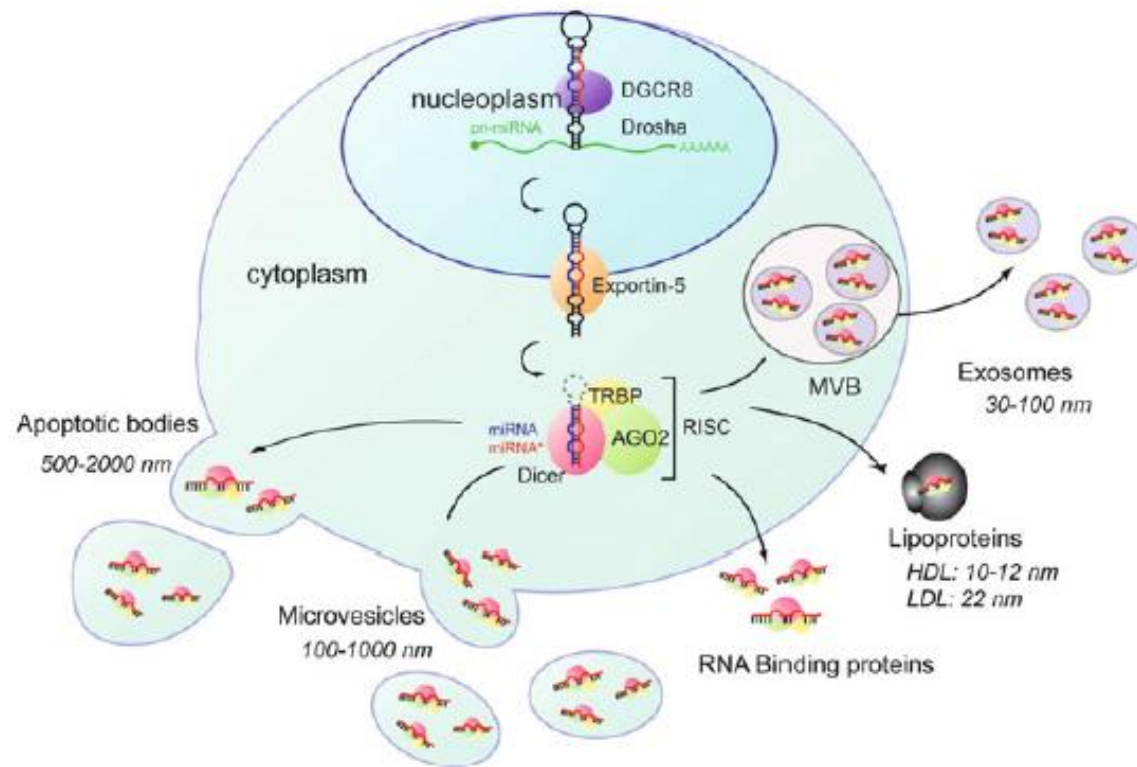
Stephen S.C. Chim,^{1,2†} Tristan K.F. Shing,^{1,3†} Emily C.W. Hung,^{1,3} Tak-yeung Leung,² Tze-kin Lau,^{1,2} Rossa W.K. Chiu,^{1,3} and Y.M. Dennis Lo^{1,3*}

✓ Extracellular Vesicles (Evs)

- Microvescicole
- Esosomi
- Corpi apoptotici

✓ Non-vesicular carrier (90%)

- High Density Lipoprotein
- NPM1
- AGO1 o AGO2



Cf-miRNA come Biomarker

Molecole 'predittive' della presenza di patologia

Analizzati in diverse patologie

- Cancro
- Patologie epatiche
- Patologie cardiache
- Miopatie
- Diabete
- Patologie infiammatorie
- Patologie neurodegenerative

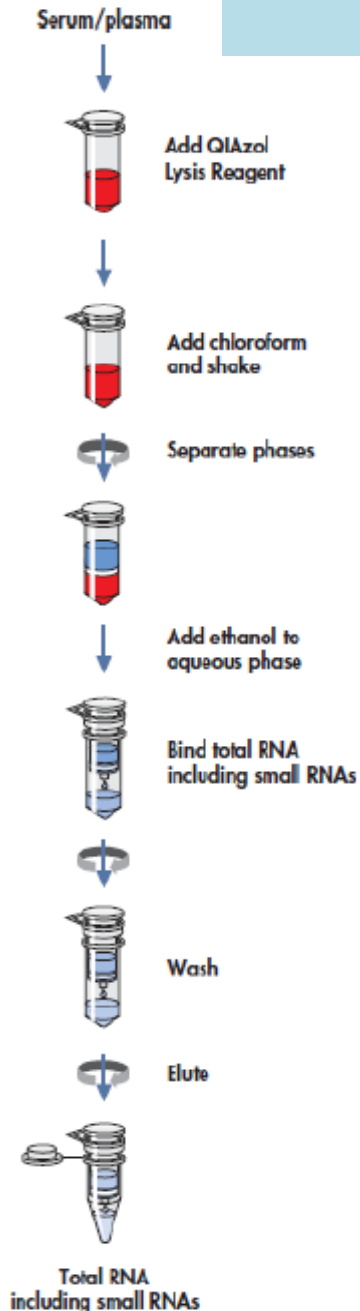
Vantaggi

- ✓ Stabili nei fluidi biologici
- ✓ Metodica non invasiva

Svantaggi

- ✓ Non esiste ancora una metodica standardizzata
- ✓ Necessità di normalizzare il dato
- ✓ Specificità

Estrazione di miRNA da plasma

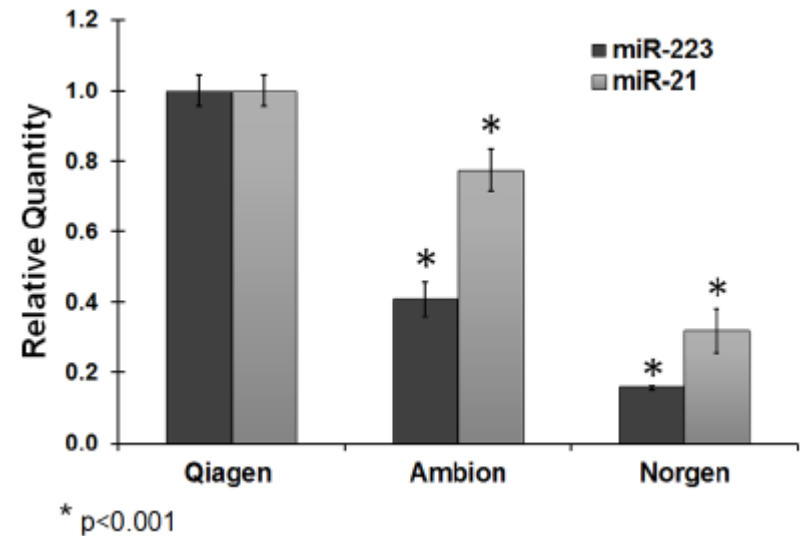
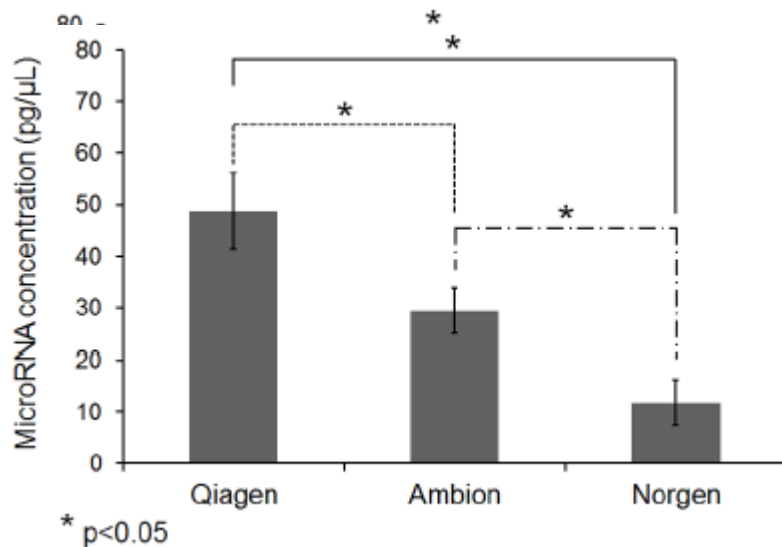


- Permette di processare piccoli volumi di plasma (50-200 μ l)
- Combinazione di due metodiche: lisi con fenolo-guanidina tiocianato associata a purificazione in colonnina
- Recupero RNA totale

Maximum binding capacity	45 μ g RNA
Maximum loading volume	700 μ l
RNA size distribution	RNA > 18 nucleotides approximately
Minimum elution volume	10 μ l
Maximum amount of serum or plasma	200 μ l

Estrazione di miRNA da plasma

Perché usiamo miRNAEasy Serum/Plasma Kit?



Anal Biochem. 2012 December 1; 431(1): 69–75. doi:10.1016/j.ab.2012.09.007.

METHOD FOR MICRORNA ISOLATION FROM CLINICAL SERUM SAMPLES

Yu Li^{†, #} and Kris V. Kowdley^{†, #}

Detection di microRNA tramite metodiche PCR

- Primers molto corti
- % di GC nella sequenza dei vari miR è molto variabile
- % di miRNA sull'RNA totale è molto bassa (0.01%)
- Livelli di espressione estremamente diversi da miR a miR

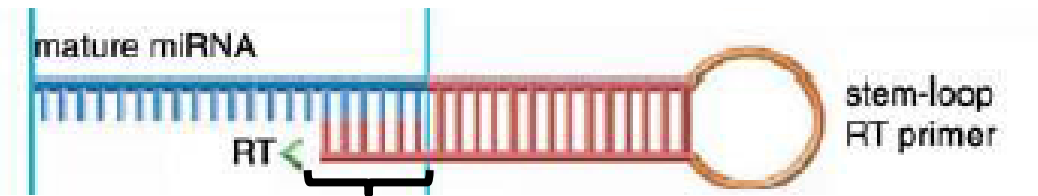
✓ TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem)

✓ **miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon)**

Retro-Trascrizione miRNA

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit

1. Legame del primer

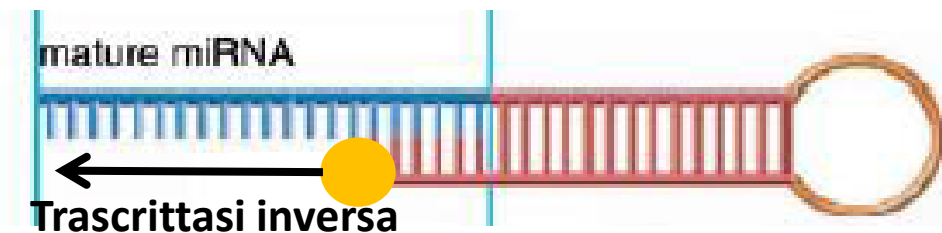


Zona di complementarità con
il miR

➤ miR-specifica

➤ Consente di ottenere un cDNA complementare al miR 'target'.

2. RetroTrascrizione



Trascrittasi inversa

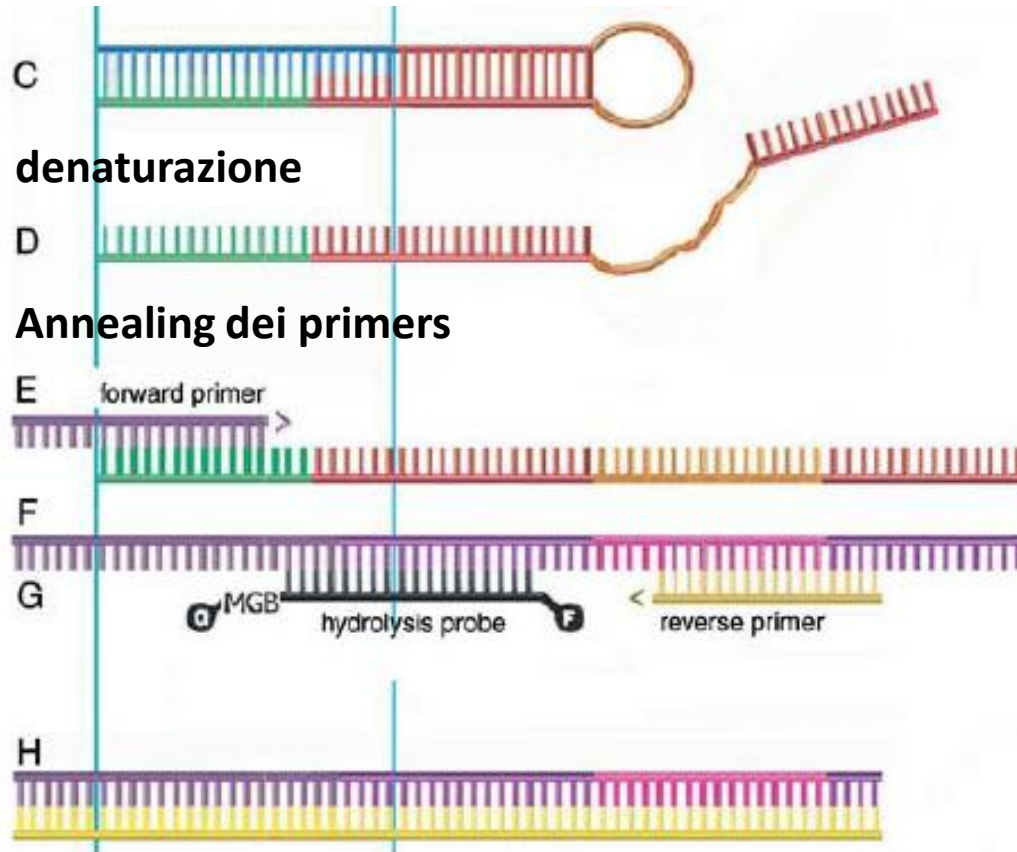
➤ utilizza un 'innesco' a forma di 'forcina'

➤ Riconosce solo miR maturi

Amplificazione dei miRNA

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit

cDNA ottenuto dall'RT



✓ Doppia specificità: in fase di retrotrascrizione e in fase di amplificazione

✓ Discrimina fra miR maturo e pre/pri-miRNA

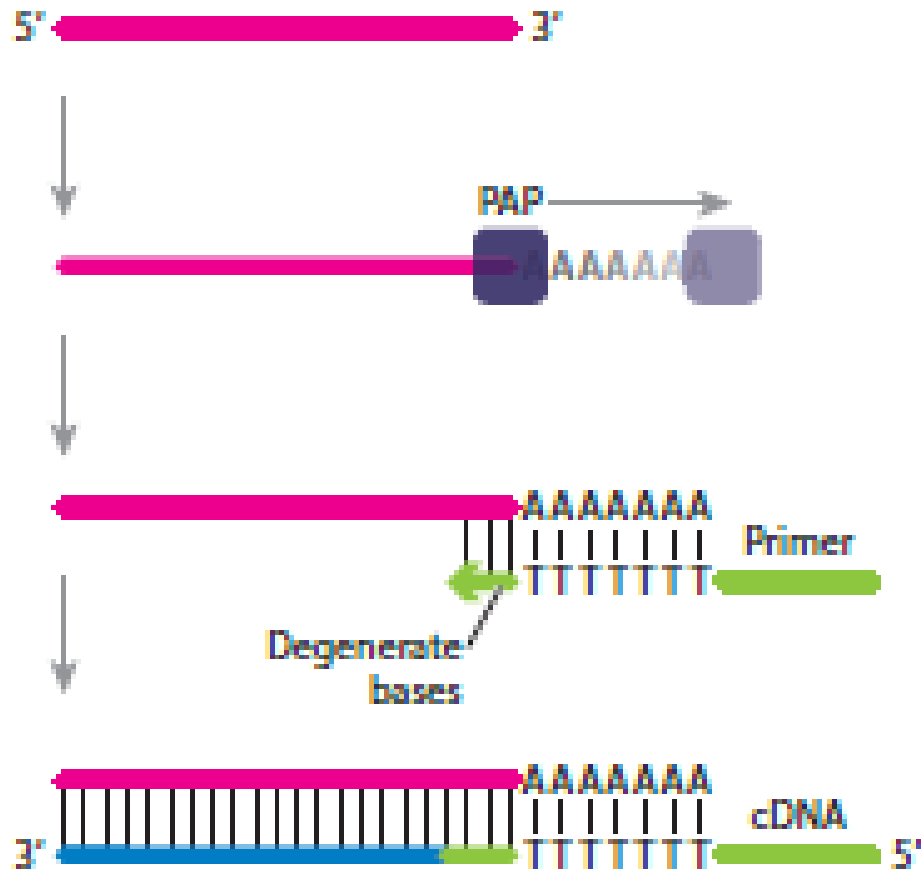
✓ Utilizzabile sia in RTqPCR sia in **ddPCR**

Primer forward: miRNA specifico

Primer reverse: universale

Retro-Trascrizione miRNA

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR



*Polyadenylate polymerase builds the poly(A) tail by adding adenosine monophosphate units from adenosine triphosphate to the RNA

✓ Si ottiene un cDNA universale: possono essere analizzati tutti i miRNA

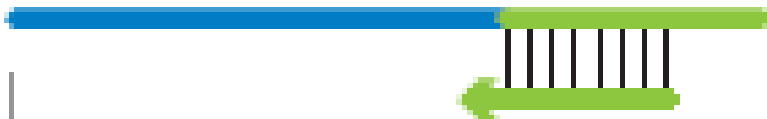
✓ Rapido (one step)

✓ Non discrimina fra miR maturo e precursori (la discriminazione avviene in fase di RTqPCR)

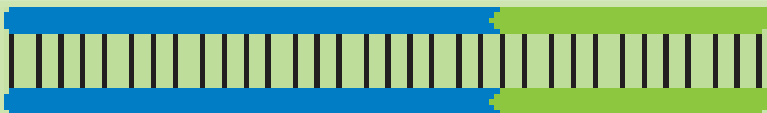
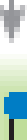
Amplificazione dei miRNA

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR

miR-specific
forward primer



Reverse primer



Detection with SYBR Green

L'impiego di primers a LNA garantisce

- ✓ Alta specificità
- ✓ Alta sensibilità

Utilizzabile sia in RTqPCR sia in ddPCR

Droplet Digital PCR (ddPCR)

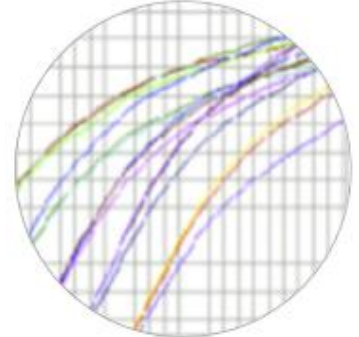
Che cos'è la ddPCR?

1980



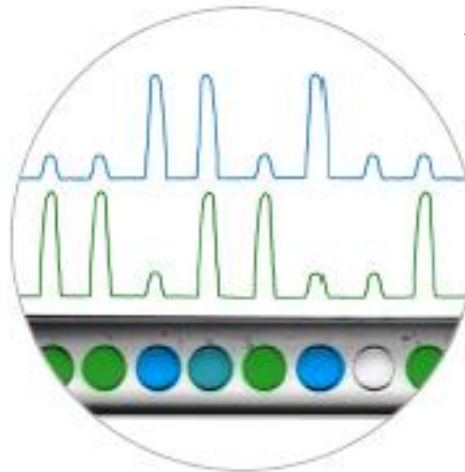
PCR
Qualitative

1990



Real-time PCR
Relative Quantitation

2010



Droplet Digital PCR
Absolute Quantitation

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Metodi tradizionali

- ✓ Campione
- ✓ Primers
- ✓ DNA Polimerase
- ✓ dNTPs

In un unico sistema
omogeneo



VS.

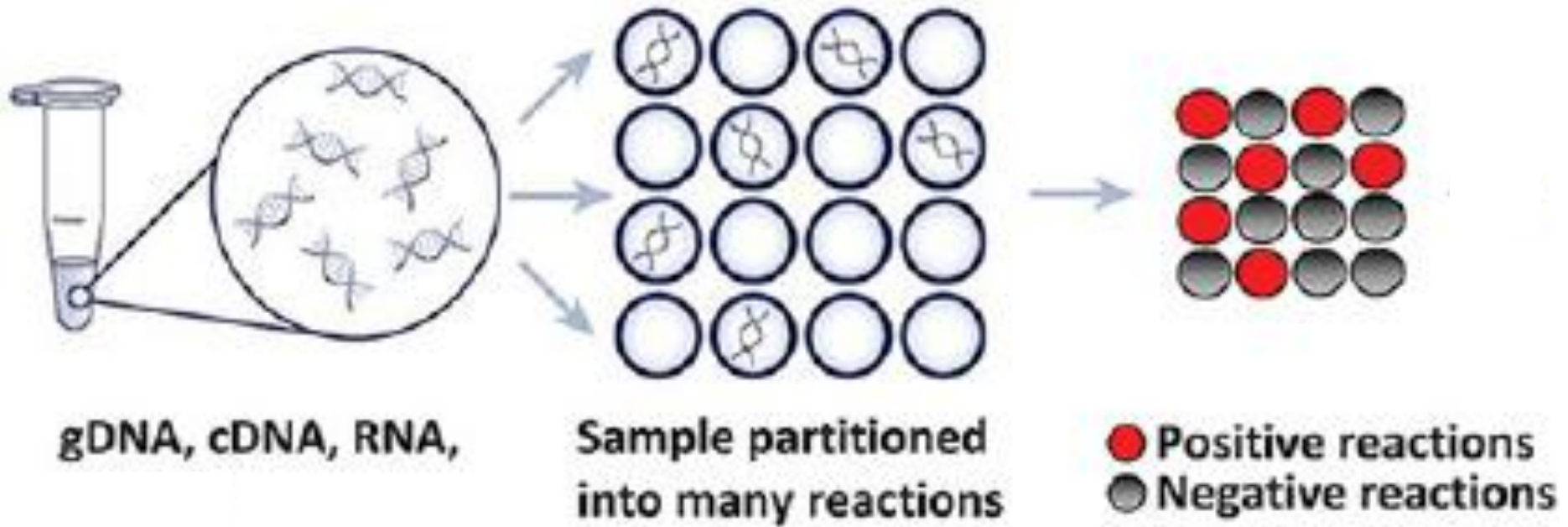


ddPCR

- ✓ Campione
- ✓ Primers
- ✓ DNA Polimerase
- ✓ dNTPs

Separati in circa 20.000
goccioline

Droplet Digital PCR (ddPCR)



Droplet Digital PCR (ddPCR)

Caratteristiche delle droplets

Closed tubes from source



Thermal
cycler

✓ Emulsione acqua (droplets) in olio

✓ Dimensioni di alcuni nanolitri

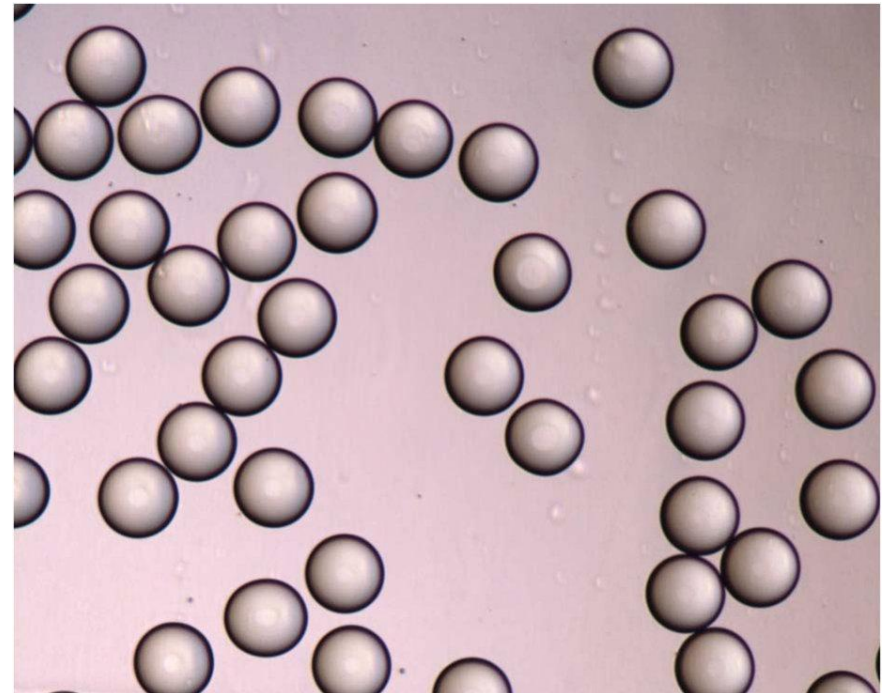
✓ Circa 20.000 per campione

Droplet
schematic

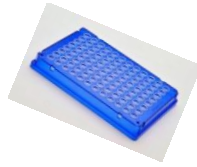
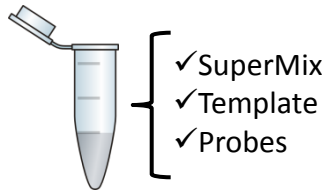


Surfactant
interface

Fluorocarbon
oil exterior



1. Set up the reaction



Droplet Digital PCR (ddPCR)

2. Generate droplets



(QX-200 Automated Droplet Generator)

3. Seal the plate



(PX1 PCR Plate Sealer)

4. Amplification



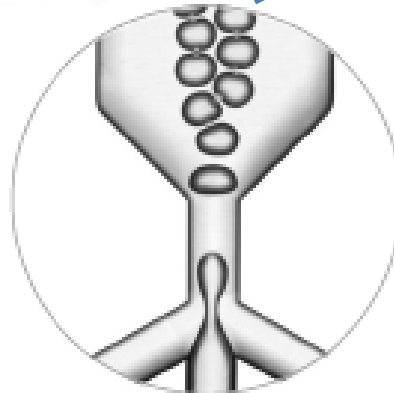
5. Read the plate



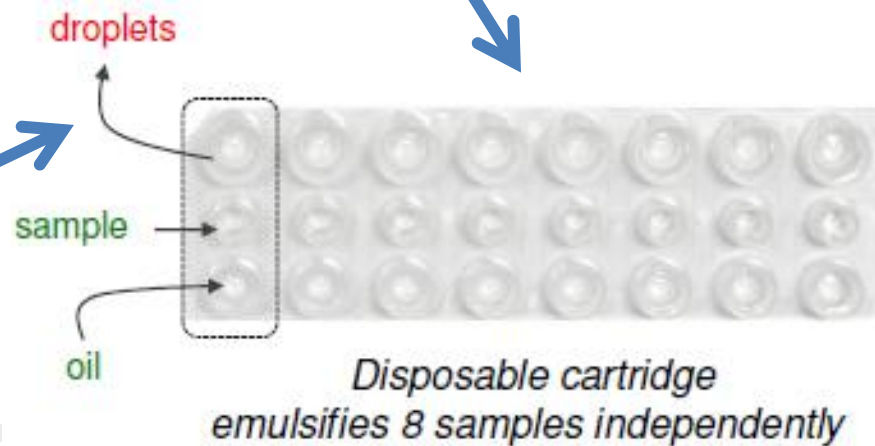
(QX-200 Droplet Reader)

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Automated Droplet Generator

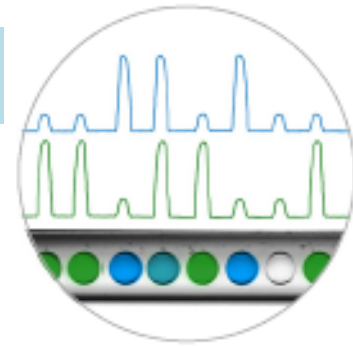


Make Droplets

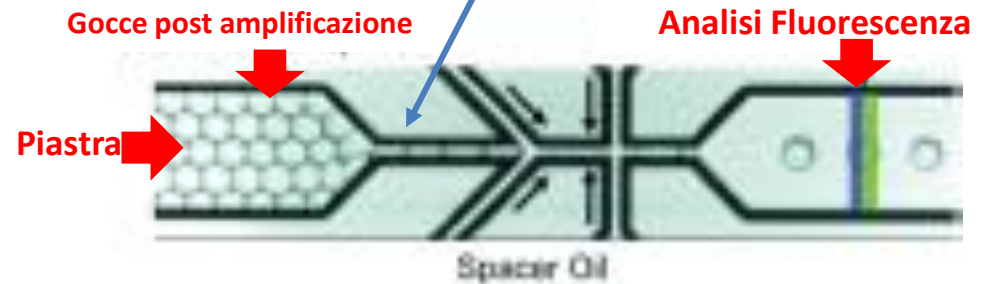


Droplet Digital PCR (ddPCR)

QX200™ Droplet Reader



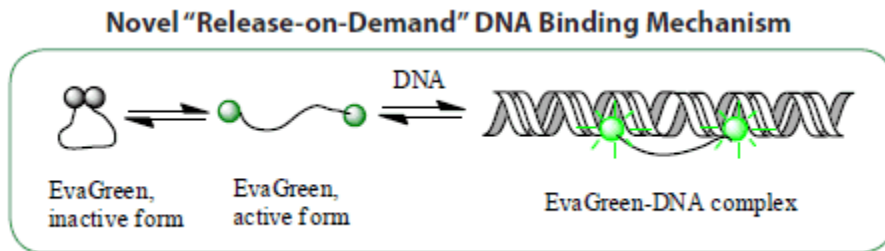
Read Droplets



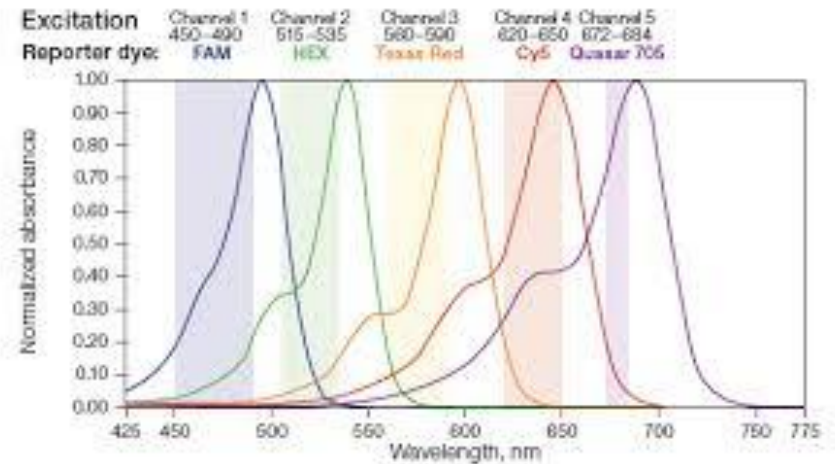
Droplet Digital PCR (ddPCR)

Che molecole può leggere?

EvaGreen™



Sonde TaqMan™



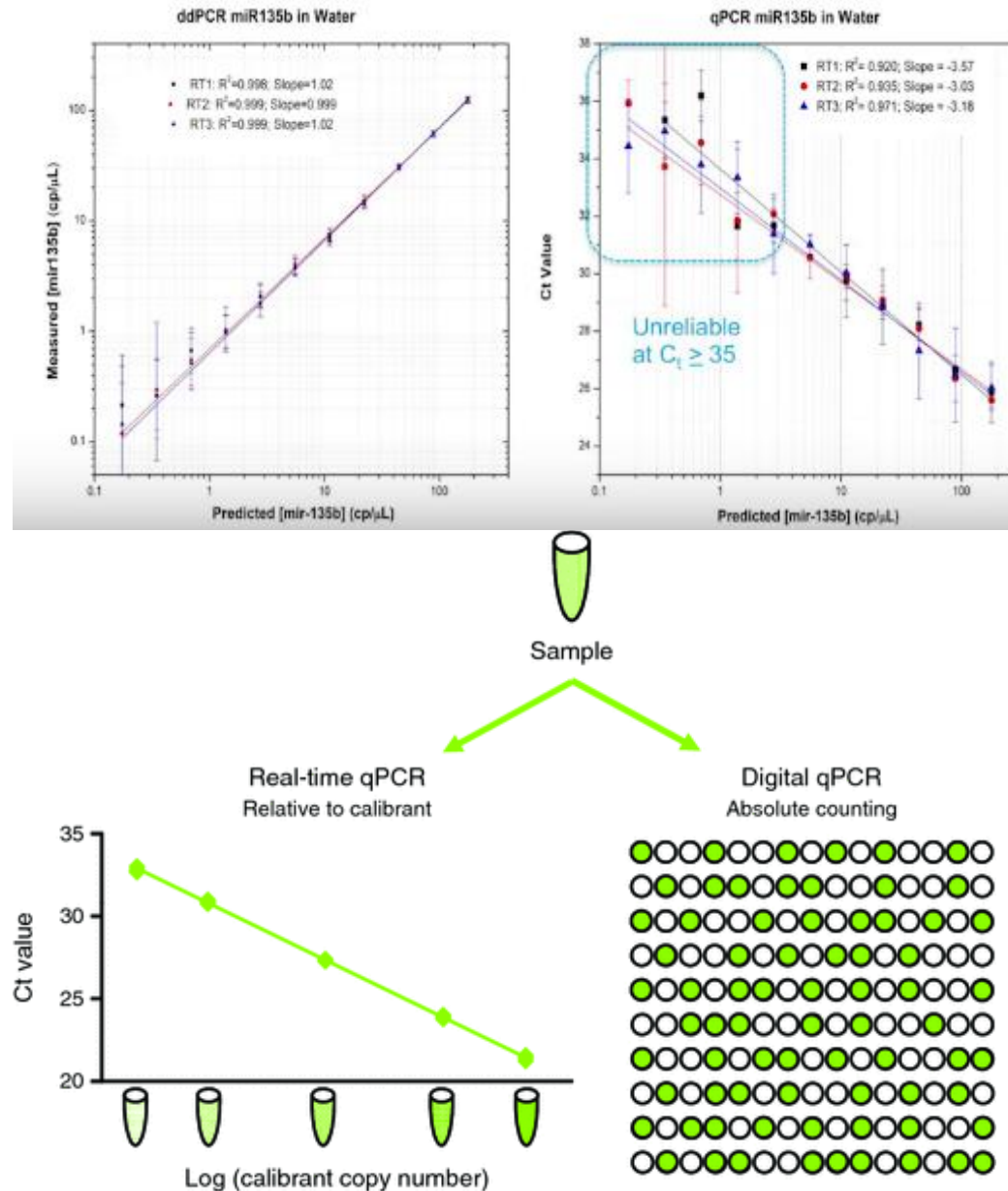
✓FAM

✓HEX/VIC

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Principali vantaggi ddPCR

- ✓ Non sono necessari replicati
- ✓ Maggiore riproducibilità alle basse concentrazioni
- ✓ Quantificazione assoluta (copie/ul per pozzetto)
- ✓ Meno sensibili agli inibitori della reazione di amplificazione
- ✓ Possibilità di confrontare campioni analizzati in momenti diversi e/o in laboratori diversi



Droplet Digital PCR (ddPCR)

Legge di Poisson (Legge degli eventi rari)



Siméon Denis Poisson
(1781-1840)

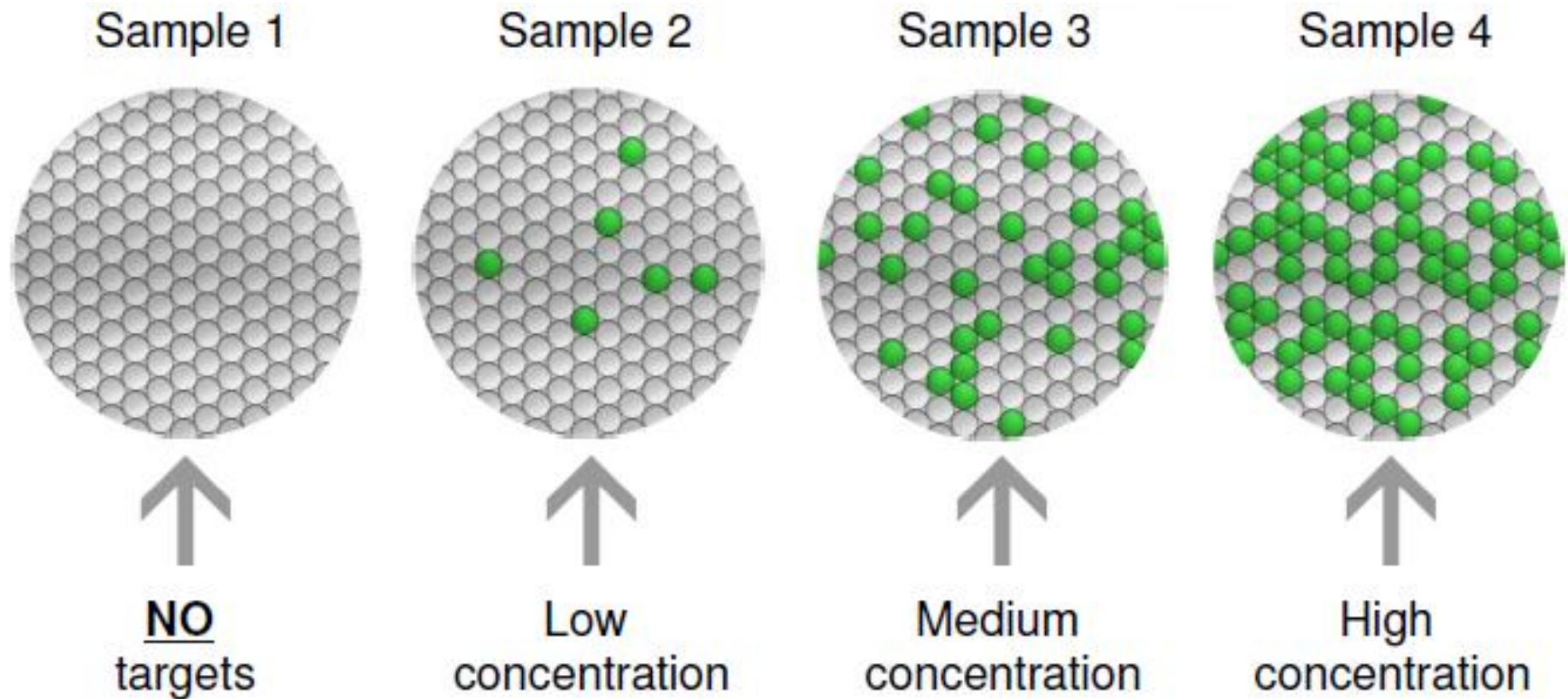
$$-\ln\left(1 - \frac{\text{positives}}{\text{total counted}}\right)$$

(positives + negatives)

Vi è una distribuzione casuale (di eventi indipendenti) delle molecole di DNA da analizzare nelle gocce: queste molecole vengono ripartite casualmente durante la formazione dell'emulsione del campione. Alcune non conterranno template, altre 1 sola molecola, altre ancora più di una. Producendo un numero sufficientemente elevato (20.000) di gocce avremo più probabilità che queste conterranno una sola molecola di DNA.

Il numero di gocce contenenti una molecola di DNA/cDNA dipenderà dalla concentrazione di DNA/cDNA del campione di partenza

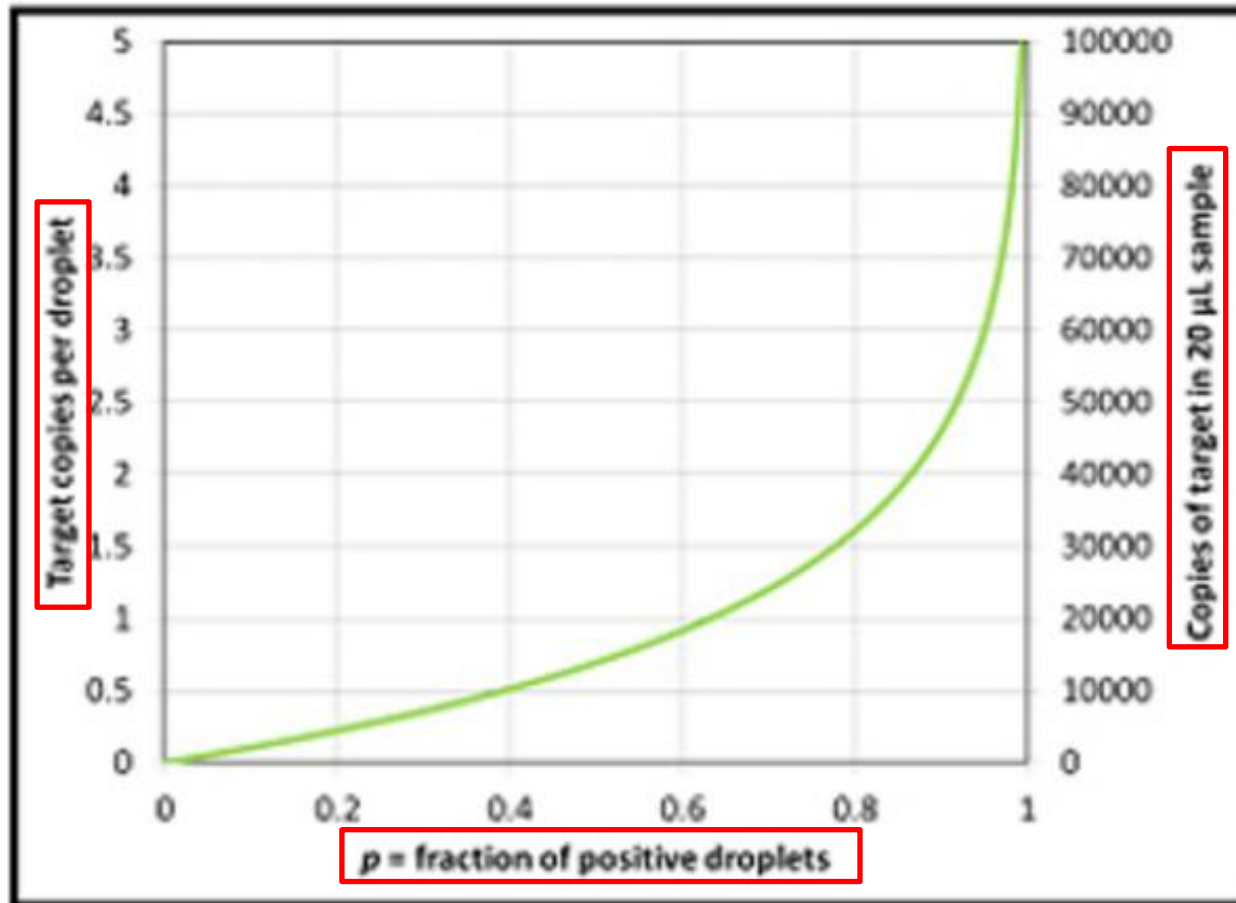
Droplet Digital PCR (ddPCR)



L'equazione di Poisson può essere utilizzata per determinare il numero di molecole di template che andranno a finire in ogni goccia.

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Legge di Poisson (Legge degli eventi rari)

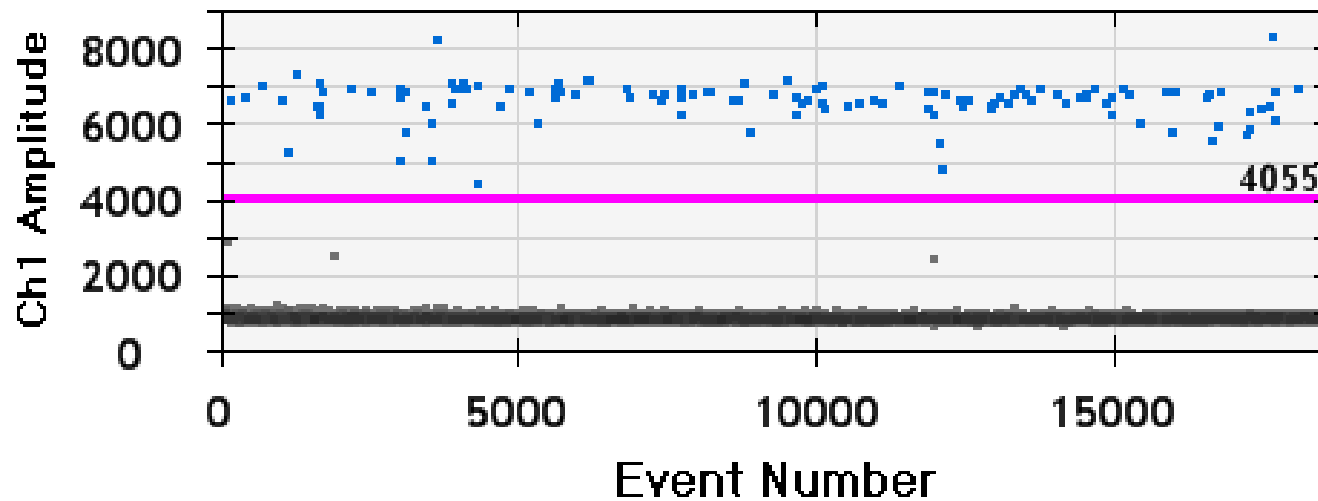
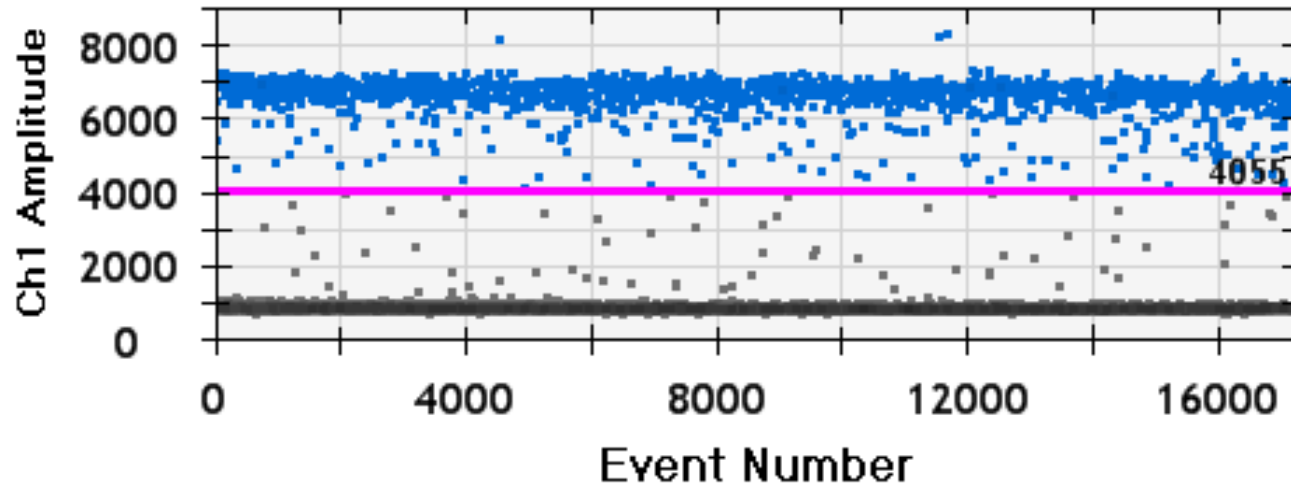


$$p = \frac{\text{positives}}{\text{total counted}} \\ (\text{positives} + \text{negatives})$$

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Plot 1D

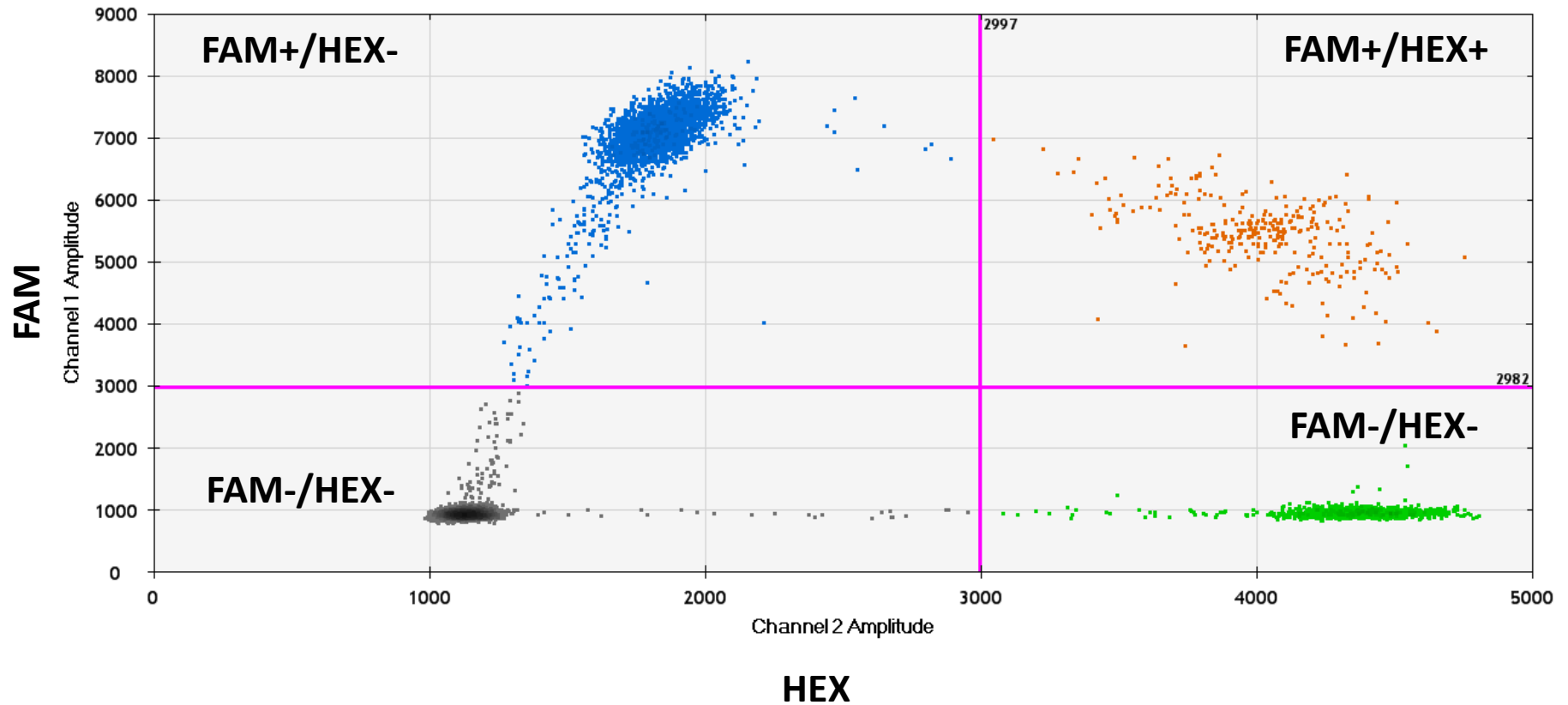
Analisi dei dati



Droplet Digital PCR (ddPCR)

Plot 2D

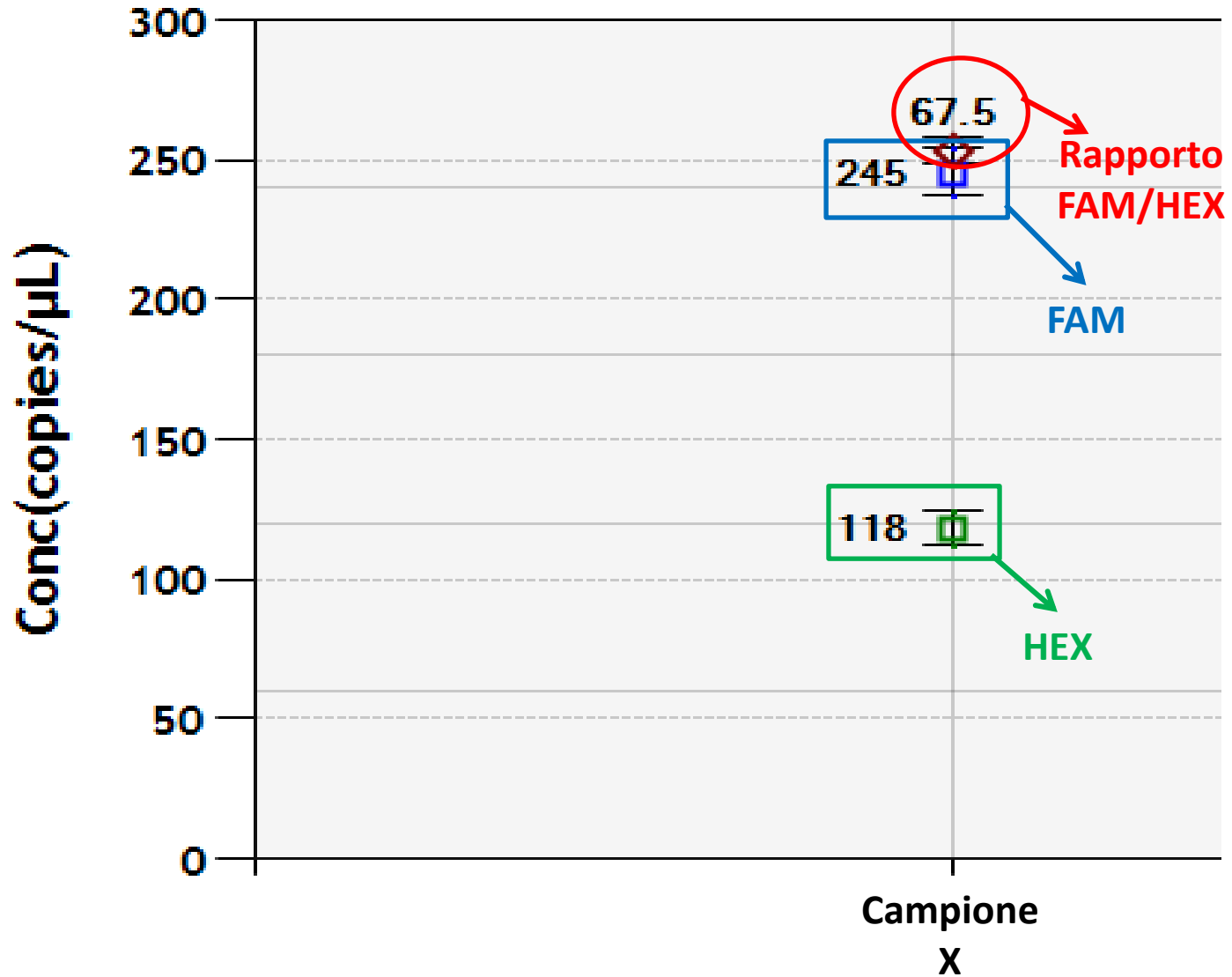
Analisi dei dati



Per analisi con 2 fluorofori

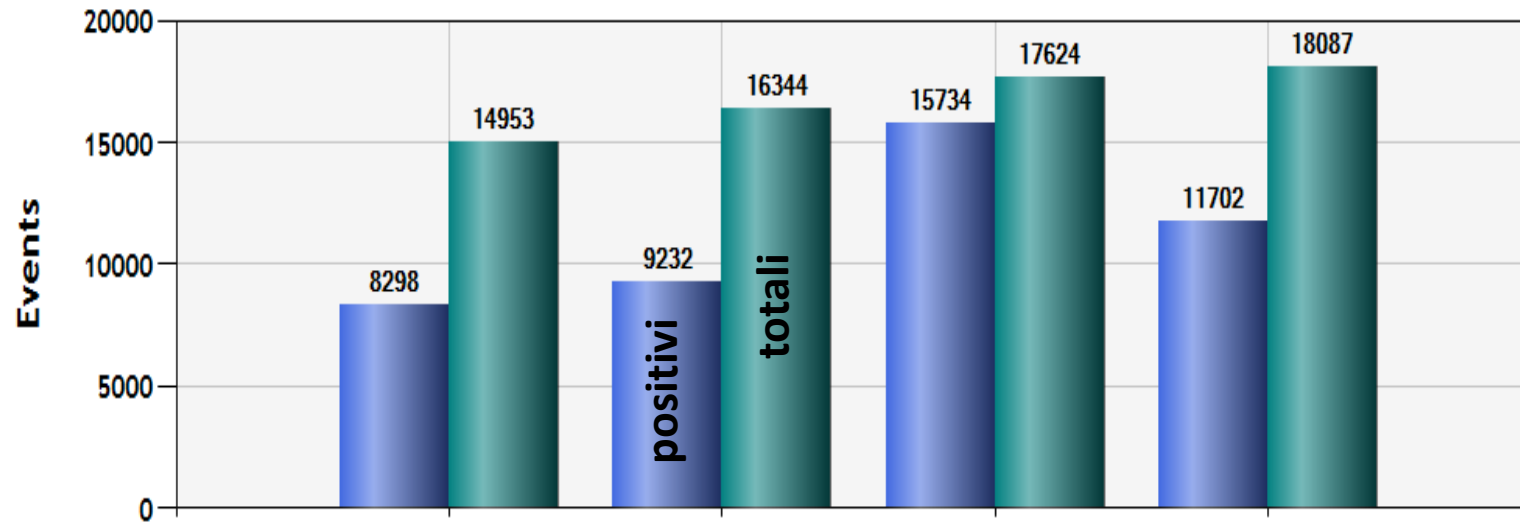
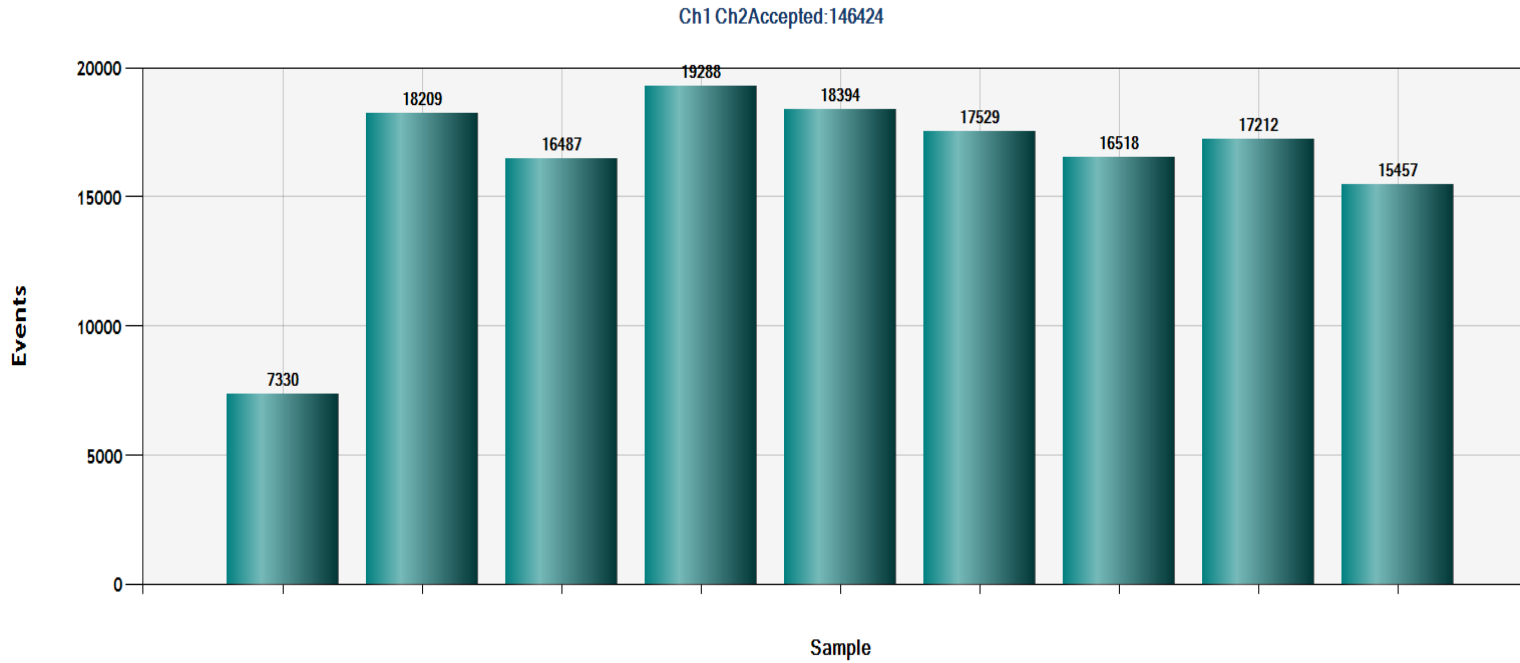
Droplet Digital PCR (ddPCR)

concentration



Droplet Digital PCR (ddPCR)

N° eventi



Droplet Digital PCR (ddPCR)

Saggi in ddPCR

1. RED (Rare Event Detection) ricerca di target espressi in quantità minimale all'interno di una matrice con caratteristiche molto simili.

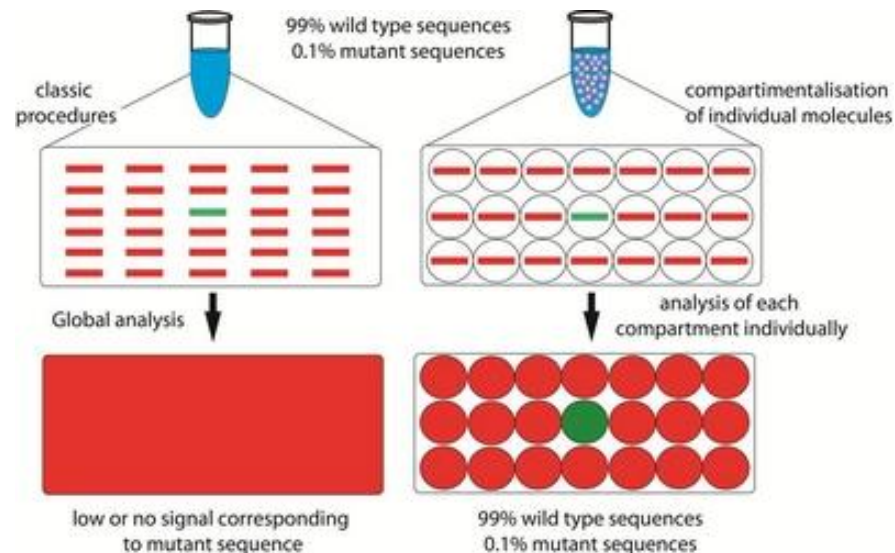
✓ Ricerca di DNA batterico o virale all'interno di una matrice complessa come il DNA umano

✓ Ricerca mutazioni rare (di solito mutazioni puntiformi presenti in quantità inferiori al 1% in un contesto di DNA wild type)

Campi di applicazione:

-Analisi di mutazioni tumorali

-Diagnostica prenatale



2. CNV (Copy Number Variation): valuta il cambio di ploidia di alcuni geni

3. GEX (Gene Expression): per target **poco espressi**, per analisi da **singola cellula**.