

Applicazioni scientifiche

- Gli enzimi di restrizione possono essere utilizzati per analizzare il DNA genomico mediante la tecnica del **Southern blot**. Il campione viene digerito con uno o più enzimi di restrizione per generare frammenti di DNA di diverse dimensioni che vengono poi separati mediante elettroforesi su gel, dove le diverse lunghezze dei frammenti creano una sorta di «mappa» del DNA, che può essere utilizzata in diagnostica per analizzare mutazioni su geni specifici presenti in un individuo, di una famiglia o di una popolazione (**Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP**).

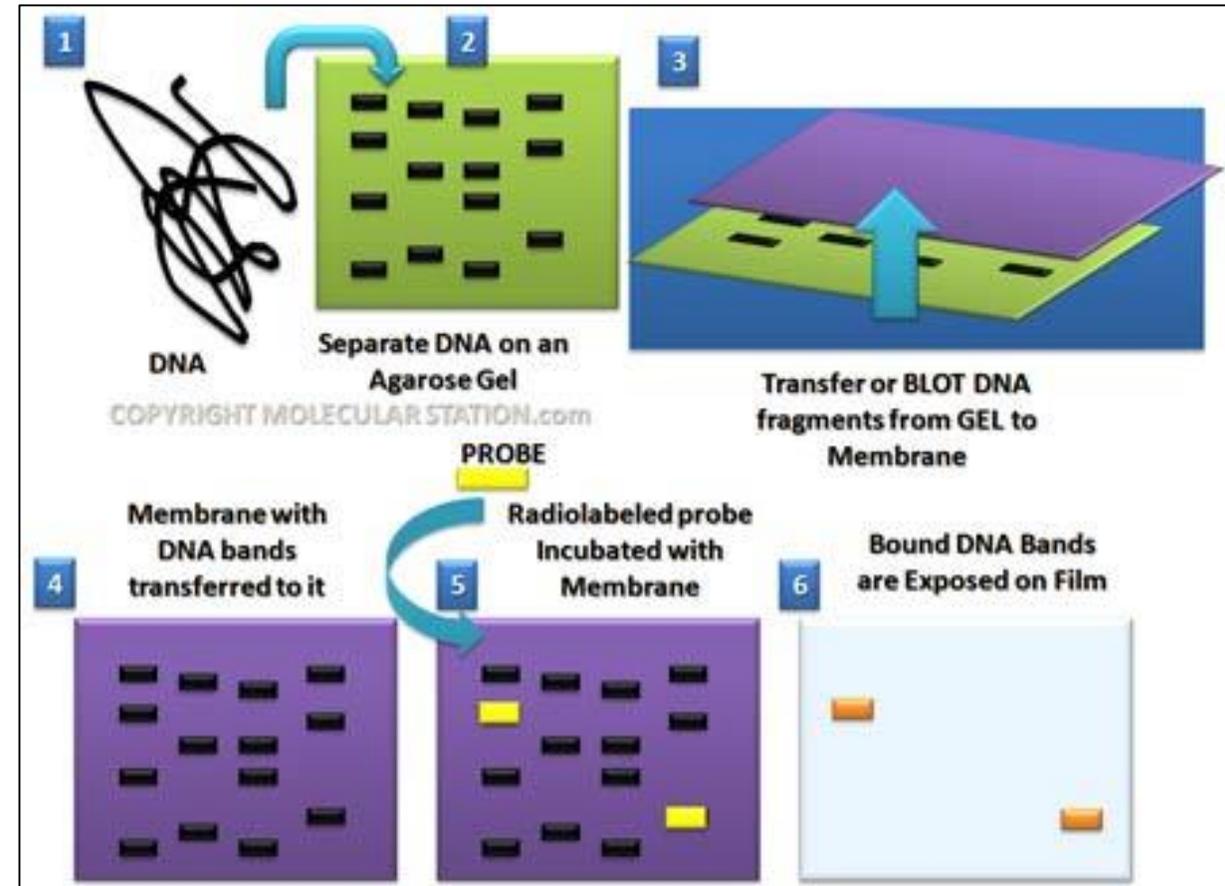
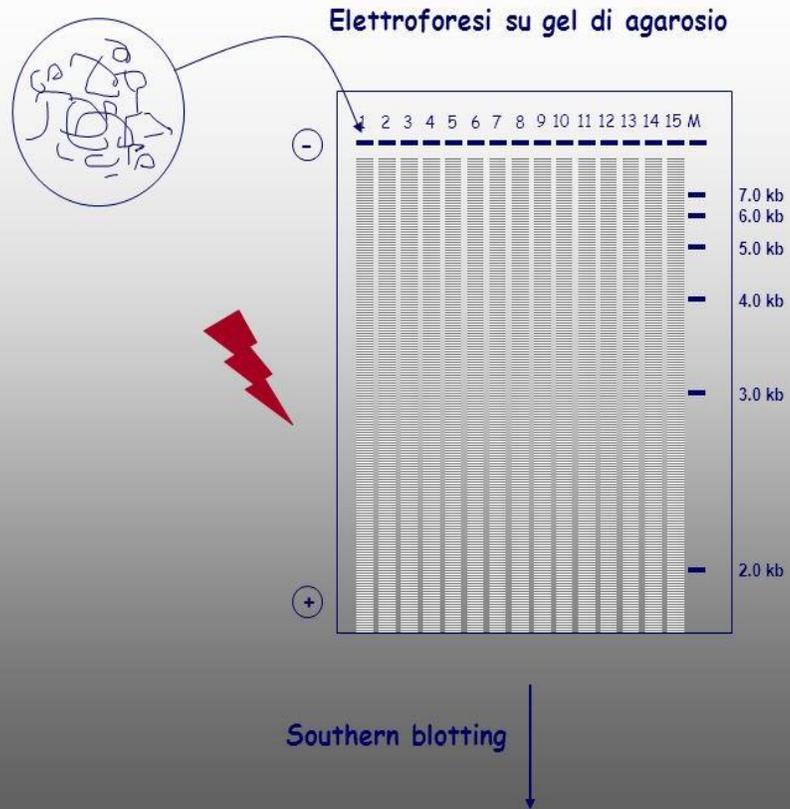
- ▶ Developed by Edward M. Southern in 1975.
- ▶ Routinely used in molecular biology for detection of a specific DNA.
- ▶ Also used for 'detection of a specific restriction fragment against a background of many other restriction fragments' (Brown, 1999).



Edward M. Southern
University of Oxford (UK)

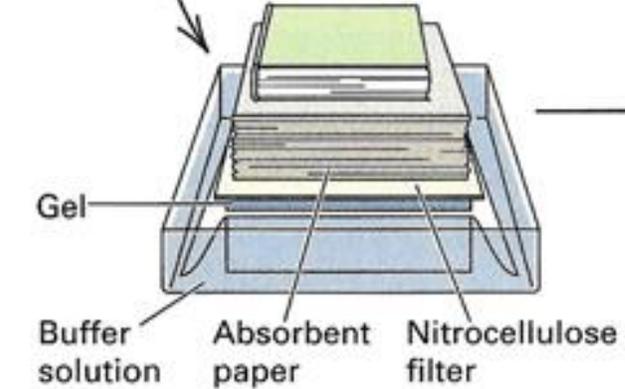
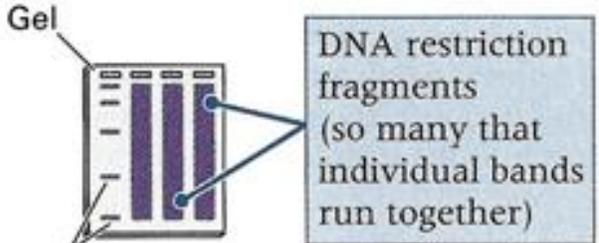
- Gli enzimi di restrizione possono essere utilizzati anche per **distinguere alleli diversi** di uno stesso gene (non definibili come mutazioni): per analizzare i cambiamenti di una singola base nel DNA, ossia un polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP). **Ciò è possibile solo se lo SNP modifica il sito di restrizione presente nella allele.** Con questa strategia, l'enzima di restrizione può essere utilizzato per analizzare il genotipo in un campione di DNA, al posto del sequenziamento genico, che sarebbe peraltro molto più costoso. RE sono quindi utilizzati per il **DNA fingerprinting**, come nelle analisi di paternità.

Applicazioni scientifiche: Southern Blot

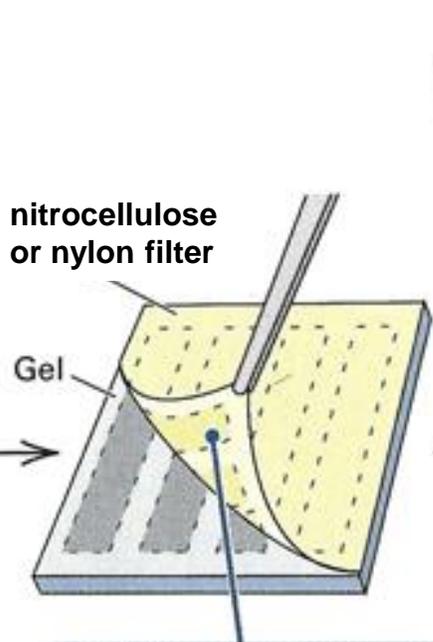


Southern blot

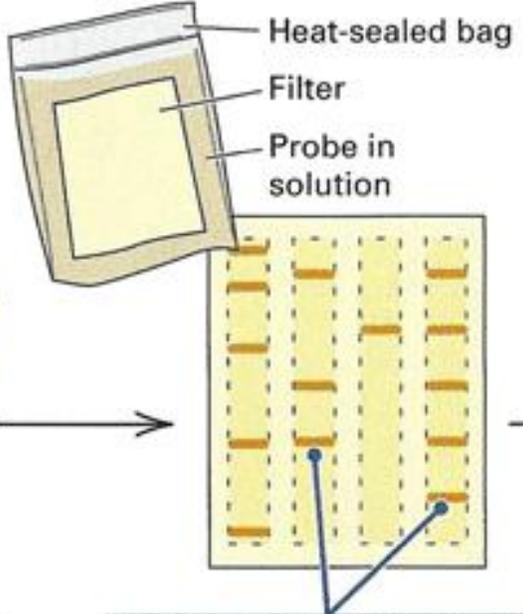
(A) DNA is cleaved; electrophoresis is used to separate DNA



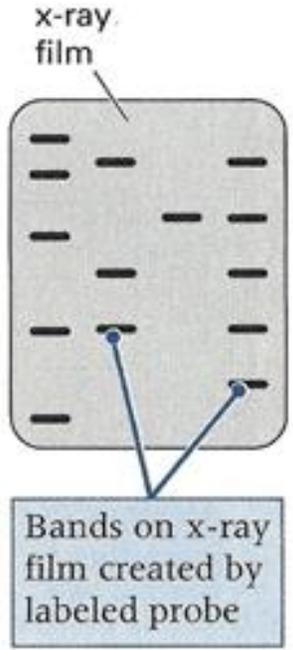
(B) DNA fragments are blotted onto nitrocellulose filter



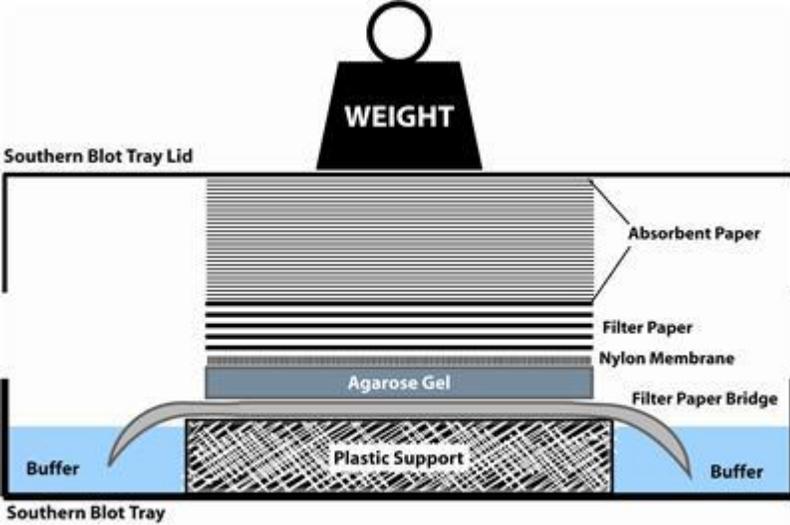
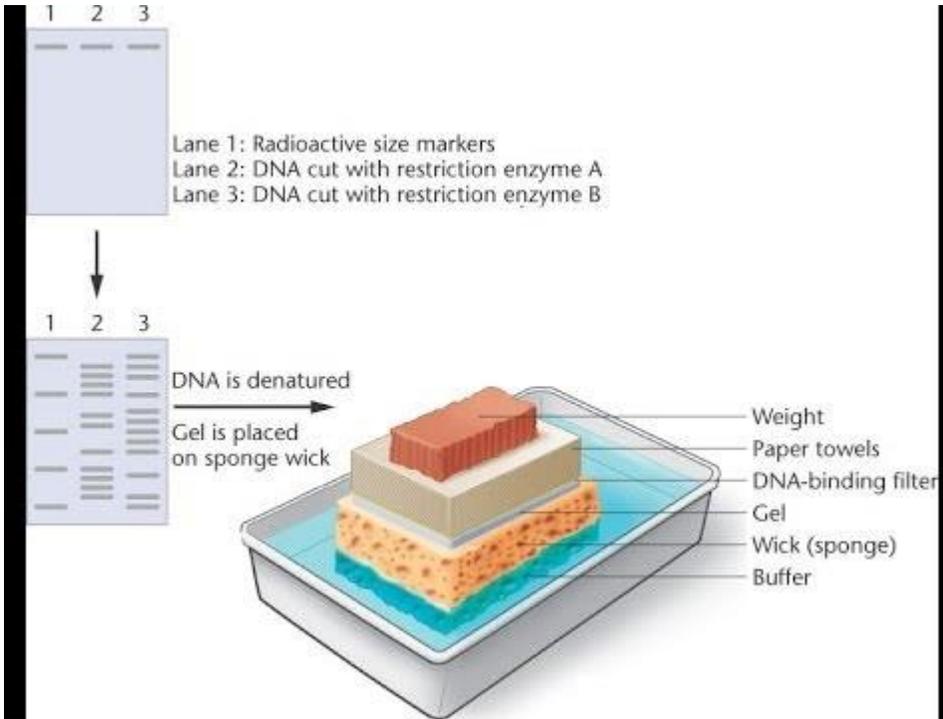
(C) Filter is exposed to radioactive probe



(D) Filter is exposed to photographic film; film is developed

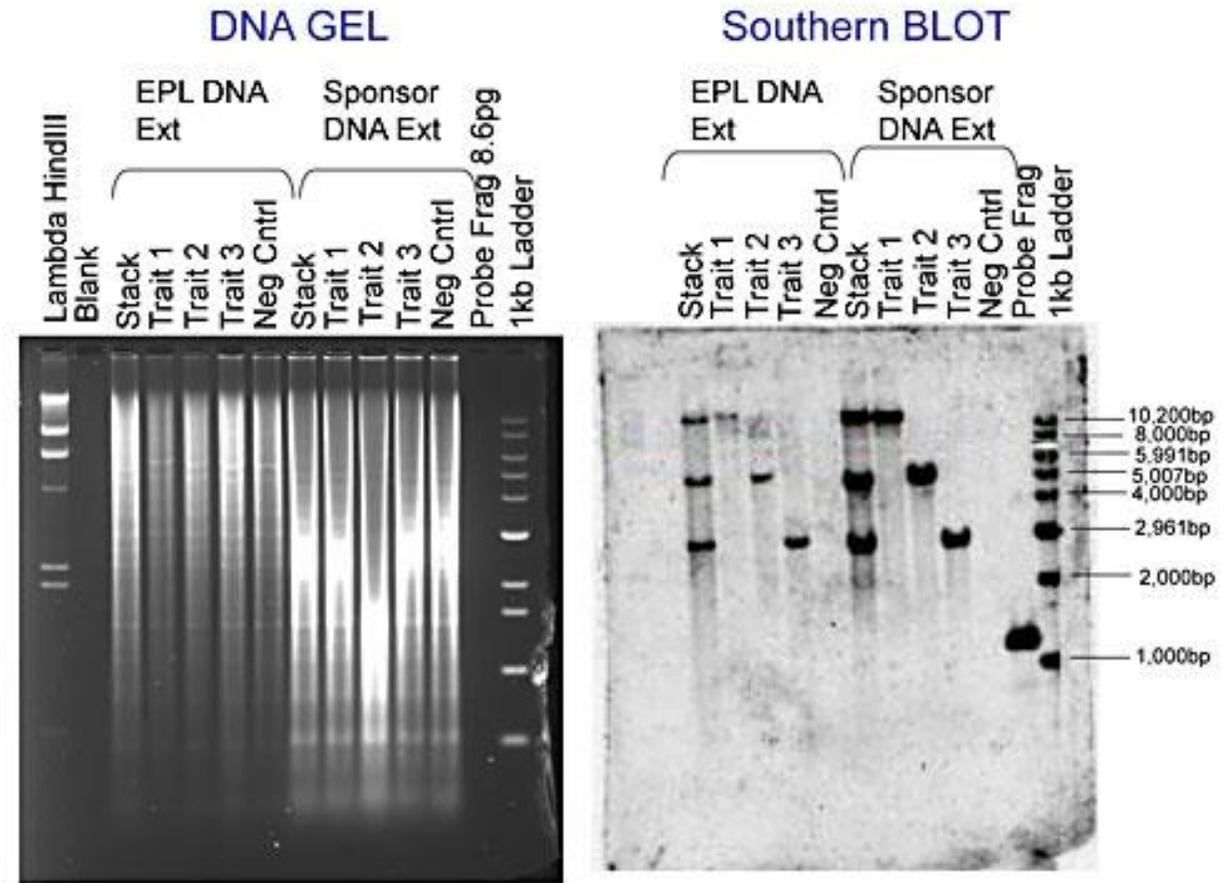


Southern blot



Procedure

1. Estrazione e purificazione del DNA da cellule
2. Digestione del DNA con enzimi di restrizione
3. Separazione dei frammenti di DNA in elettroforesi di agaroso
4. Denaturazione del DNA
5. Trasferimento su membrana (blotting)
6. Ibridazione con una sonda «marcata» specifica per un gene d'interesse
7. Lavaggio della membrana per eliminare la sonda in eccesso
8. Esposizione su lastra autoradiografica



Radio-marcatura di un "probe" da usare per ibridazione molecolare

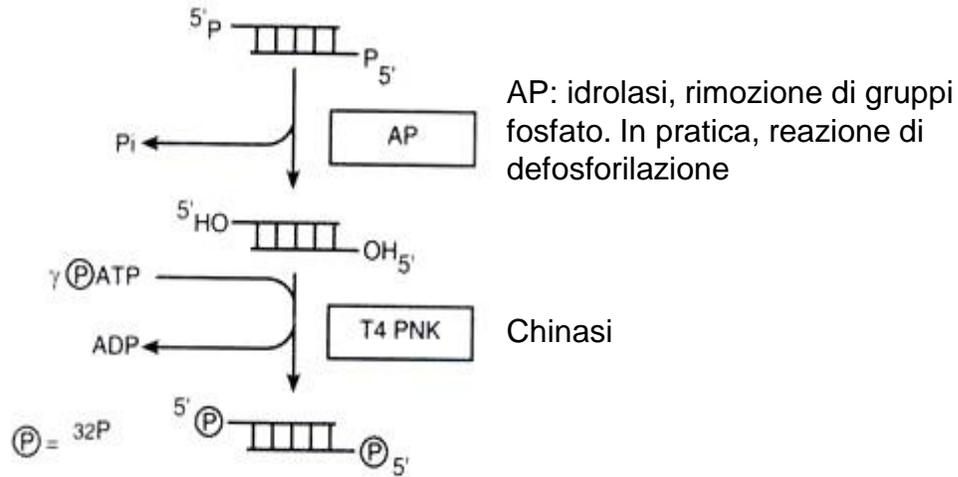


Fig. 3.7: End-labelling of a gene probe at 5'-end with alkaline phosphate and polynucleotide kinase

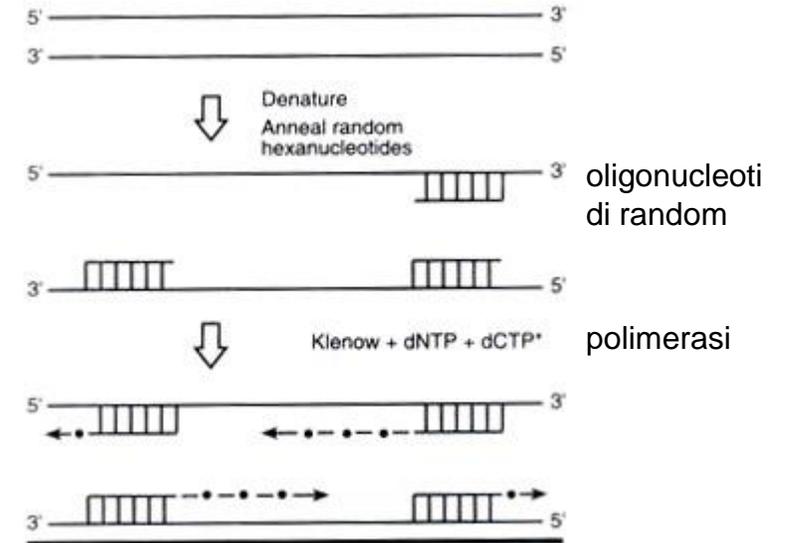
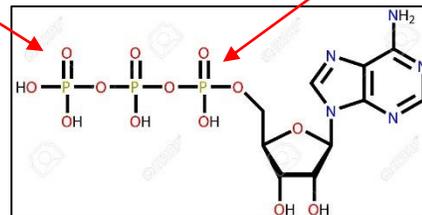
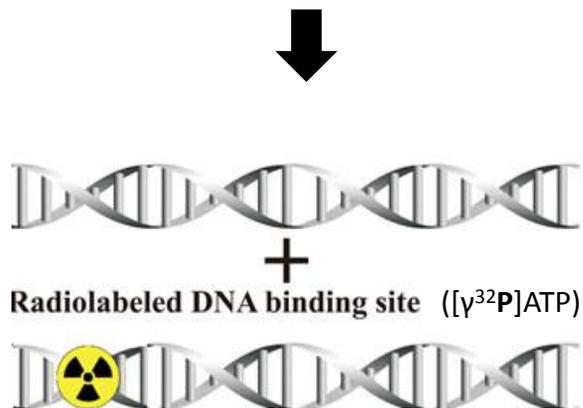
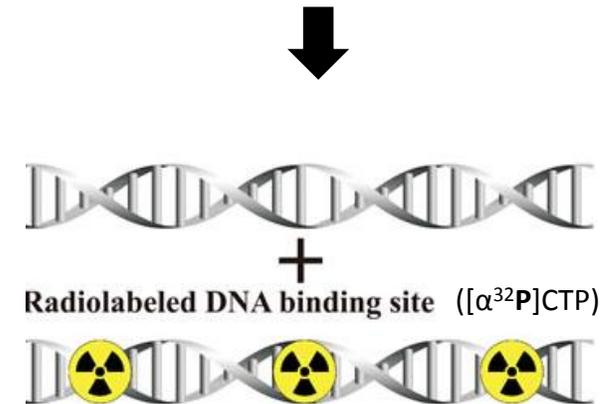


Fig. 3.8: Random primer gene probing





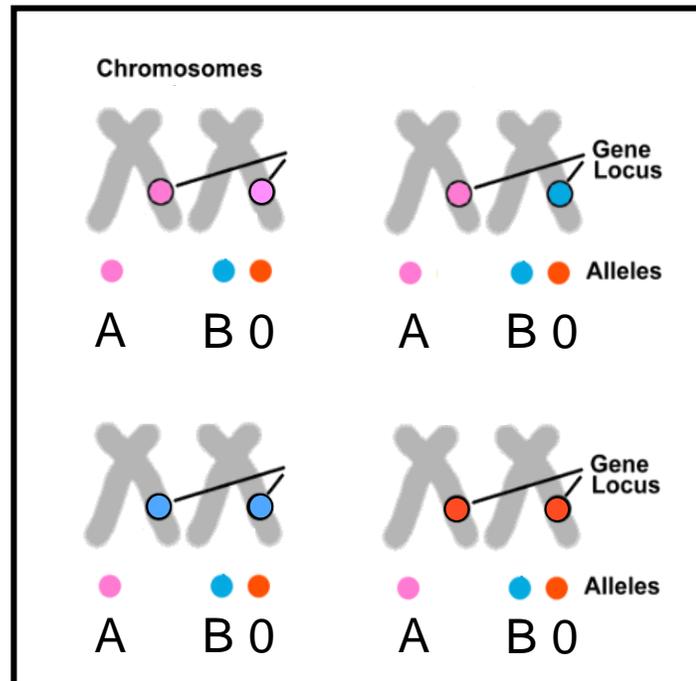
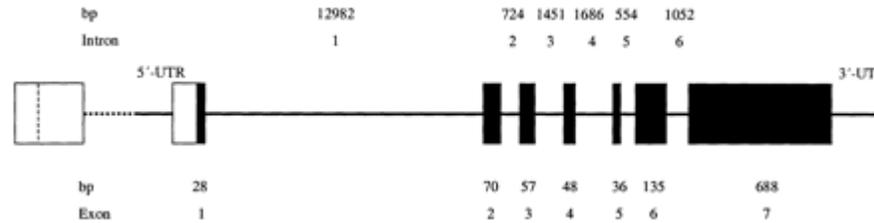
Variabilità genetica

- in generale la diversità genetica (1%) offre alle specie maggiore capacità di adattamento e di sopravvivenza in caso di particolari eventi o cambiamenti ambientali
- la varietà genetica è dovuta principalmente alle mutazioni e ai processi di ricombinazione cromosomica. Le alterazioni che interessano le regioni codificanti del gene portano alla formazione di nuovi alleli (forme alternative di uno stesso gene); che sono trasmesse alle generazioni successive solo quando interessano le cellule della linea germinale (ovociti e spermatozoi)
- attraverso queste alterazioni si ha quella che si definisce **variabilità allelica**
- l'allele: variante di un gene (forme alternative di un gene)
un allele "selvatico" è l'allele più diffuso nella popolazione; in un **organismo diploide**, in cui è presente una coppia di ciascun cromosoma, il genotipo è dunque costituito da **due alleli per un determinato gene**

Variabilità allelica: gruppi del sangue ABO

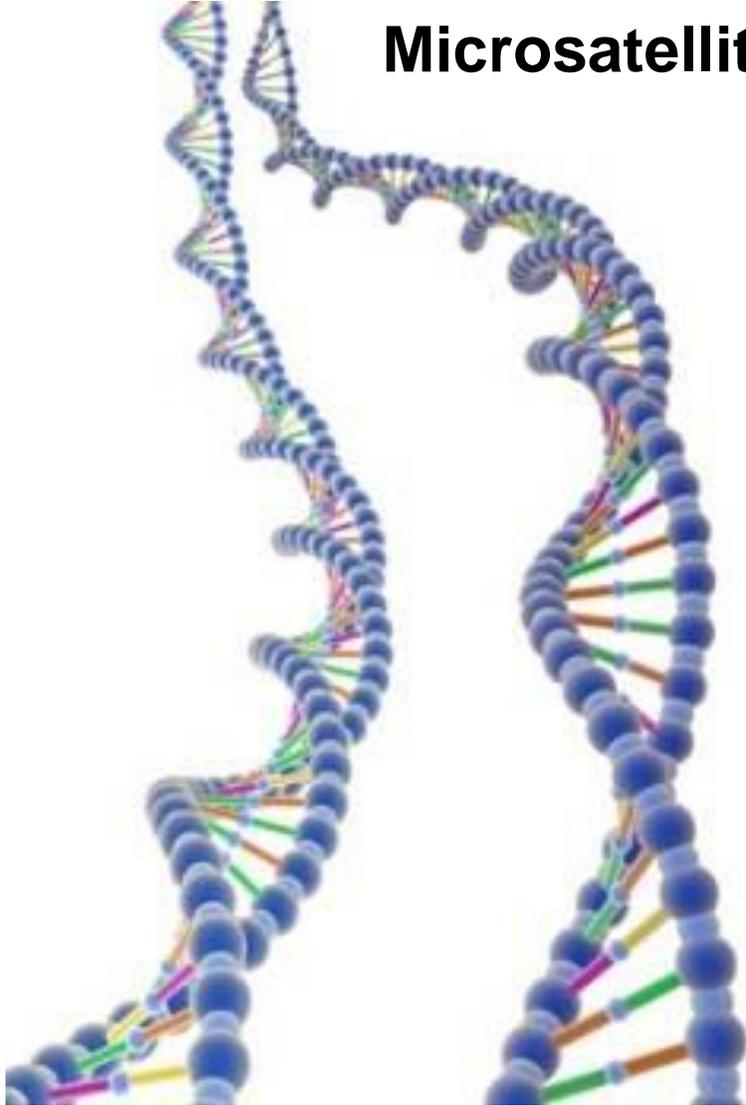
gene sul cromosoma 9

enzima (galattosiltransferasi)



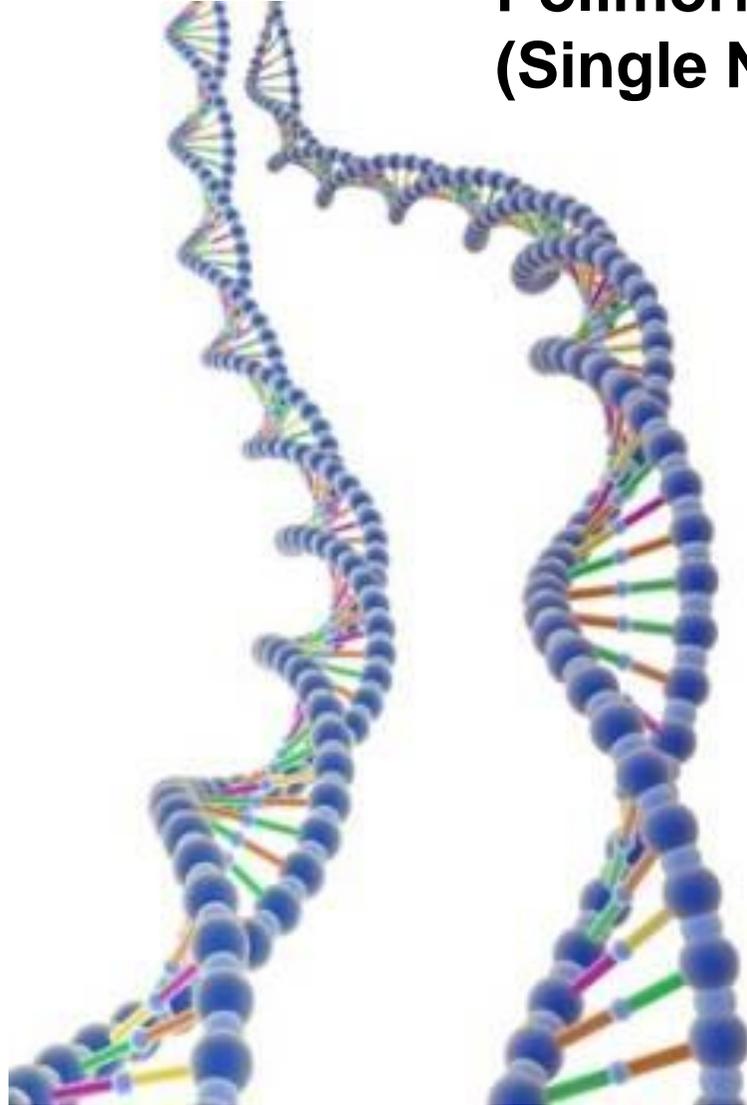
Alleli (genotipo)	gruppo sanguigno (fenotipo)
AA	A
BB	B
AB	AB
OO	O

Microsatelliti o *short tandem repeats* o STR

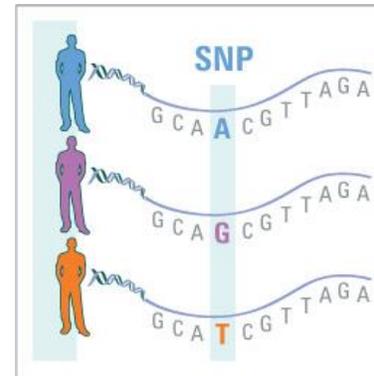


- sequenze ripetute di DNA non codificante costituiti da unità di sequenze molto corte (1-5 bp) disposte secondo una ripetizione in tandem
ATTCGATTCGATTCGATTCG
- presentano un alto livello di polimorfismo e sono marcatori informativi negli studi di genetica di popolazione
- profilo del DNA (DNA profiling o impronta genetica) grazie al quale identificare un individuo.

Polimorfismo a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism o SNP)

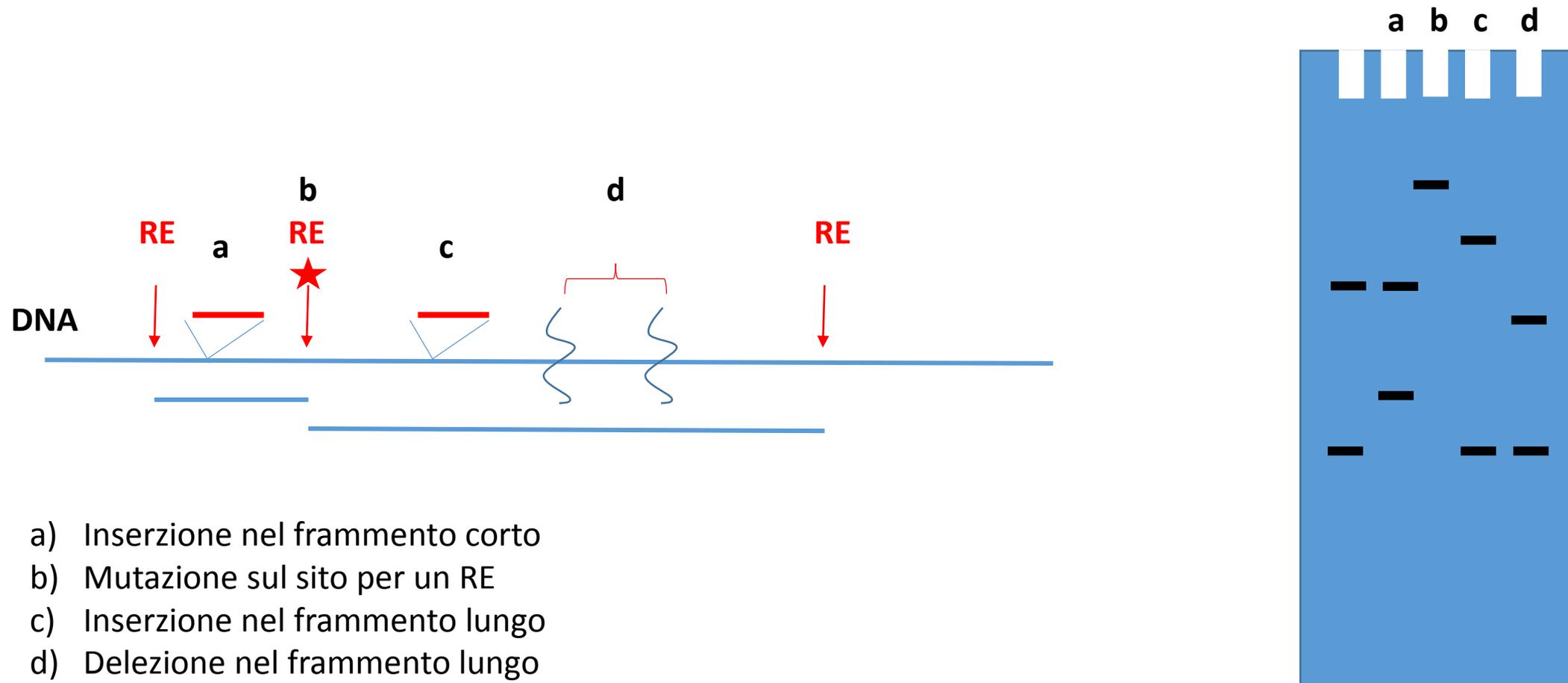


- gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche
- gli SNPs possono presentarsi non solo all'interno di una sequenza codificante, ma anche all'interno di una regione intronica o in una regione intergenica



- variazione di un unico nucleotide presente nella popolazione in una percentuale $>1\%$.
- se la frequenza di uno SNP (variazione genica) è $<1\%$ si parla di mutazione, che produce inoltre una alterazione funzionale del gene
- ci sono circa 10 milioni di SNP noti nel genoma

Analisi della variabilità genetica mediante Southern blotting: *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*



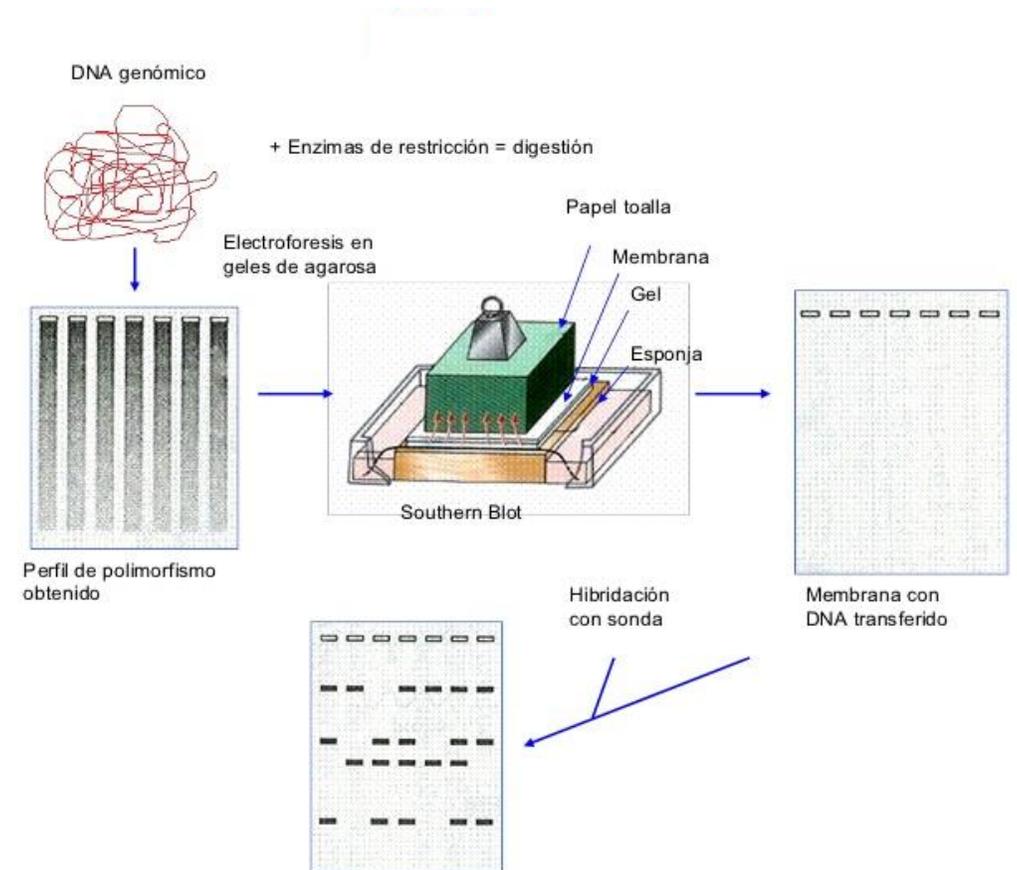
Analisi della variabilità genetica mediante Southern blotting: *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

RFLP è una tecnica che si basa sull'analisi della differenza nella lunghezza di sequenze riguardanti regioni omologhe di DNA, che può essere analizzata dopo la digestione del DNA in questione con specifici enzimi di restrizione.

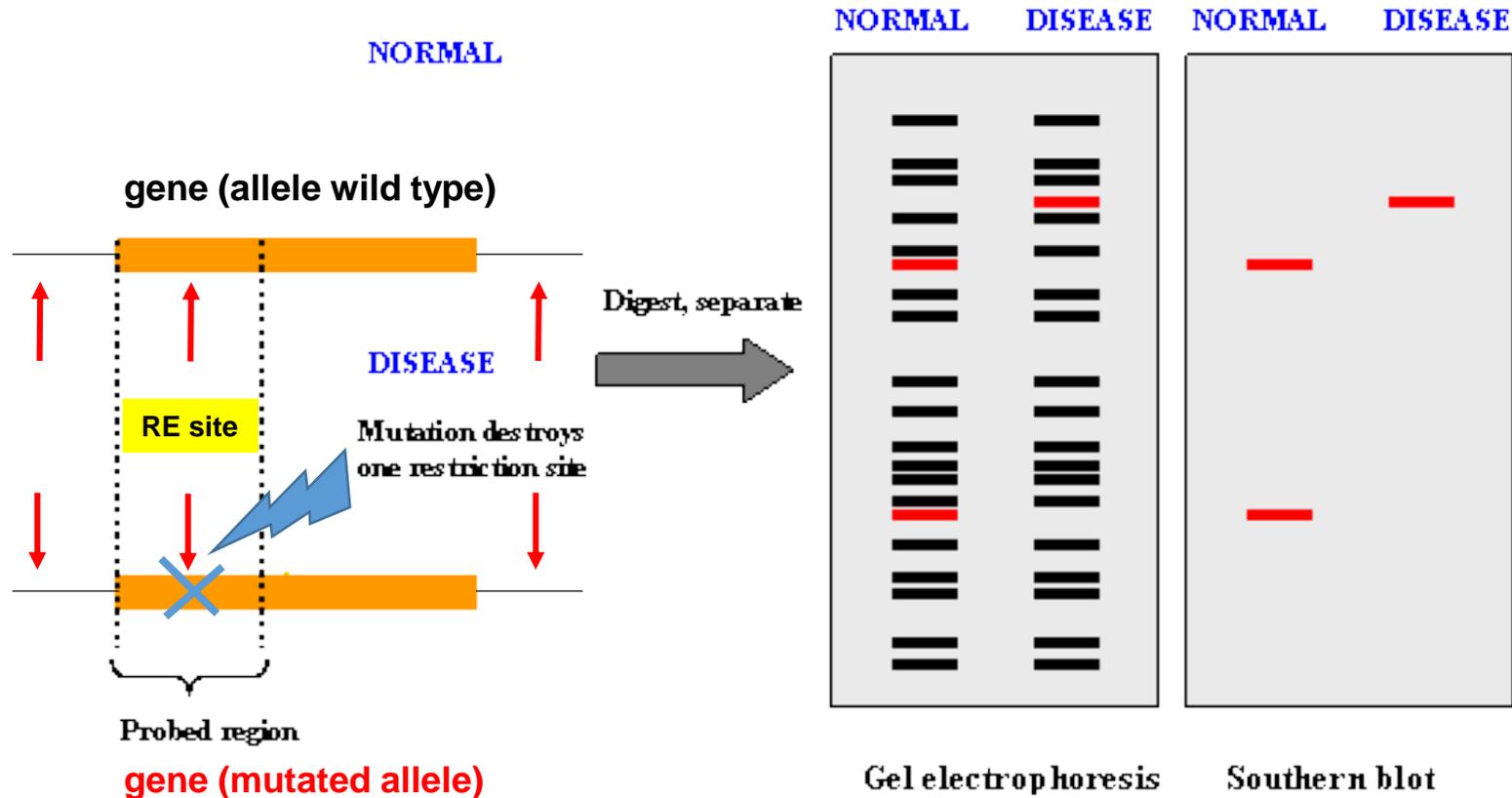
RFLP, rappresenta una sorta di marcatore molecolare: il pattern di bande per ciascun determinato gene è caratteristico quando si usa uno o una combinazione di enzimi restrizione.

I frammento di restrizione per l'analisi della regione polimorfica (RFLP) possono produrre pattern differenti quando nel campione lo stesso gene presenta due alleli differenti per il sito polimorfico, cioè quando lo SNP è in eterozigosi.

Profili RFLP sono utilizzati nella mappatura del genoma e l'analisi di variazioni genetiche (genotipizzazione, analisi forensi, test di paternità, diagnostica di malattie ereditarie, ecc...).



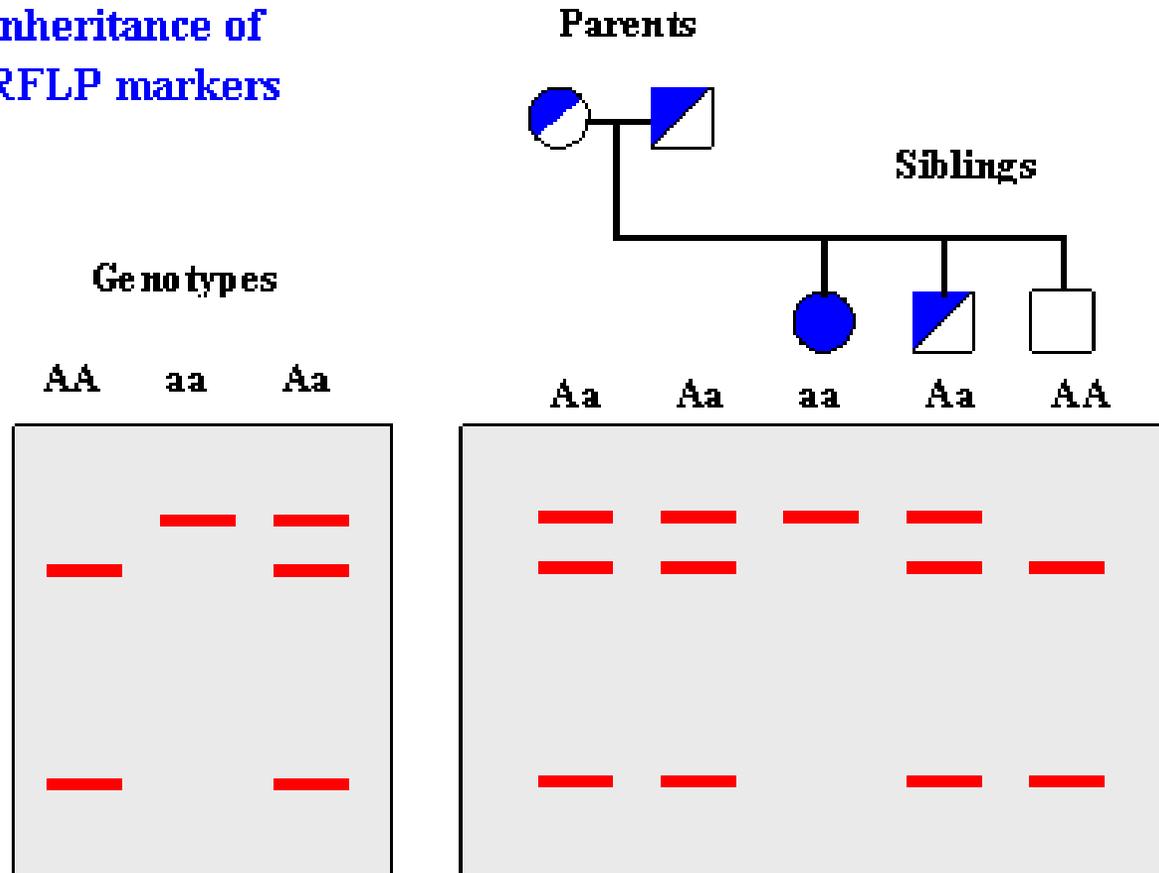
Analisi della variabilità genetica mediante Southern blotting e RFLP: diagnosi di malattie ereditarie



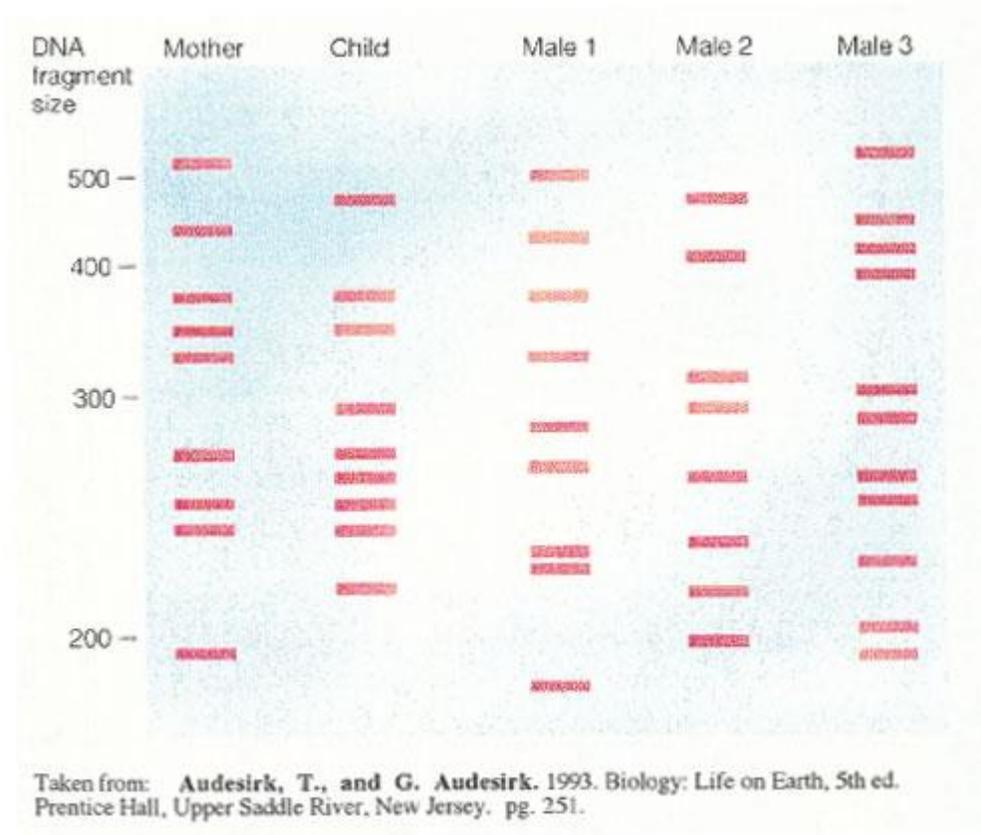
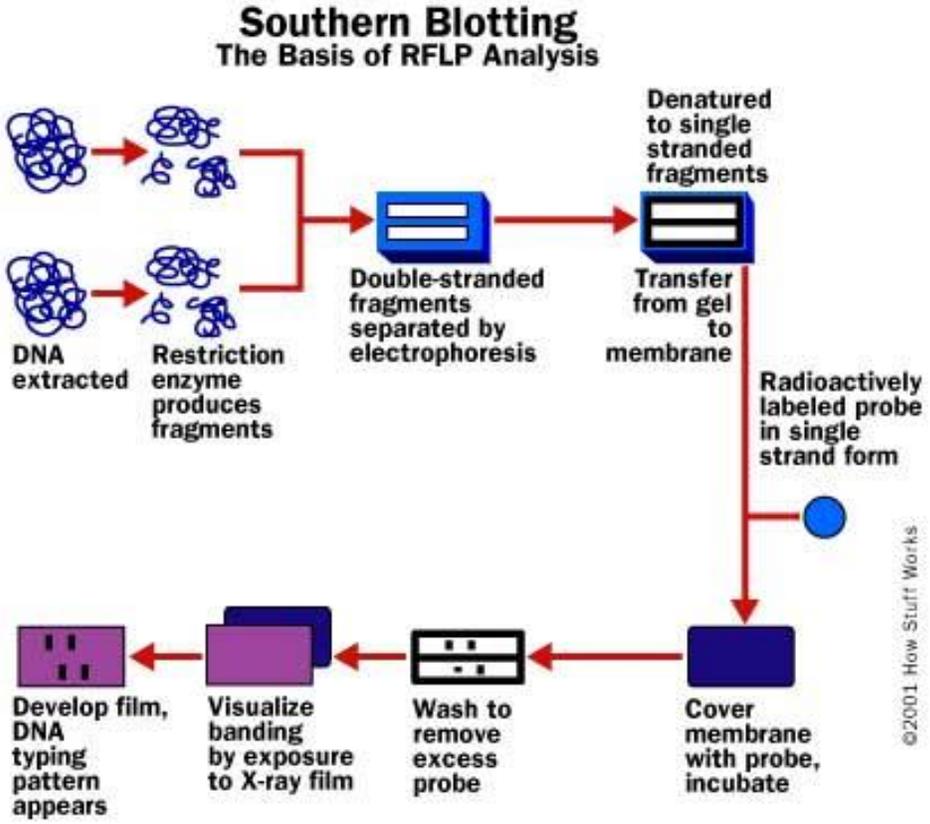
- **Mutazione, delezione, inserzione che interessa in gene responsabile di una patologia e che produce un'alterazione nella lunghezza dei RFLP.**
- **SNP, che però devono essere presenti nel sito di taglio di un RE in un dato gene in analisi**

Analisi della variabilità genetica mediante Southern blotting e RFLP: diagnosi di malattie ereditarie

Inheritance of RFLP markers



Uso di Enzimi di Restrizione e Southern blotting per DNA fingerprinting



Polymerase Chain Reaction (PCR)

Motivazione del Premio: "per i contributi fondamentali alla creazione di oligonucleotide e lo sviluppo della mutagenesi sito-diretta per gli studi di proteine"

* In una famosa intervista si domandò provocatoriamente se avrebbe mai scoperto la PCR se non avesse assunto LSD, concludendo che poteva letteralmente veder lavorare i singoli polimeri e ammettendo di avere imparato parecchio grazie a tale esperienza.

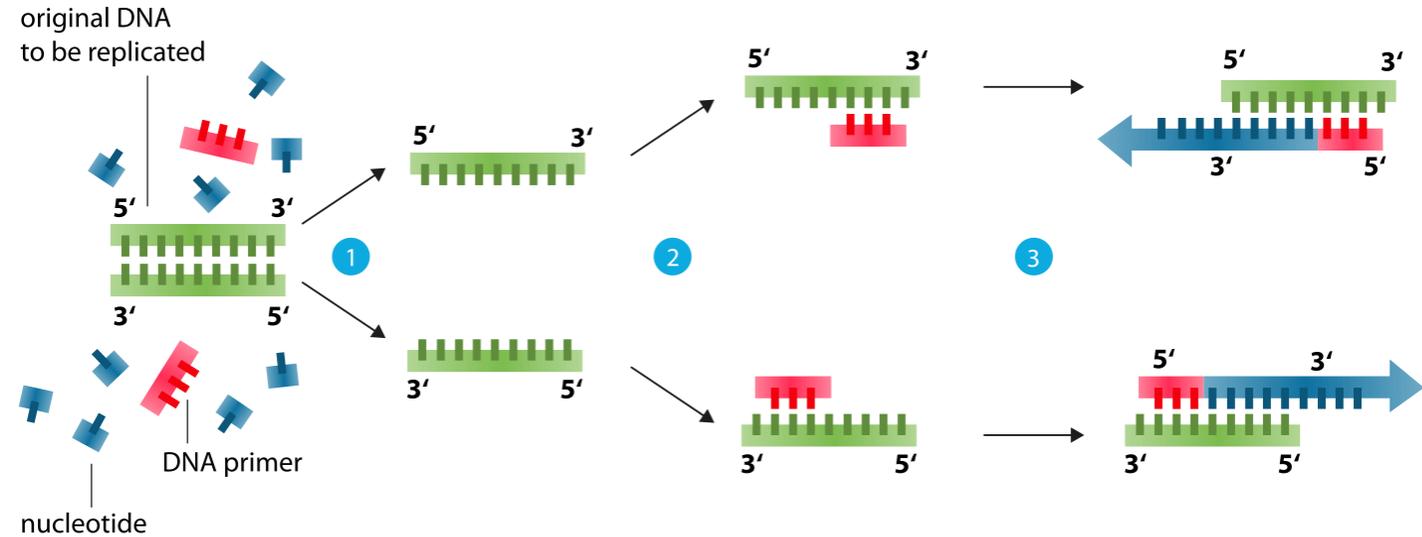
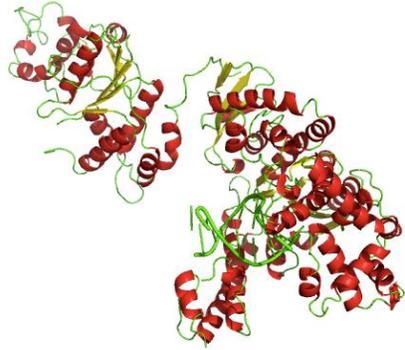


Kary Banks Mullis è stato vincitore del Premio Nobel per la Chimica nel **1993** assieme a **Michael Smith**. Mullis ha ricevuto il premio Nobel per lo sviluppo della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR), un processo già descritto da Kjell Kleppe e da Har Gobind Khorana (Nobel nel 1968). La tecnica consente l'amplificazione *in vitro* di frammenti di DNA. I miglioramenti apportati da Mullis hanno reso la PCR una tecnica fondamentale in biochimica e biologia molecolare, con innumerevoli applicazioni in campo medico, agricolo, e investigativo.

K. Mullis 1998. «Ballando nudi nel campo della mente. Le idee (e le avventure) del più eccentrico tra gli scienziati moderni

Polymerase Chain Reaction

Taq polymerase is a thermostable DNA polymerase named after the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* from which it was originally isolated by Thomas D. Brock in 1965



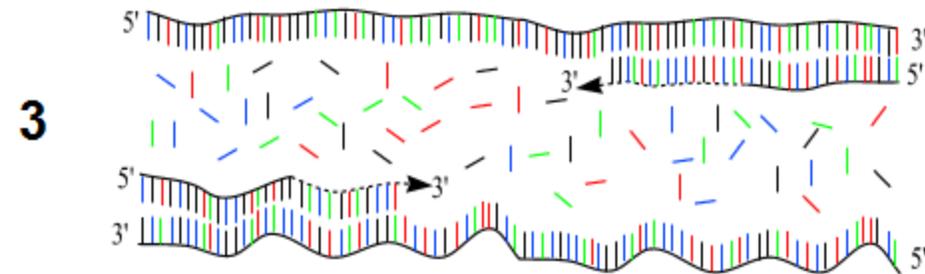
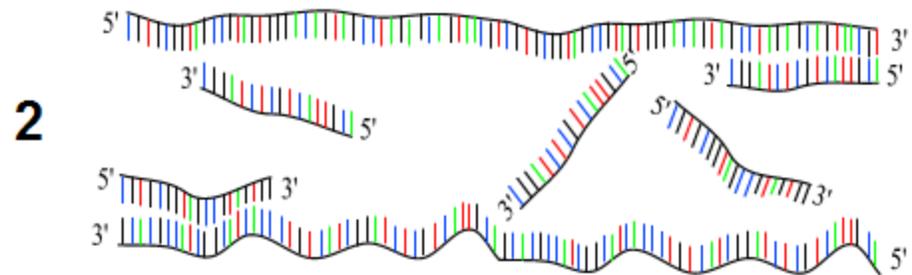
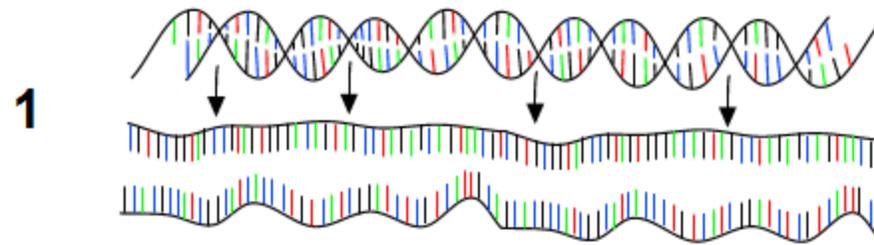
- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

- ❑ **Amplificazione *in vitro* di una sequenza di DNA *target* (bersaglio)**
- ❑ **Amplificazione selettiva, definita dalla sequenza dei *primers* disegnati e impiegati**

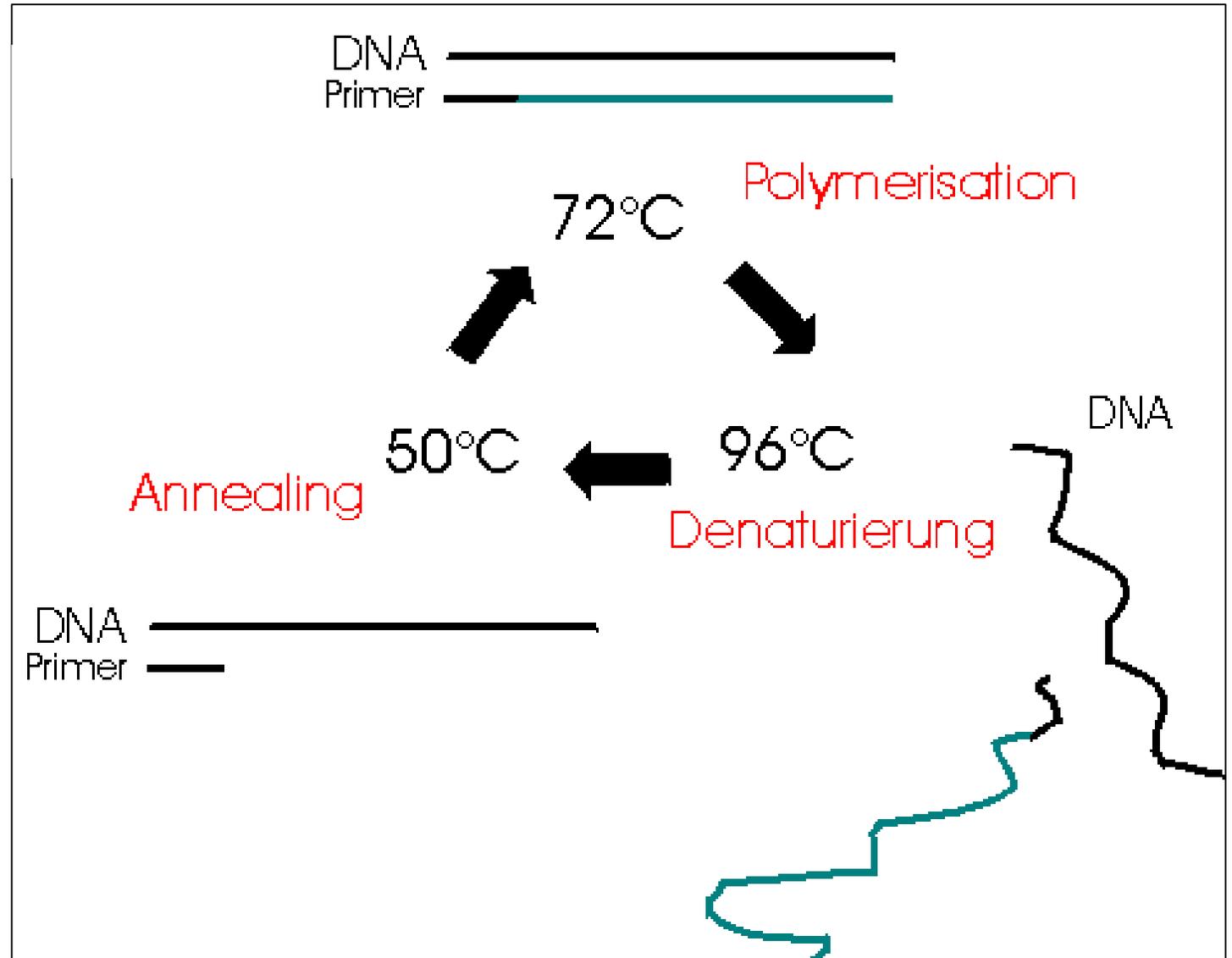
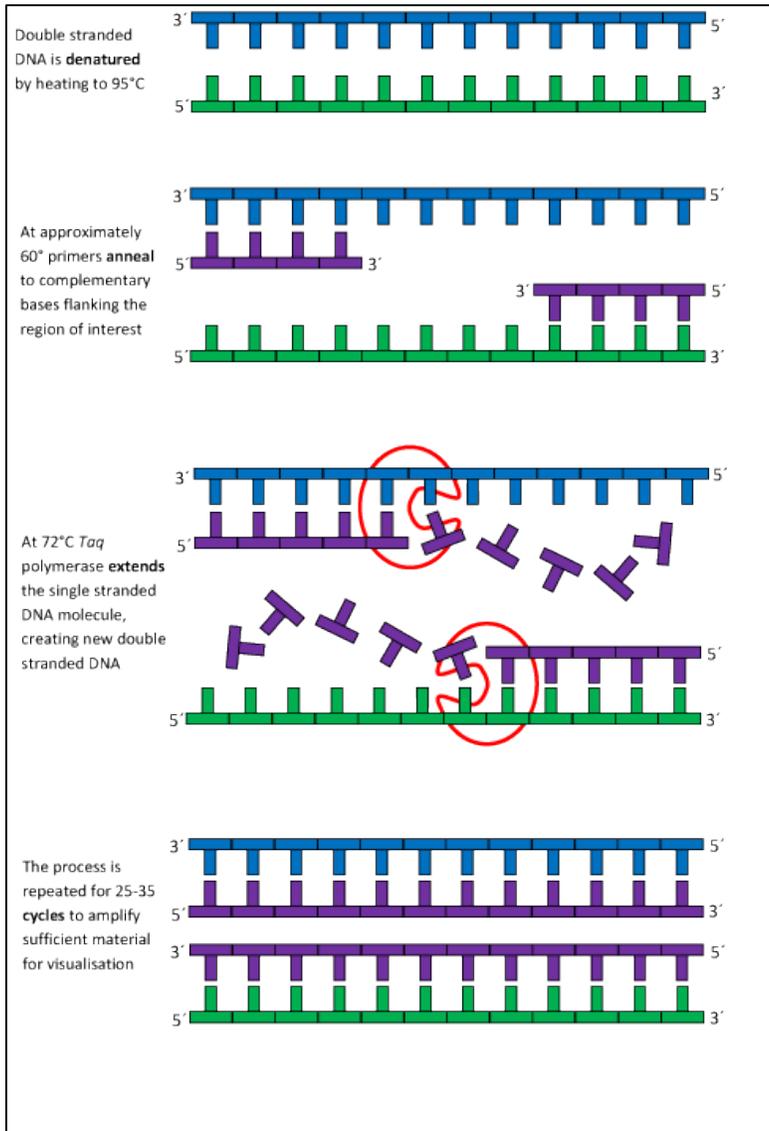
Title: The polymerase chain reaction.

Editors: Mullis, K. B.; Ferré, F.; Gibbs, R. A. Book, The polymerase chain reaction. 1994

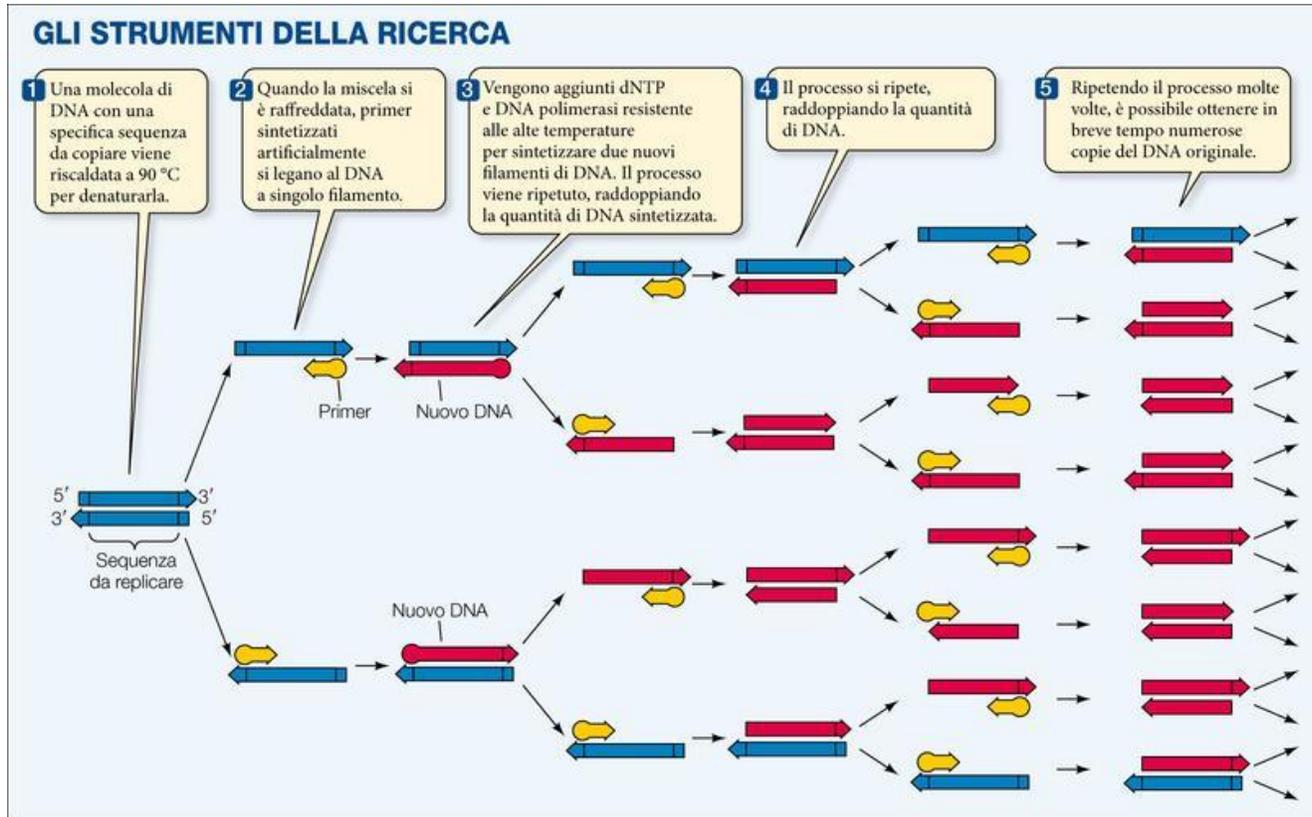
Polymerase Chain Reaction



Polymerase Chain Reaction



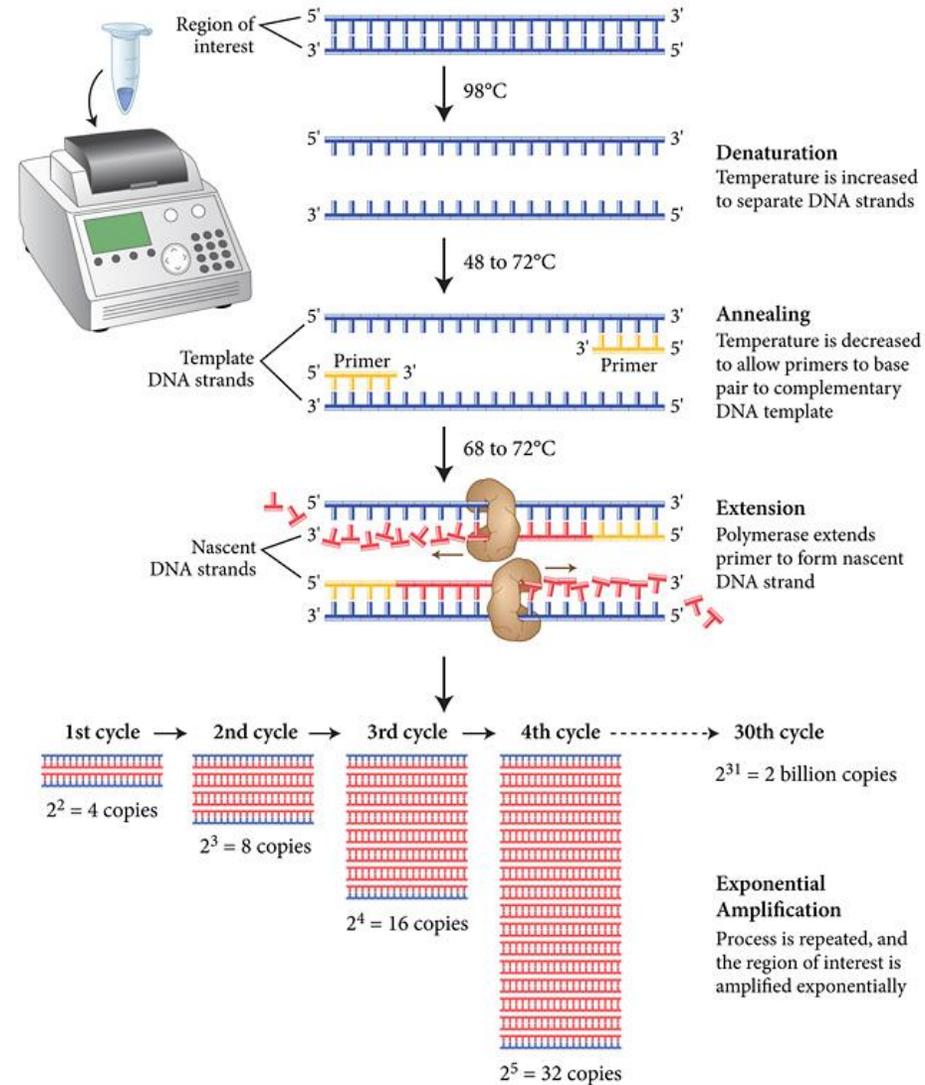
Polymerase Chain Reaction



Exponential amplification

$$2^{36} = 68 \text{ billion copies}$$

Polymerase Chain Reaction



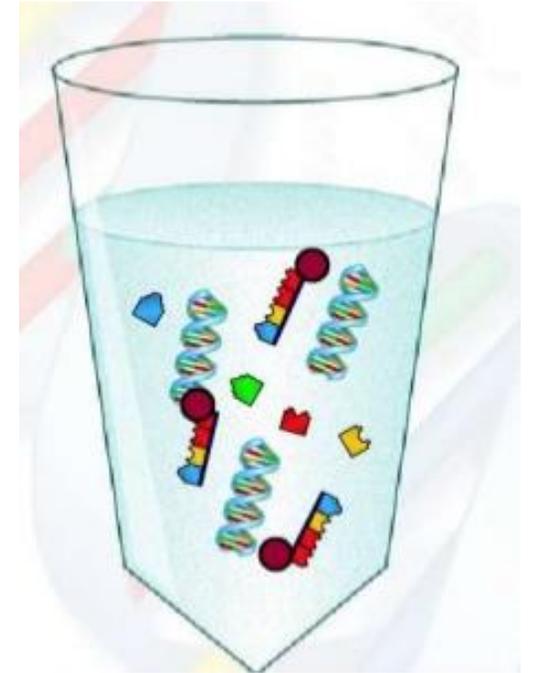
Polymerase Chain Reaction

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

Polymerase Chain Reaction

Component of the reaction mixture:

- **Template DNA**, previously isolated and purified (0,1-1 ng plasmid DNA, o 50 ng DNA genómico)
- **Primers** (forward and reverse), to flank the **target sequence** (0,1-0,6 μM)
- **4 deoxynucleotides triphosphate**, for the synthesis (50-500 μM each dNTP, usually 200 μM for each)
- **Taq DNA Polymerase**, 0,5-2,5 units/50 μl
- **Buffer solution**, to maintain pH and ionic strength suitable for the activity of the enzyme (generally, pH=8.3-9.0)
- **Divalent cations** (MgCl_2), cofactor of the enzyme, approximately 1-1,5 mM
- **Sterile deionized water**



Typical PCR mix

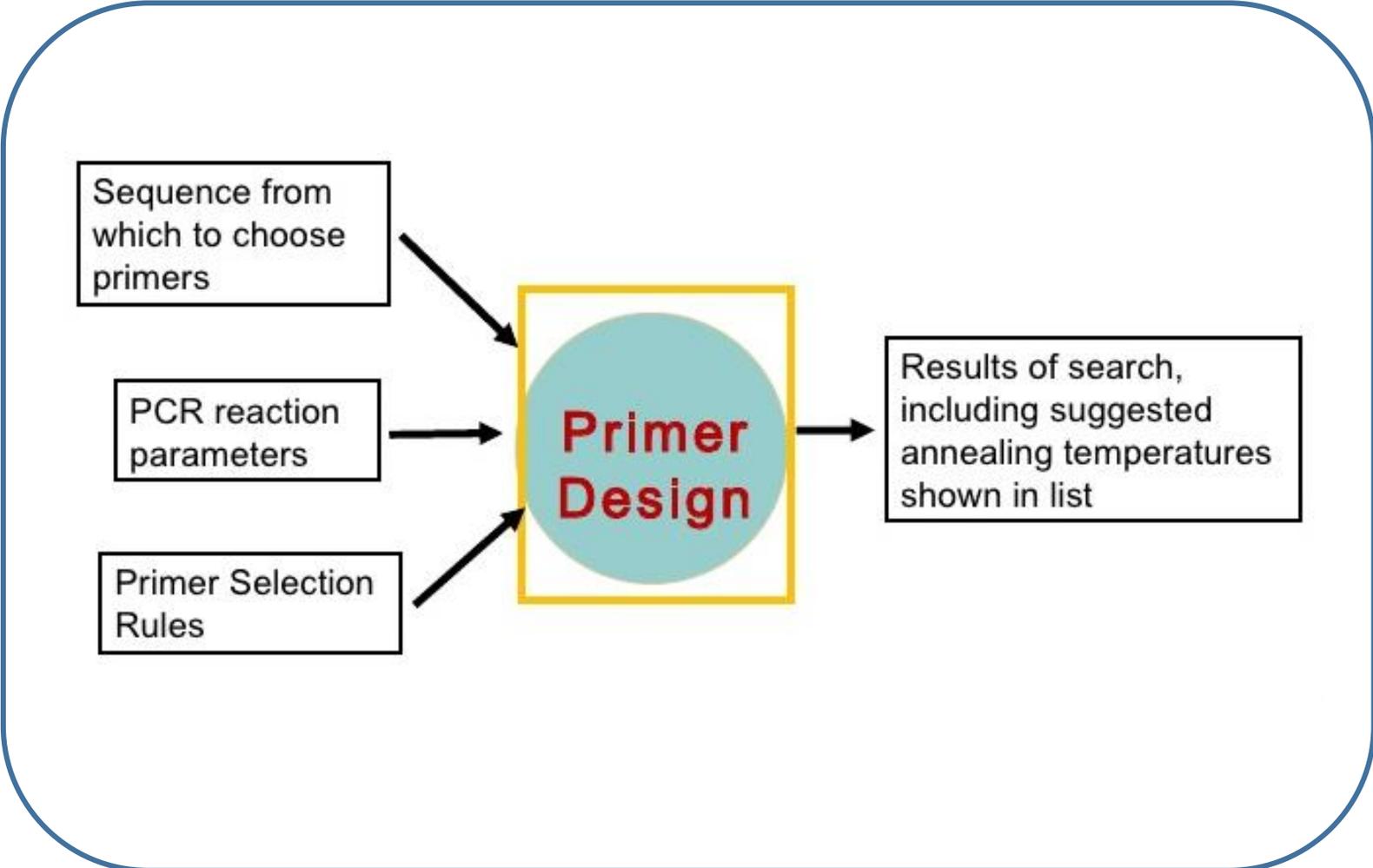
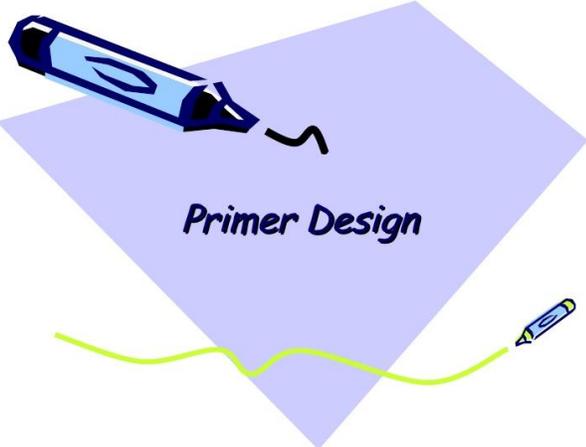
Reagent	Volume	Final concentration
PCR buffer 10x (no Mg)	2.5 μ l	---
Primer sense	1 μ l	100 pmol./ μ l
Primer antisense	1 μ l	100 pmol./ μ l
dNTPs (10 mM each)	1 μ l	0.2 mM
DNA	1 μ l	1-5 ng/ μ l
Taq DNA pol	0.5 μ l	2 U
MgCl ₂	1.25 μ l	1.25 Mm
Water	16.75 μ l	---

Typical PCR mix

Reagent	Final Conc.	Vol. (μl) for 10 μl reaction
DDW(distilled deionized water)	NA	5.36
10 X PCR buffer	1 X	1
MgCl ₂ (25mM)	2.5 mM	0.4
dNTP (10 mM)	200 μ M each	0.2
Primer mix (2 μ M) each)	0.2 μ M each	1
Hotstar Taq® (5U/ μ l)	0.025 U/ μ l	0.04
Genomic DNA® (10 ng/ μ l)	2 ng/ μ l	2
Total vol		10



Primers design criteria



Primers design criteria

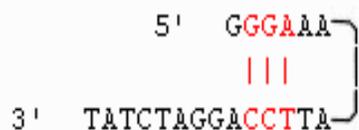
- **Length of amplified region**, lack of secondary priming sites in the template
- **Primer uniqueness**, is ensuring that the likelihood of annealing to sequences other than the chosen target is very low. This can occur if the same sequence is present in the template DNA more than once, or when a primer is poorly designed
- **Primer length**, usually a 20-24 nt primer works well
- **Melting temperature (T_m)**, between 55-65°C, formula= $[2^{\circ}\text{C}*(\text{A}+\text{T})+4^{\circ}\text{C}*(\text{G}+\text{C})]$
- **GC content range**, G+C 45-55%
- **3'-clamp properties (terminal residue, CG-content)**, low specific binding at the 3' end, to avoid mispriming
- **Absence of significant hairpin formation in primers**, 3' end dimer with $\Delta\text{G} = -2$ kcal/mol or an internal dimer with $\Delta\text{G} = -3$ kcal/mol
- **Absence of dimerization capability in primers**, 3' end dimer with $\Delta\text{G} = -5$ kcal/mol or an internal dimer with $\Delta\text{G} = -6$ kcal/mol
- **Avoid primer-primer interaction**
- **Melting temperature compatibility**, remember that you are dealing with TWO primers in PCR. Their T_m's should be within 5°C of each other; the closer the better!

Amplicon Length	50 - 210 bp
Primer Length	19 - 23 nucleotides
GC Content	35 - 65%
T _m	60 - 68 °C
3'-End Stability	Composition of last 3 base pairs
Complementaries	Avoid primer self- or cross- annealing stretches > 4 bp
Specificity	BLAST versus entire mRNA RefSeq database
SNP Database	Primer sequences do not include known SNP

Primers design criteria

Hairpin

Oligo, 3 bp (Loop=4), $\Delta G = -0.1$ kcal/mol



Oligo, 2 bp (Loop=3), $\Delta G = 2.1$ kcal/mol



Self-Dimer

4 bp, $\Delta G = -6.6$ kcal/mol (bad!) (worst= -36.6)



4 bp, $\Delta G = -5.4$ kcal/mol (bad!) (worst= -36.6)



Use of software

Note that T_m is calculated at 50 mM salt, which is standard for PCR. The Oligo program can also show a table that adjusts for differences in salt

However, often the “standard” parameters used by such programs don’t work with a given sequence. In such a case, primers need to be picked manually

The screenshot shows the PerlPrimer v1.1.3a software interface. The window title is "PerlPrimer v1.1.3a - N:\Owen_M\perlprimer\tigd4_cloning_final.ii.ppr". The interface includes a menu bar (File, Tools, Help) and a toolbar with icons for file operations. The main area is divided into several sections:

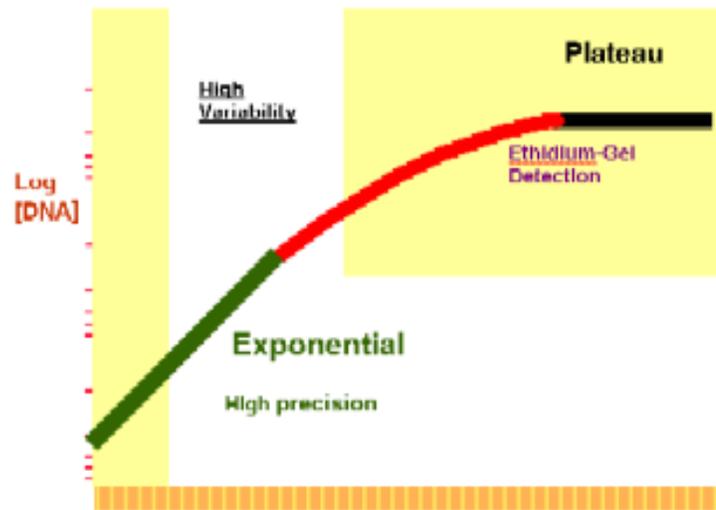
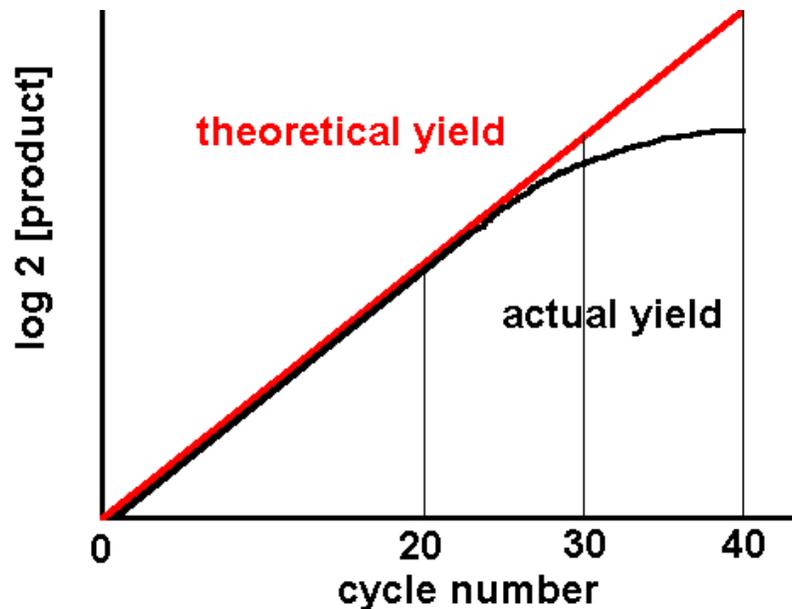
- Standard PCR** (selected):
 - Primer T_m : 57 - 63 °C, Difference 2 °C
 - Primer Length: 20 - 24 bases
 - Amplified range: 5' 210 - 270, 3' 1748 - 1808
 - Amplicon size: 1478 - 1598 bases
 - Options: Exclude %GC, GC clamp
 - Add 5' F seq: ggcggc_gaaltc, Frame 2
 - Add 5' R seq: ggcggc_gtcgac, Frame 1
- Sequence**: A text area containing a DNA sequence with a vertical scrollbar on the right.
- Results**: A table showing primer suggestions.
- Sequence visualization**: A horizontal bar representing the sequence with a red arrow indicating the primer binding site.
- Buttons**: Find primers, Find inwards, Find outwards, Cancel, Copy selected.

The status bar at the bottom indicates: "N:/Owen_M/perlprimer/tigd4_cloning_final.ii.ppr saved successfully".

Forward Primer	Pos	Len	T_m	Reverse Primer	Pos
ATAAGCACTGGCTGAGATGG	254	20	62.03	CCGTCATTCATATCTTGACTTCTG	1750
ATAAGCACTGGCTGAGATGG	254	20	62.03	GAAGTCCGTCATTCATATCTTGAC	1755
TGAGATGGCAGAAAGCTTCTG	266	20	62.23	GAAGTCCGTCATTCATATCTTGAC	1755
TGAGATGGCAGAAAGCTTCTG	266	20	62.23	CCGTCATTCATATCTTGACTTCTG	1750
AGATGGCAGAAAGCTTCTGTG	268	20	62.52	CCGTCATTCATATCTTGACTTCTG	1750
AGATGGCAGAAAGCTTCTGTG	268	20	62.52	GAAGTCCGTCATTCATATCTTGAC	1755

Optimisation cycle number: time and temperature

- 25-40 cycles
- Half-life of TaqDNA polymerase is 30 min at 95°C, so if you use 1 min at 95°C for 30 cycles taq will not be efficient after this point
- Theoretical yield= 2^n , \log_2 (product), approaches exponential for first 20 cycles



1. ↓ dNTP & ↓ primers
2. Instability of dNTPs and *Taq* polymerase
3. End-product inhibition
4. Competitive reaction of non-specific product or primer-dimer

Polymerase Chain Reaction (PCR)

https://www.youtube.com/watch?v=vi7MeqD2_FY

Primers design criteria

https://www.youtube.com/watch?v=c-f1H07D_70