

# Tecniche di biologia molecolare

## Obiettivi dello studio:

conoscere i principi base delle tecnologie e le possibili applicazioni

Cdl Tecnici di Lab. Biomedico  
Aa. 2011-12 Prof.ssa Flavia Frabetti

## **Caratteristiche di una metodica**

**Sensibilità:** capacità di non dare falsi negativi

**Specificità:** capacità di non dare falsi positivi

**Sicurezza:** non devono, se possibile, essere usati composti dannosi o tossici. La tossicità può essere fisica, chimica o biologica

**Economia**

**Velocità:** in termini di lavoro uomo/ora

**Facilità**

# **Estrazione acidi nucleici**

**per “estrazione” si intende isolamento, separazione  
di DNA o RNA da un tessuto o da cellule.**

**Si possono estrarre acidi nucleici totali o isolati.**

E' possibile isolare gli Acidi Nucleici a partire da **vari materiali di partenza:**

- Organo intero, tessuto, colture cellulari, sangue, ecc

**Tipo** di acido nucleico:

- ss DNA, ds DNA, RNA totale, mRNA rRNA, tRNA

**Risultato desiderato:**

quantità, purezza, tempo richiesto.

**Applicazione:**

- Digestione con ER (enzimi di restrizione)
- Clonaggio o amplificazione
- Marcatura
- Ibridazione



# FASI estrazione

## Lisi cellulare-caratteristiche:

**abbastanza AGGRESSIVA** da frammentare il materiale di partenza

**abbastanza DELICATA** da mantenere l'integrità dell'acido nucleico

Si realizza in base a:

- distruzione meccanica
- distruzione chimica
- distruzione enzimatica



## Lisi cellulare-reagenti usati:

- sonicatore o omogenizzatore a pestello, congelamento/scongelo, shock osmotico
- **detergenti** (es. SDS o sodio dodecil solfato, Tween 20)
- **agenti caotropici** (NaI ioduro di sodio o GuSCN guanidiotiocianato o NaSCN sodio tiocianato)
- **enzimi** (proteinasasi K)



**Omogenizzatore**  
azione meccanica



**Sonicator**  
genera onde acustiche  
ad elevata frequenza

L'omogenato cellulare viene **CENTRIFUGATO** per separare il *pellet* che comprende membrane e frammenti cellulari (*voilà filtrazione*).

**Poi si può procedere a selezionare gli acidi nucleici in 2 modi:**

**1- Selezione negativa:**

**si toglie tutto ciò che NON è DNA**

**2- Selezione positiva:**

**si estrae direttamente DNA.**

**Più potente, ma dà meno resa**

## DEPROTEINIZZAZIONE:

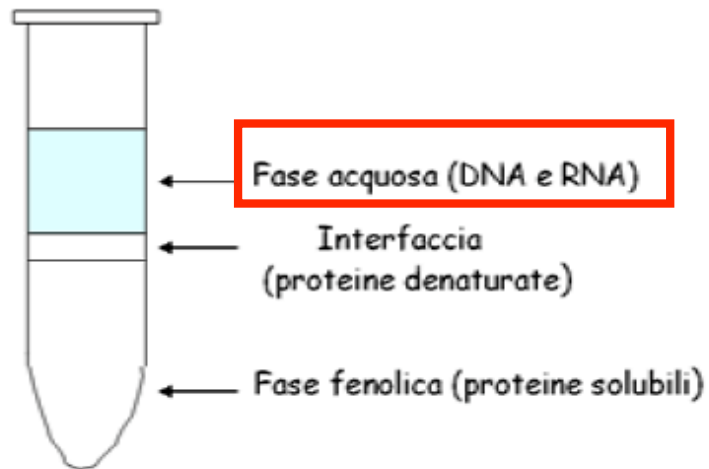
il metodo tradizionale (1) prevede due passaggi in solventi apolari che denaturano le proteine ed allontanano anche i lipidi

**fenolo/cloroformio/alcool isoamilico**  
**cloroformio/alcool isoamilico**

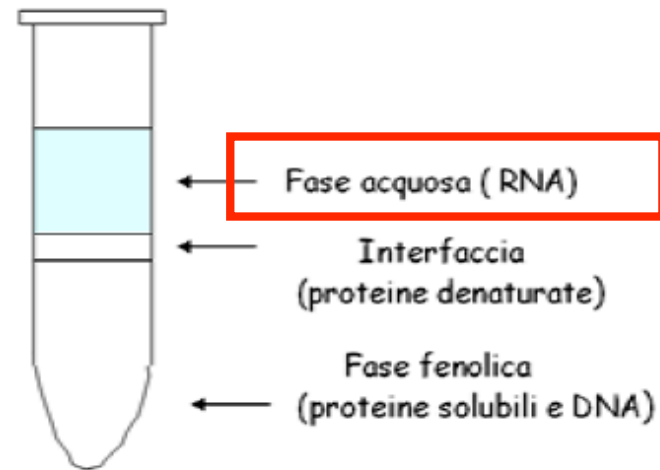
pH neutro o alcalino del fenolo per DNA

pH acido per l'RNA

**pH neutro o alcalino**



**pH acido**





## PRECIPITAZIONE in ETANOLO:

gli acidi nucleici precipitano in presenza di **etanolo** (**solvente moderatamente apolare (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-)**, tale da far precipitare il DNA che è completamente solubile in acqua). L'alcool etilico determina modificazioni strutturali degli Acidi Nucleici che ne inducono l'aggregazione e quindi la precipitazione.

Per facilitare la precipitazione si possono aggiungere CATIONI monovalenti. Essa si esegue a -80 °C.



### **Lavaggio del *pellet***

Dopo centrifugazione, i pellet di DNA vanno lavati in **etanolo 70%** e ricentrifugati. Tale lavaggio allontana i sali, insolubili in tale solvente.

### **Risospensione del DNA**

Il DNA viene risospeso in un tampone a bassa forza ionica, in genere **TE (Tris-EDTA)** a pH 7.6 - 8.0.

L'acido nucleico può quindi essere dosato ed essere utilizzato per ulteriori procedure quali digestione con endonucleasi di restrizione, marcatura, PCR ecc.

In alternativa ai classici metodi di purificazione degli acidi nucleici esistono in commercio numerosi *kit di isolamento e purificazione* diretta e dunque secondo una selezione positiva degli Acidi Nucleici che rappresentano una alternativa sempre più utilizzata.

Essi garantiscono **facilità d'uso** riproducibilità ed **elevato livello di purificazione**.

Si basano essenzialmente sull'utilizzo di:

- Kit per estrazione in soluzione (es. TRI Reagent® Sigma)
- Resine a scambio ionico (scambiatori anionici come la DEAE cellulosa)
- Matrici silicee
- Gel filtration
- Ultrafiltrazione

## *Attenzione...*

**NUCLEASI** (si trovano anche sulla pelle):

**DNAasi (enzimi che degradano il DNA)**

richiedono ioni metallici per la loro attivazione

sono termolabili

facilmente inattivate da agenti chelanti o sterilizzaz. in autoclave

**RNAasi (enzimi che degradano l'RNA)**

non richiedono cofattori

possono adsorbirsi a vetro e plastica e rimanere attive

resistono anche alla autoclave



# Principi e tecniche base di biologia molecolare

**Estrazione** acidi nucleici (DNA o RNA)



Verifica tramite **elettroforesi su gel** di agarosio



**Amplificazione** tramite PCR (da DNA) o RT-PCR (da mRNA)



*(Verifica dei **prodotti di amplificazione** tramite elettroforesi su gel di agarosio)*



**Sequenziamento** degli amplificati

# **Elettroforesi acidi nucleici**

# ELETTORFORESI

- metodo fisico di separazione che sfrutta la **mobilità elettroforetica** di molecole cariche, sottoposte ad un campo elettrico
- si realizza attraverso l'utilizzo di un **sistema elettroforetico**



**matrice di gel**  
**cella elettroforetica**  
**alimentatore** (in cui applicare voltaggio o intensità di corrente costante)  
**tamponi salini**



si possono studiare sia gli  
**acidi nucleici (DNA e RNA)** sia le **proteine**

## Matrice di gel

serve da “**setaccio**” molecolare e consente la separazione

può essere fatto di polimeri **agarosio** o **poliacrilamide**

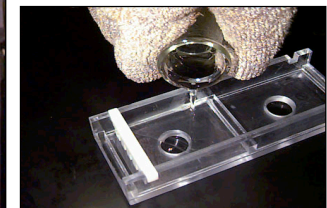
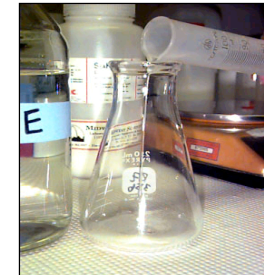
## Come si forma il gel?

### Gel di agarosio:

- pesare l'agarosio
- misurare il buffer (TBE/TAE)
- bollire l'agarosio in buffer
- versare il gel nella vaschetta allestita

### Gel di acrilamide:

- miscelando *acrilamide* e *bis-acrilamide* che formano un polimero complesso a maglia\*



## Gel di agarosio

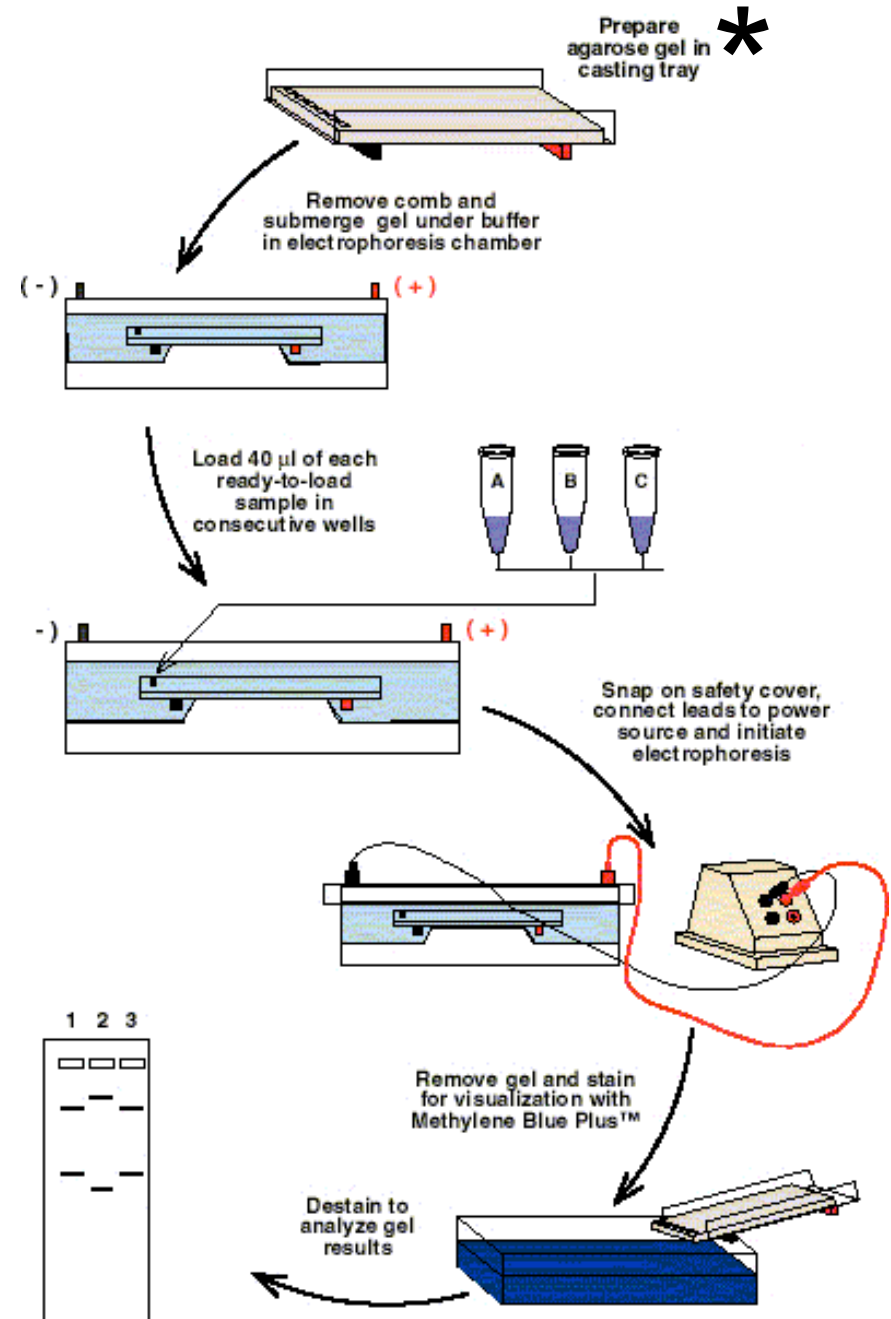
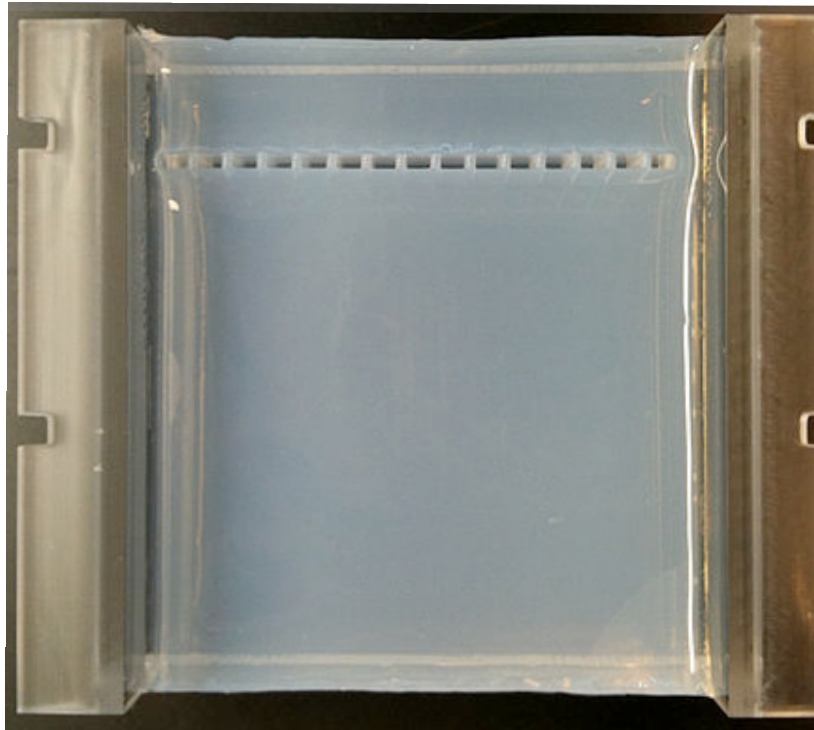
- utili per la separazione e caratterizzazione di **acidi nucleici**
- di solito in **sistemi orizzontali**
- la velocità di migrazione elettroforetica attraverso i gel di agarosio dipende principalmente da **4 parametri**

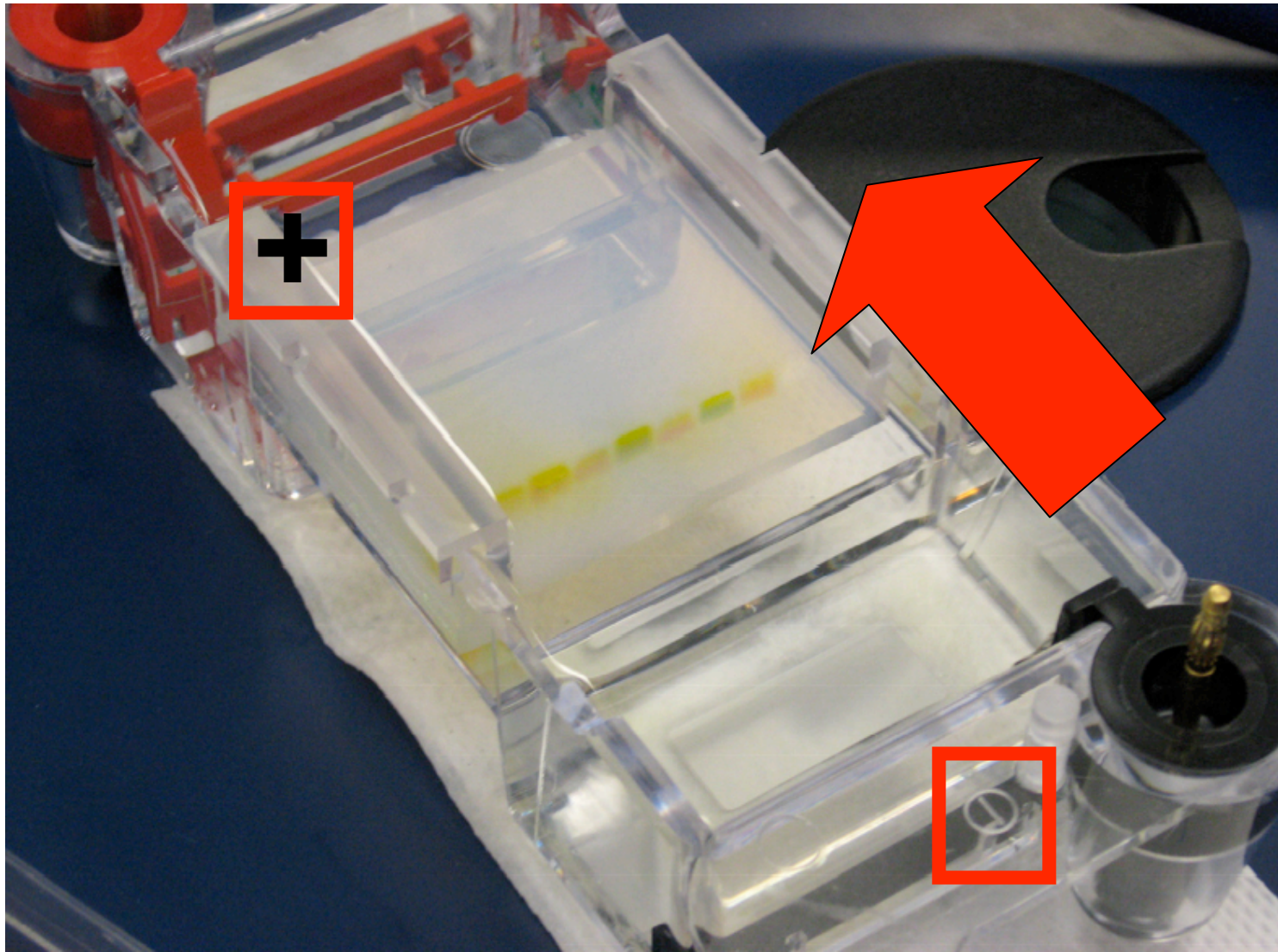


**taglia molecolare del DNA o RNA**  
**concentrazione di agarosio**  
**conformazione della molecola**  
**voltaggio**

Allestimento della tecnica elettroforetica su gel orizzontali di agarosio (schema)

\* Gel visto dall'alto:





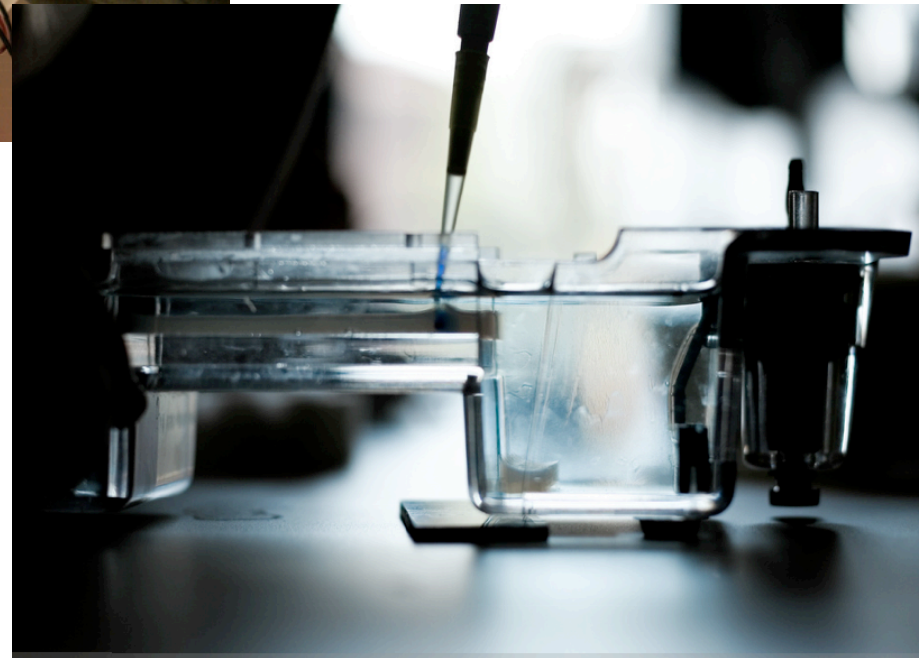




## Miscela di caricamento:

- *campione*

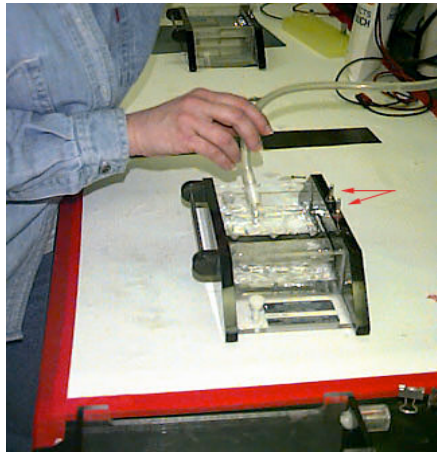
- *sample buffer* (tampone con glicerolo e coloranti come xilene cianolo e blu di bromofenolo)



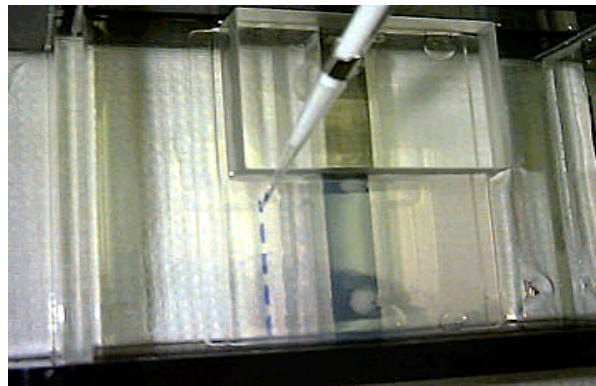


# Corsa e rilevazione su gel orizzontali di agarosio - procedure

Riempire la vaschetta con il buffer



Caricare i campioni sul gel

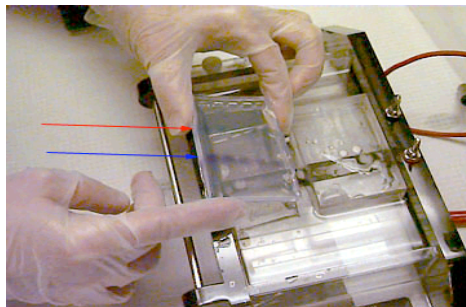


Accendere l'alimentatore (parte la corsa del gel)



Analisi del gel al **transilluminatore**

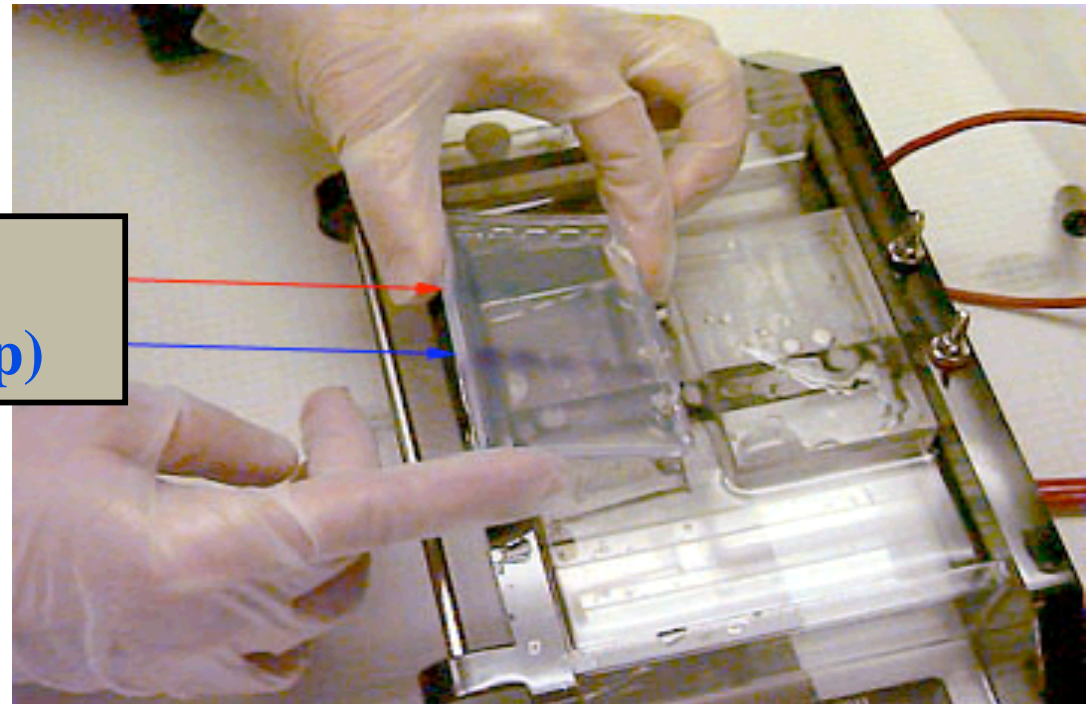
Fine della corsa



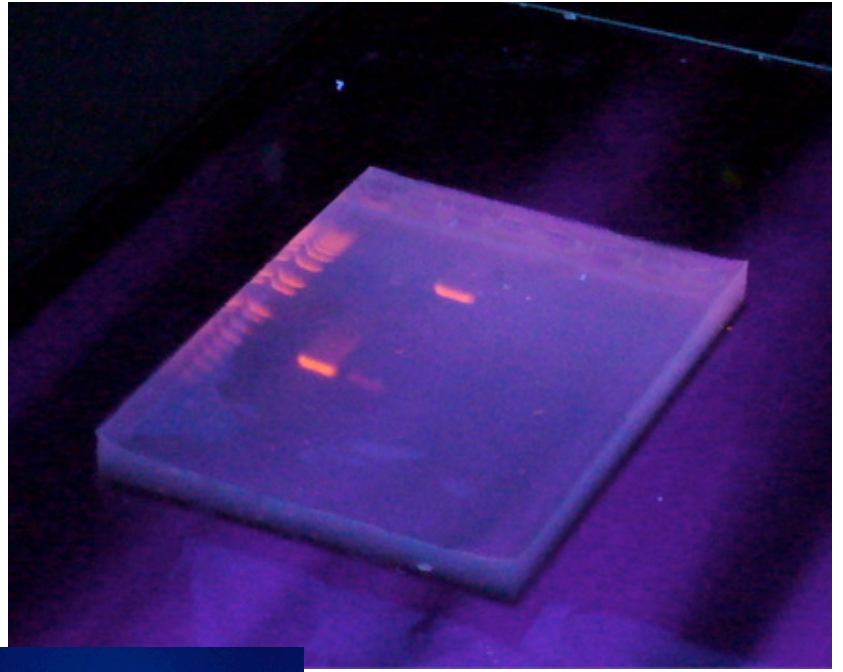


**xilene cianolo (ca. 4000 bp)**

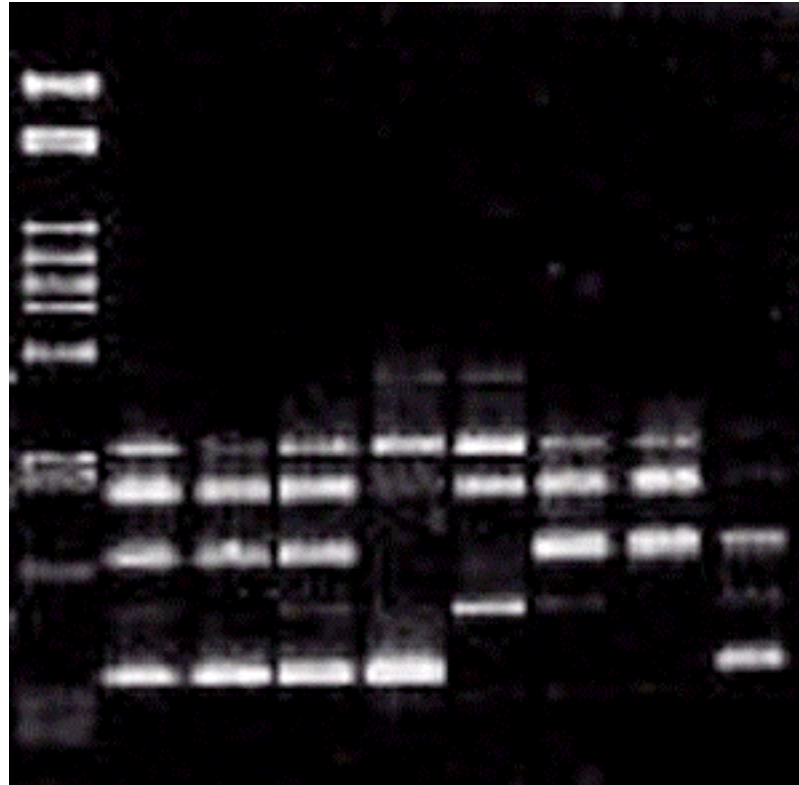
**blu di bromofenolo (ca. 300bp)**







## Un esempio di risultato al transilluminatore



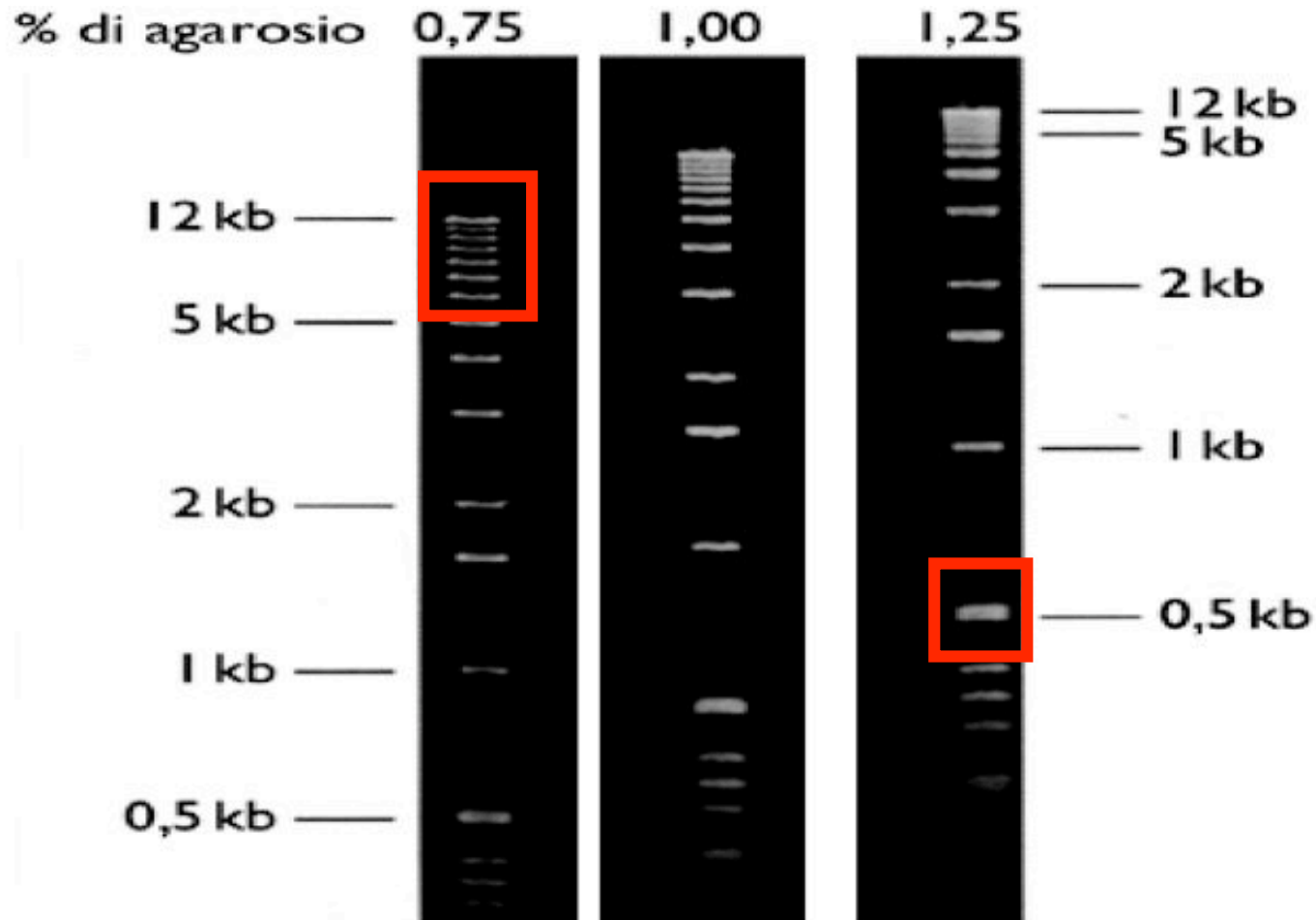
Bande luminose per via del **bromuro di etidio** (intercalante del DNA) che “fluoresce” se eccitato da una lampada a raggi UV (transilluminatore)

## Taglia molecolare del DNA o RNA e migrazione

a 5 Volt per cm di lunghezza della vaschetta

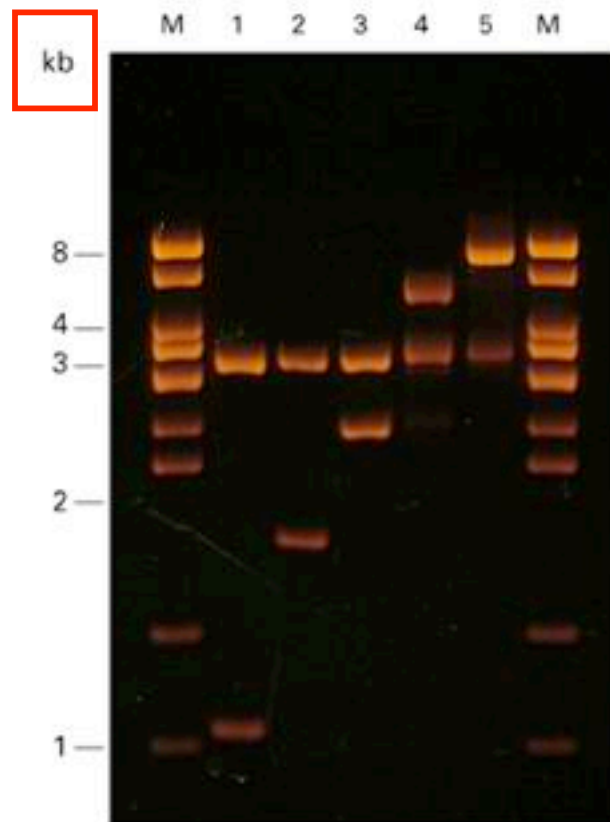
Agarosio (%)	Intervallo di separazione di DNA lineare (in Kb)
0.3	60 - 5
0.6	20 - 1
0.7	10 - 0.8
0.9	7 - 0.5
1.2	6 - 0.4
1.5	4 - 0.2
2.0	3 - 0.1

# Gel di agarosio: scelta della concentrazione di agarosio e risoluzione frammenti

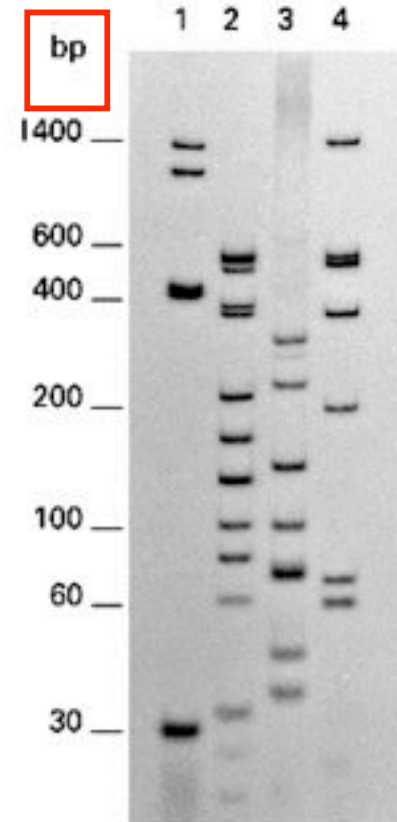


## I gel di poliacrilamide per separare acidi nucleici sono usati se:

- si devono separare piccoli oligonucleotidi < 100 basi, si possono risolvere anche *oligo* diversi anche per 1 nucleotide
- sono di solito a basse concentrazioni di acrilamide ( $\leq 6\%$ ) e contengono Urea (6M)

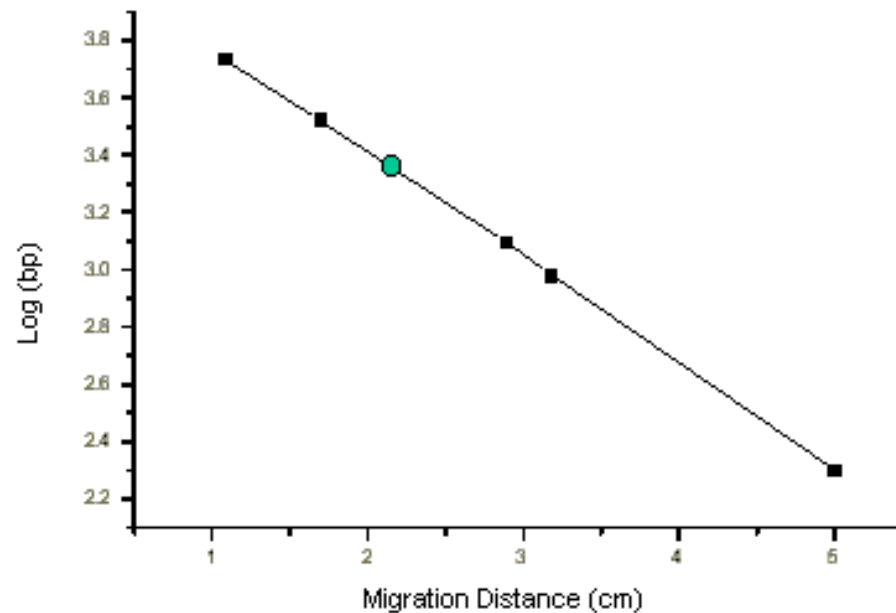
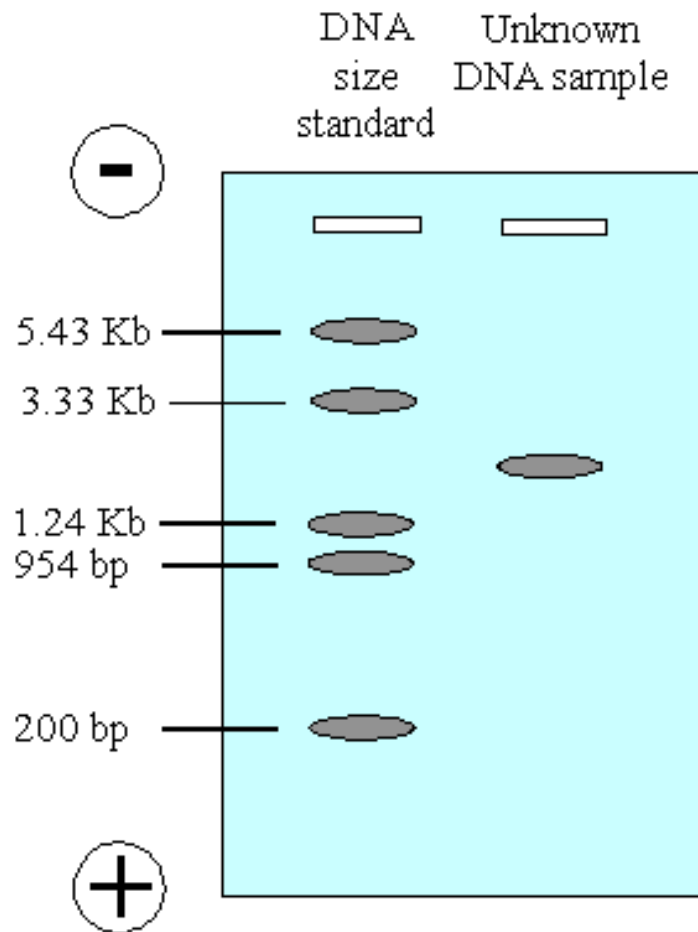


elettroforesi su gel di agarosio:  
frammenti grandi, colorazione con EtBr



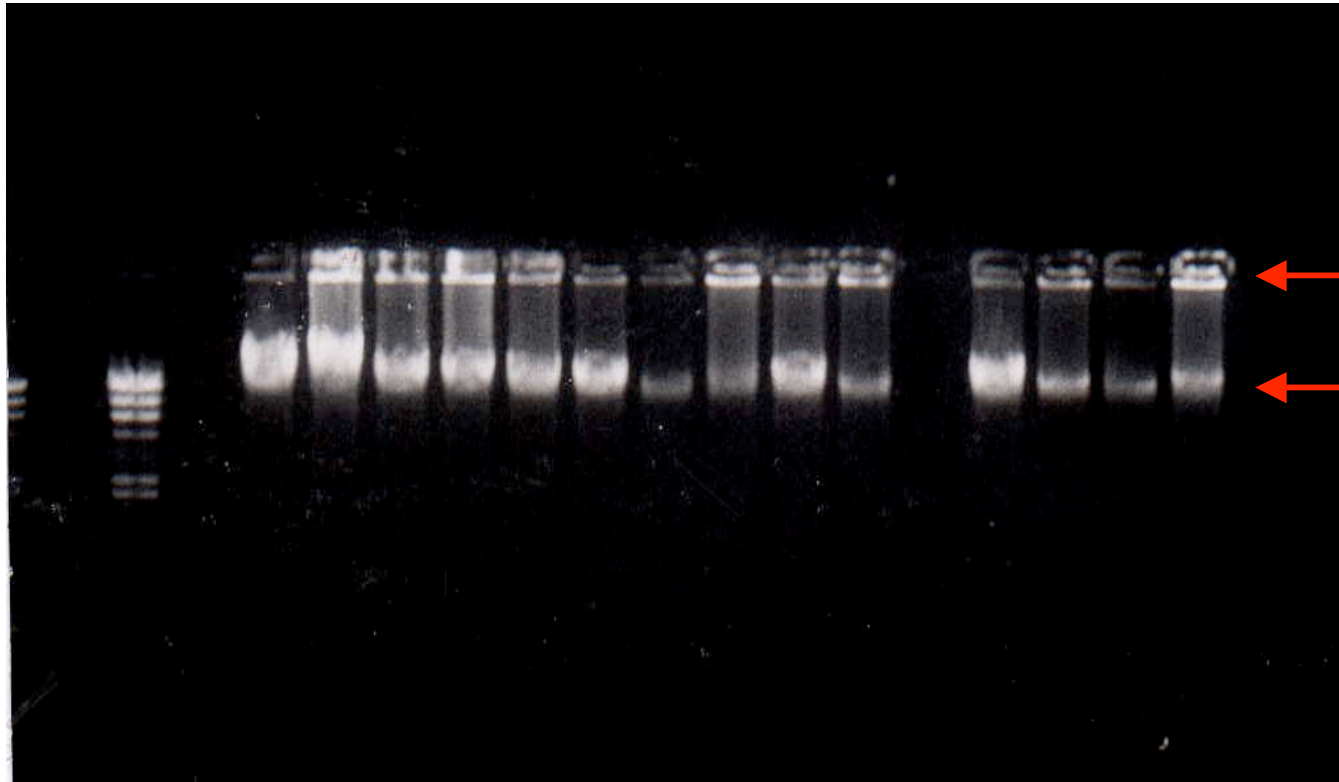
elettroforesi su gel di poliacrilammide:  
frammenti piccoli, marcatura radioattiva

Stima della dimensione di una molecola  
in rapporto alla mobilità elettroforetica  
di **std di dimensione nota**  
(questo vale anche per le proteine)





# Gel controllo DNA genomico

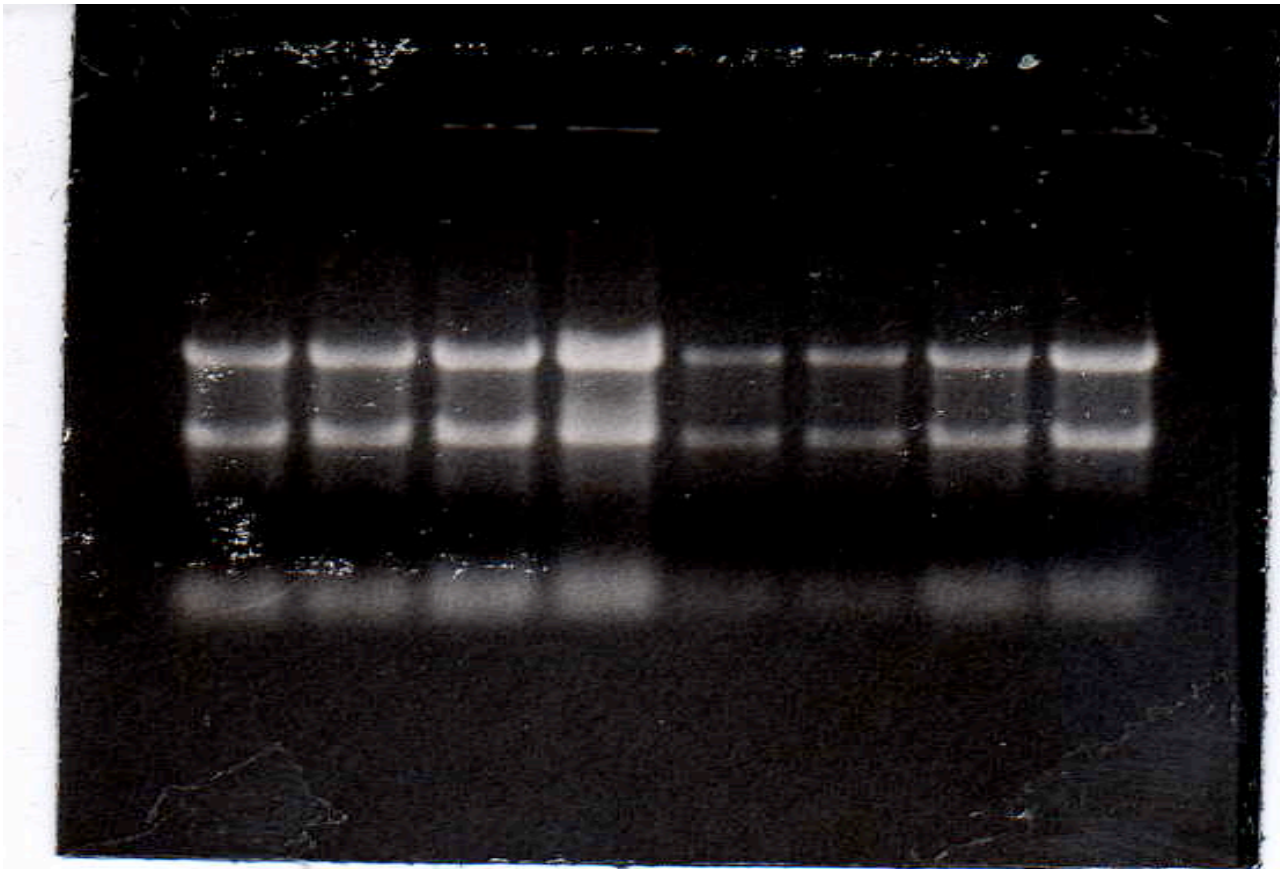


← Pozzetti /wells

← Frammenti di

DNA di 30-50 kb

# Gel controllo RNA totale

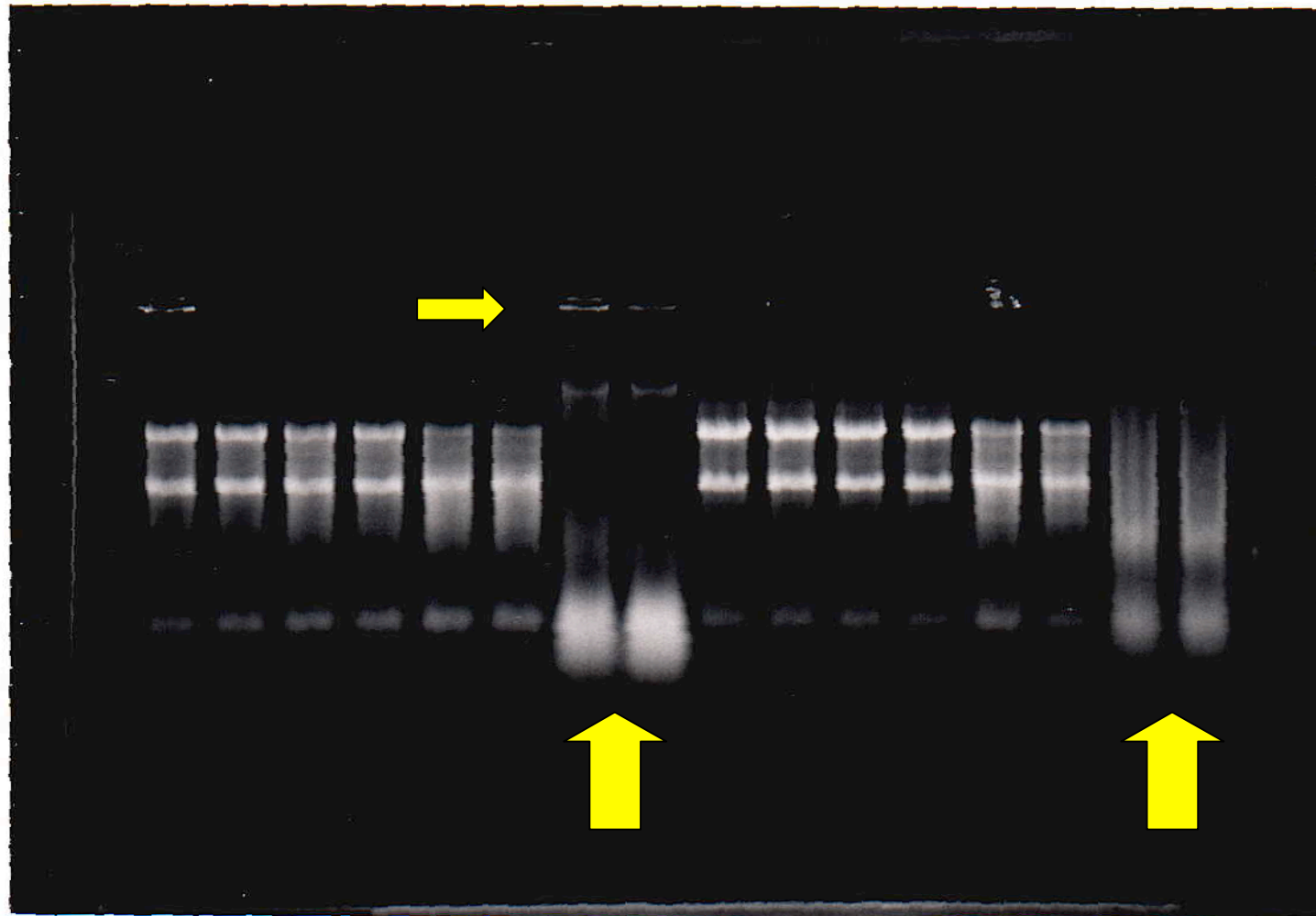


28S (5000 basi)

18S (2000 basi)

5S+tRNA(100 basi)

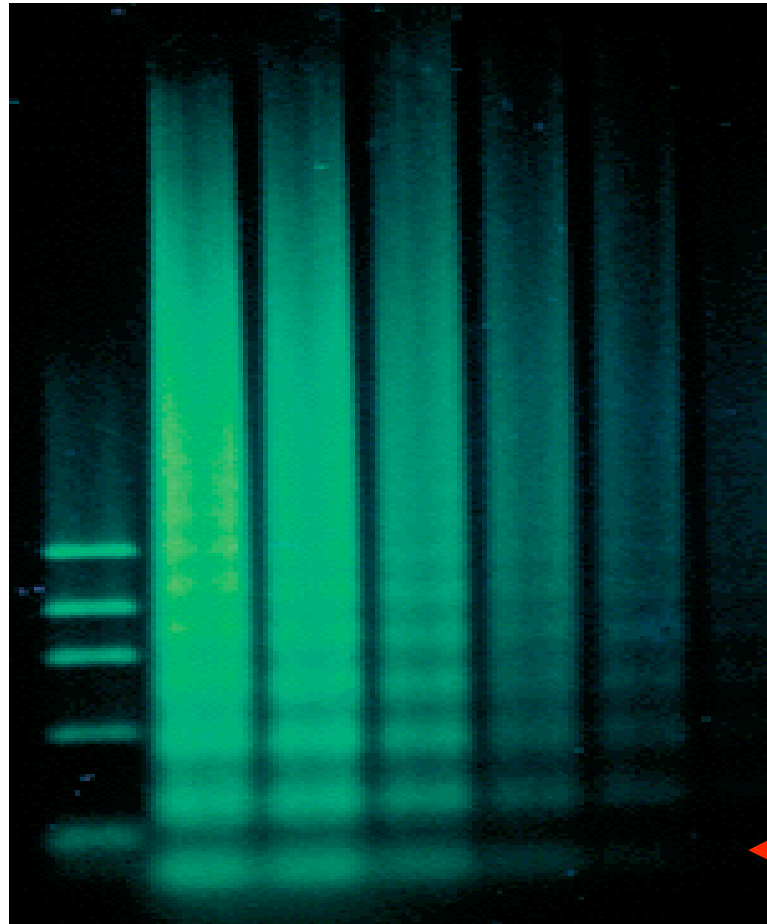
# Gel degradazione RNA, contaminazione DNA



9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

# GEL DNA APOPTOSI

## ladder (scala) apoptotico



← Frammenti tutti  
multipli di ca.200bp

**PCR**

## PCR o reazione di polimerizzazione a catena

*"PCR has transformed molecular biology through vastly extending the capacity to **identify, manipulate and reproduce DNA**. It makes abundant what was once scarce -- the genetic material required for experimentations."*

Paul Rabinow

Making PCR, A Story of Biotechnology, University of Chicago Press, 1996

Si tratta di una tecnica di **clonaggio** *in vitro*.  
*Clonare* vuole dire *replicare* e quindi produrre grandi  
quantità di **specifici** frammenti di DNA.  
E' un metodo generale per poter **studiare e purificare**  
qualsiasi sequenza di  
DNA o anche mRNA



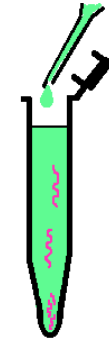
*Kary Mullis*

Ideatore della PCR negli anni '80

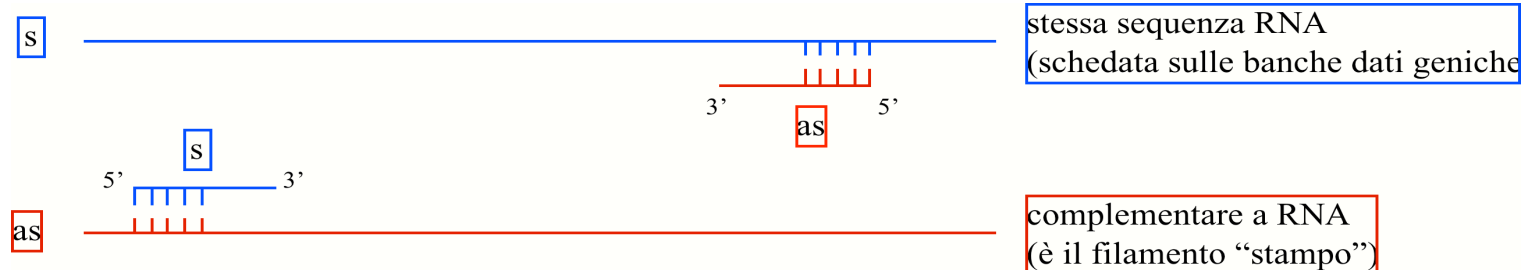
Premio Nobel per la chimica 1993

- Amplificazione esponenziale di DNA.  
La PCR puo' amplificare **un tratto di DNA** per piu' di 1 milione di volte
- Permette di “estrarre” un piccolo frammento **specifico** di DNA dall'intero contesto in cui è immerso
- Semplice realizzazione
- Estrema versatilità

## Elementi della reazione *in vitro* (in analogia al processo della duplicazione del DNA):



- 1) **DNA stampo** che contenga la regione da amplificare
- 2) **DNA polimerasi termostabile**  
(non viene denaturata se portata a 95° C)
- 3) I **4 desossinucleotidi trifosfati (dNTPs)**
- 4) Un **buffer** contenente **Mg** (il magnesio è il cofattore principale delle polimerasi ed è utile per potenziarne la processività )
- 5) **Due oligonucleotidi (*primer*)** complementari alle regioni fiancheggianti la sequenza di interesse da amplificare. I due ***primers*** saranno complementari uno allo stampo (primer senso *s* o *forward*) e l'altro al filamento di senso (primer senso *as* o *reverse*) nelle due regioni nelle regioni fiancheggianti.





Il processo di PCR prevede un certo numero di **cicli di reazione**.

**Ogni ciclo consiste di tre fasi** a temperature diverse (termociclatore):

1- **DENATURAZIONE**: t 90 ° - 95° C.

Il DNA stampo viene denaturato

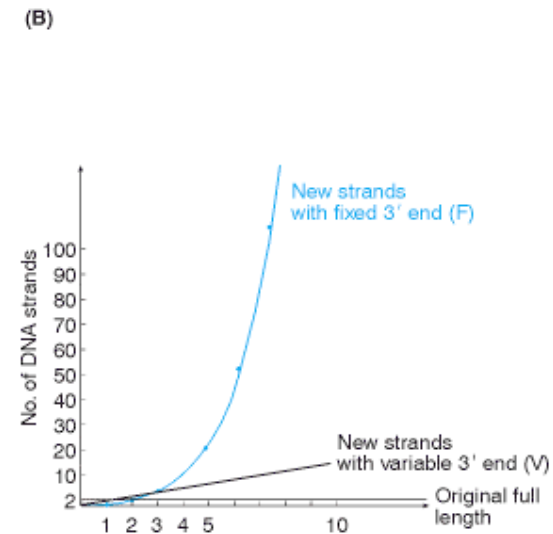
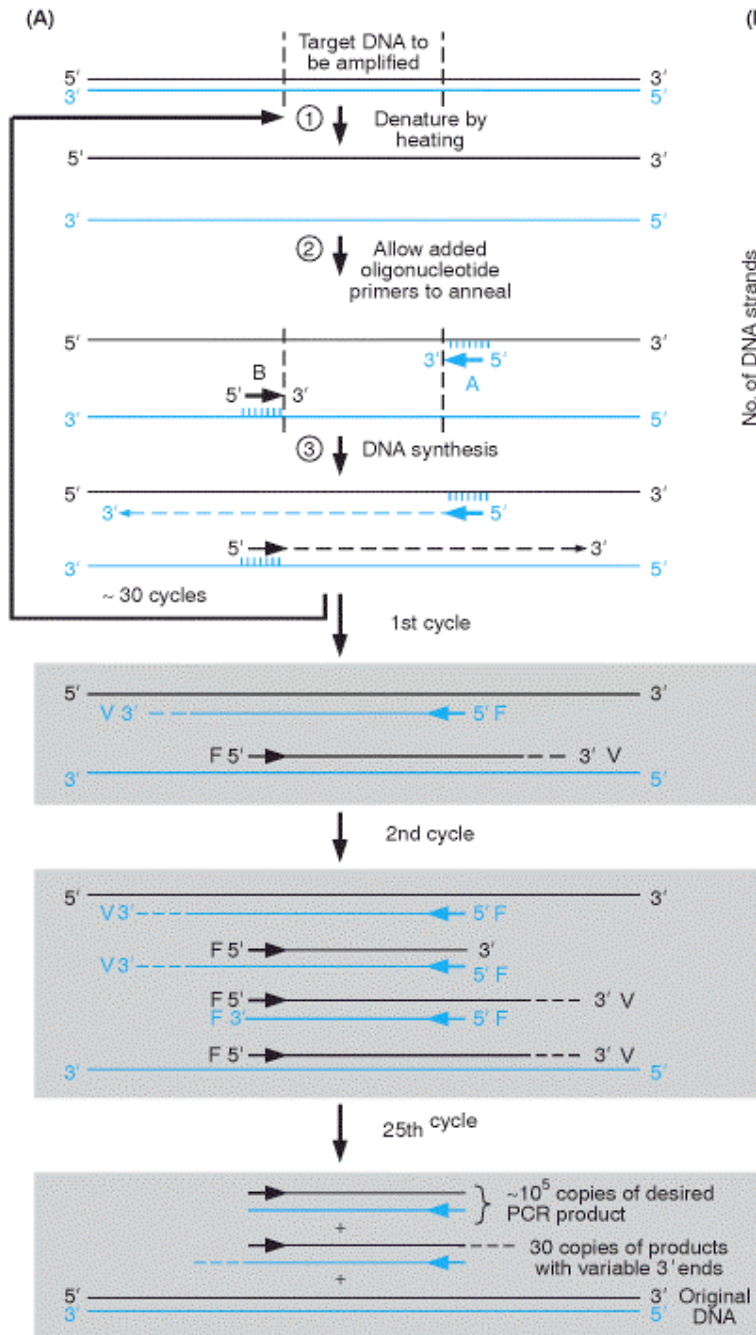
2- **APPAIAMENTO** (*annealing dei primer*): t 40°-60°C.

I *primers* si appaiano con il DNA stampo in base alle sequenze specifiche

3- **SINTESI**: t 72°C

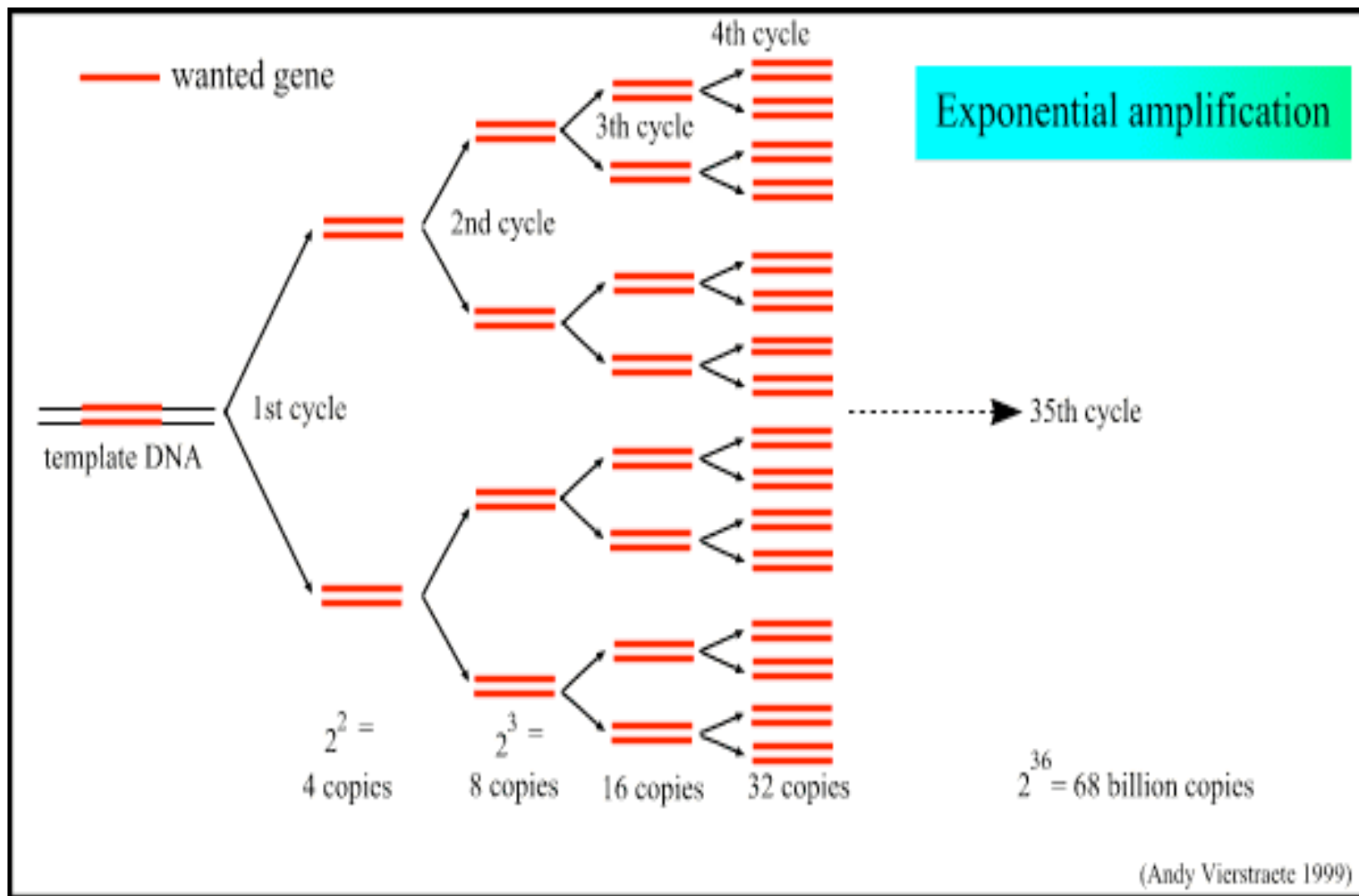
Questa temperatura è ottimale per il funzionamento ad es. della Taq polimerasi (*Thermus aquaticus* - batterio termofilo vive nelle pozze di acqua calda del Parco di Yellowstone)

Attualmente sono disponibili anche **altre DNA polimerasi** di altri organismi con maggiore processività ed accuratezza)

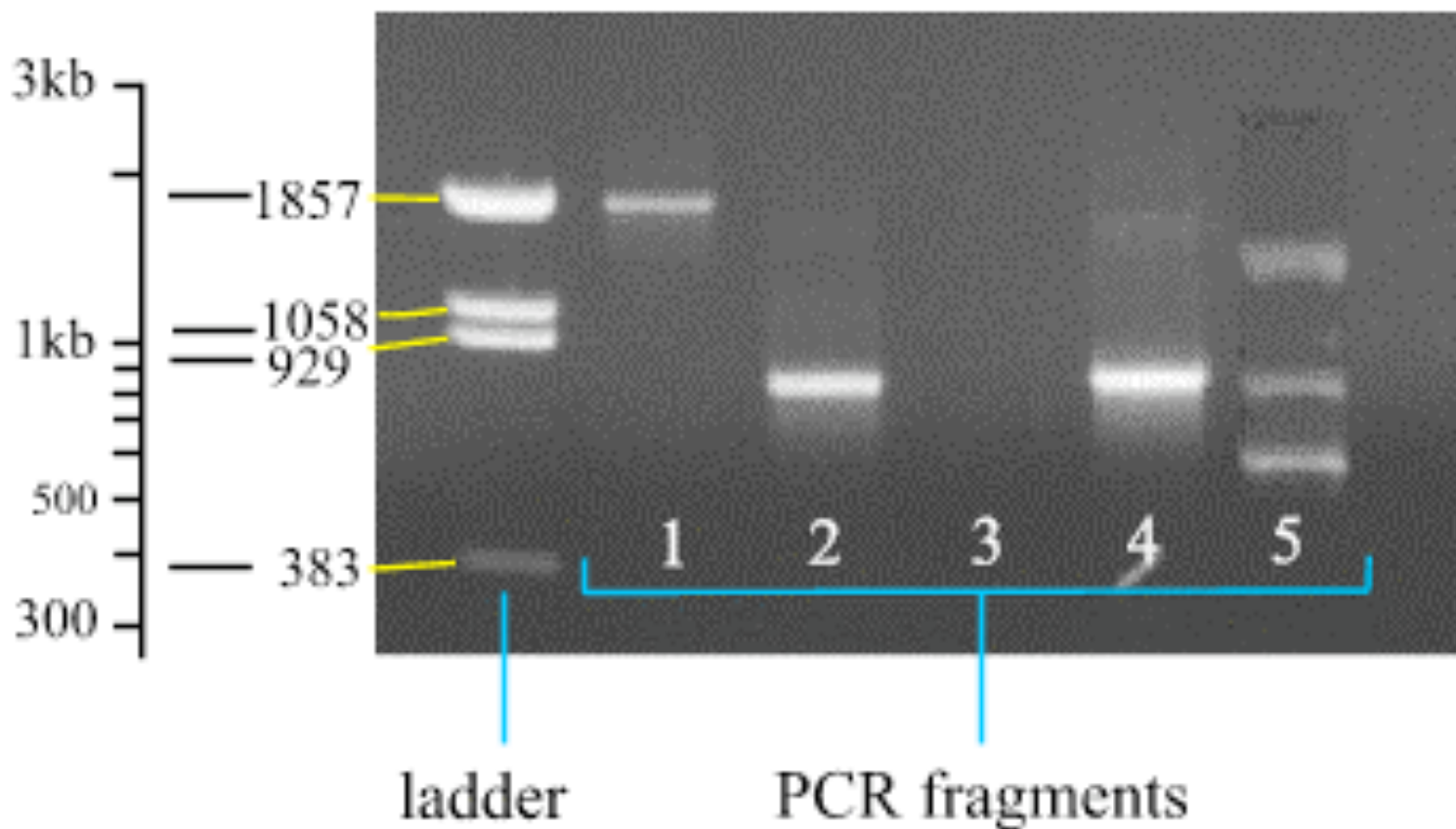


Key:  
 F, F Fixed end  
 V, V End of variable length

S&R Fig. 6.1



## Verifica dei prodotti di PCR su gel di agarosio



# Ottimizzazione della PCR

- Concentrazione di *Mg*
- Scelta dell'enzima e sua concentrazione
- Progettazione dei *primers*. Questi sono di norma compresi tra 20 e 30 nucleotidi e non dovrebbero mai essere <a 16 unità, al fine di non pregiudicare la specificità del processo. Il contenuto in GC dovrebbe essere compreso tra il 45 ed il 50%, il primer non dovrebbe contenere sequenze tra loro complementari o ripetute invertite per evitare la formazione di dimeri di primer o strutture a forcina
- Quantità e qualità dello stampo
- Parametri dei cicli
- Controllo di cross-contaminazioni con altri acidi nucleici

# Progettazione PCR

- 1) Scegliere la strategia (**stampo DNA o RNA**)
- 2) Dimensioni della regione da amplificare
- 3) Usare **programmi** per progettare i *primers* nella regione scelta o conoscere le regole generali
- 4) Verificare la **validità "biologica" dei primers** tramite il servizio BLASTN per cercare eventuali somiglianze con altre zone oltre quella attesa, nella stessa regione o nell'intero genoma. BLASTN è un software che permette di allineare la sequenza di interesse con tutte le sequenze depositate nei diversi *database* di sequenze nucleotidiche. Con questo approccio si potrà verificare se il primer *s* o l'*as* riconoscono in modo specifico solo la sequenza d'interesse.
- 5) Verificare la sequenza, attraverso sequenziamento, del prodotto di amplificazione previsto

# PCR

## VANTAGGI:

- Sensibilità e rapidità
- Analisi simultanea di molti campioni
- Analisi simultanea di diverse sequenze sullo stesso campione
- Analisi di DNA degradato o incluso in mezzi strani, o fissato

## SVANTAGGI:

- Sensibilità (rischio di contaminazioni-falsi positivi)
- Efficienza variabile di amplificazione a seconda della sequenza
- **Richiede conoscenza di base delle sequenze da amplificare**  
e messa a punto delle coppie di oligonucleotidi di innesco (primers)
- Può sintetizzare frammenti relativamente corti (< 5000 bp)
- La sintesi è imprecisa e può introdurre errori nella sequenza  
(la Taq pol non possiede attività 3'→5' esonucleasica)

PCR utilizzata per rivelare uno specifico mRNA:  
PCR in seguito a retrotrascrizione (**RT-PCR**)

- 1) Estrazione dell'RNA
- 2) Purificazione dell'RNA poliadenilato (mRNA) oppure usare primer utili a tale scopo (vedi dopo oligodT)
- 3) Sintesi del cDNA con la **trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA-dipendente)**





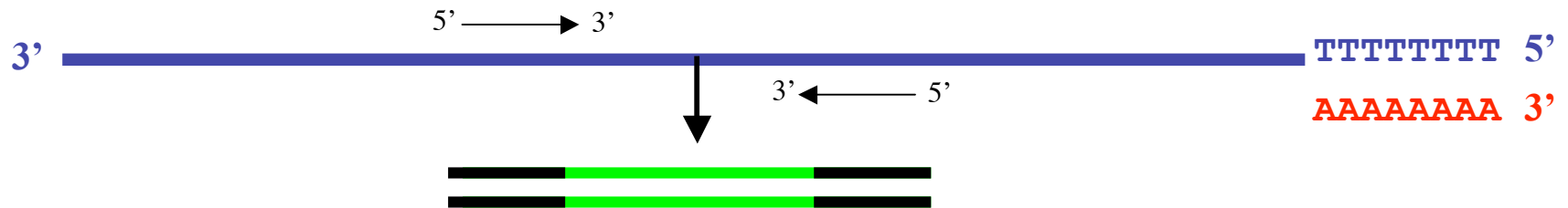
# RETROTRASCRIZIONE - es. protocollo

- 1) Estrazione dell'RNA. Purificazione dell'RNA e sua quantificazione. Di norma si può partire da **1 µg di RNA / 25µl di volume finale di reazione.**
- 2) L'enzima è una DNA polimerasi RNA dipendente o trascrittasi inversa. Noi usiamo di norma 1µL su 25µl, pari a 200U di *M-MLV RT*, che è la trascrittasi inversa o retrotrascrittasi ovvero la DNA polimerasi RNA dipendente del Virus della leucemia di topo (Moloney Murine Leukemia Virus). Si aggiunge anche il buffer di reazione, la mix dei dNTPs ed un primer.
- 3) I primer possono essere OLIGO dT, random esameri o nonameri o anche il primer antisenso gene-specifico.
- 4) Incubare 1 ora alla temperatura opportuna.

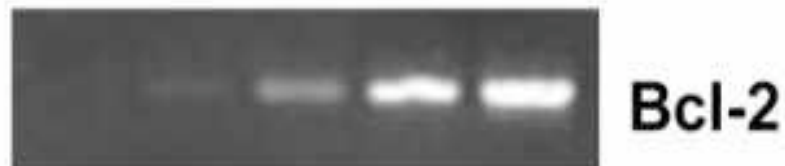
PCR utilizzata per rivelare uno specifico mRNA:  
PCR in seguito a retrotrascrizione (**RT-PCR**)



- Amplificazione della sequenza di interesse con oligonucleotidi di innesco specifici



- Analisi dei prodotti dell'amplificazione (elettroforesi)



# Applicazioni della PCR

dalla **ricerca applicata** alla **ricerca di base**

- Tipizzazione di marcatori genetici
- *Screening* mutazionale di mutazioni non caratterizzate
- Identificazione di mutazioni puntiformi
- Identificazione di nuovi geni attraverso il clonaggio di cDNA e lo studio del tratto di DNA genomico
- Studi di espressione genica
- Mutagenesi in vitro

## RT-PCR utilizzata per quantificare uno specifico mRNA

- Reazione analizzata a compimento:  
PCR semiquantitativa (controllo interno)
- Reazione analizzata in tempo reale  
(*real time PCR*)= applicazione particolare della PCR che permettere di ottenere dati QUANTITATIVI, cioè di valutare il numero di copie di stampo  
Analisi quantitativa che può essere relativa o assoluta

# Esempi di utilizzo della PCR

su **DNA**:

su **RNA messaggero** (RT-PCR):

Quali differenze?  
Quali vantaggi?

# **Sequenziamento automatico**

## SEQUENZIAMENTO

Questa tecnica ha subito il maggiore avanzamento negli ultimi anni tanto che già costituisce, e sempre di più lo farà, uno dei principali metodi diagnostici nella routine medica.

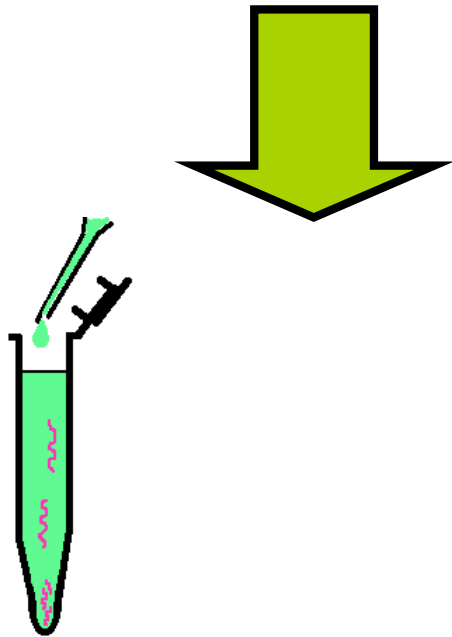


**automazione del  
sequenziamento**



# Il sequenziamento automatico


- Si basa sul metodo di Sanger (1977) con alcune piccole modifiche
- E' anche questa una reazione di polimerizzazione, ma con un singolo primer (dunque lineare)

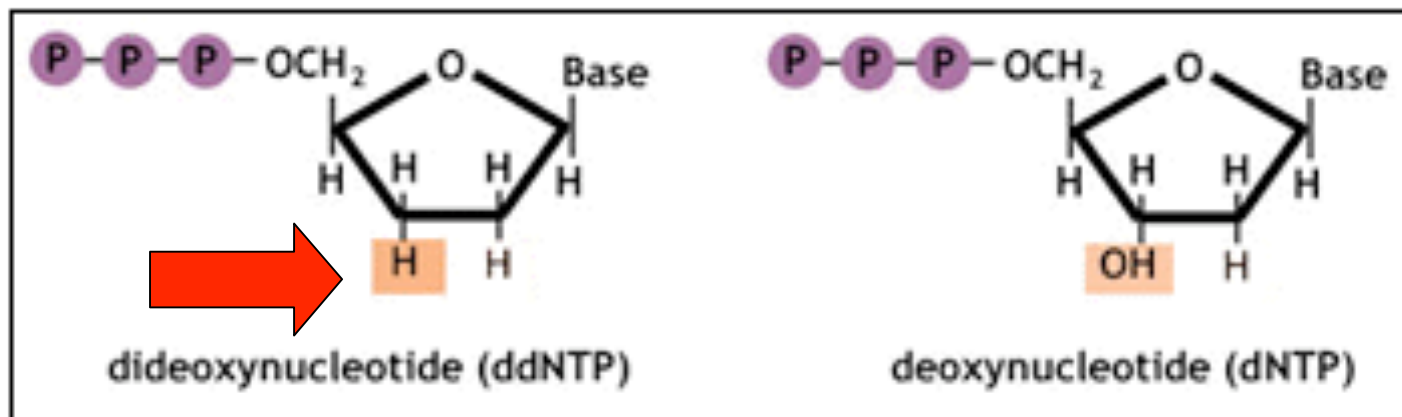


## Componenti:

- 1) Stampo (es. un **amplicone**  
=prodotto della PCR)
- 2) Un **solo** primer
- 3) La polimerasi
- 4) dNTPs +
- 5) **didesossinucleosidi trifosfati (ddNTPs).**

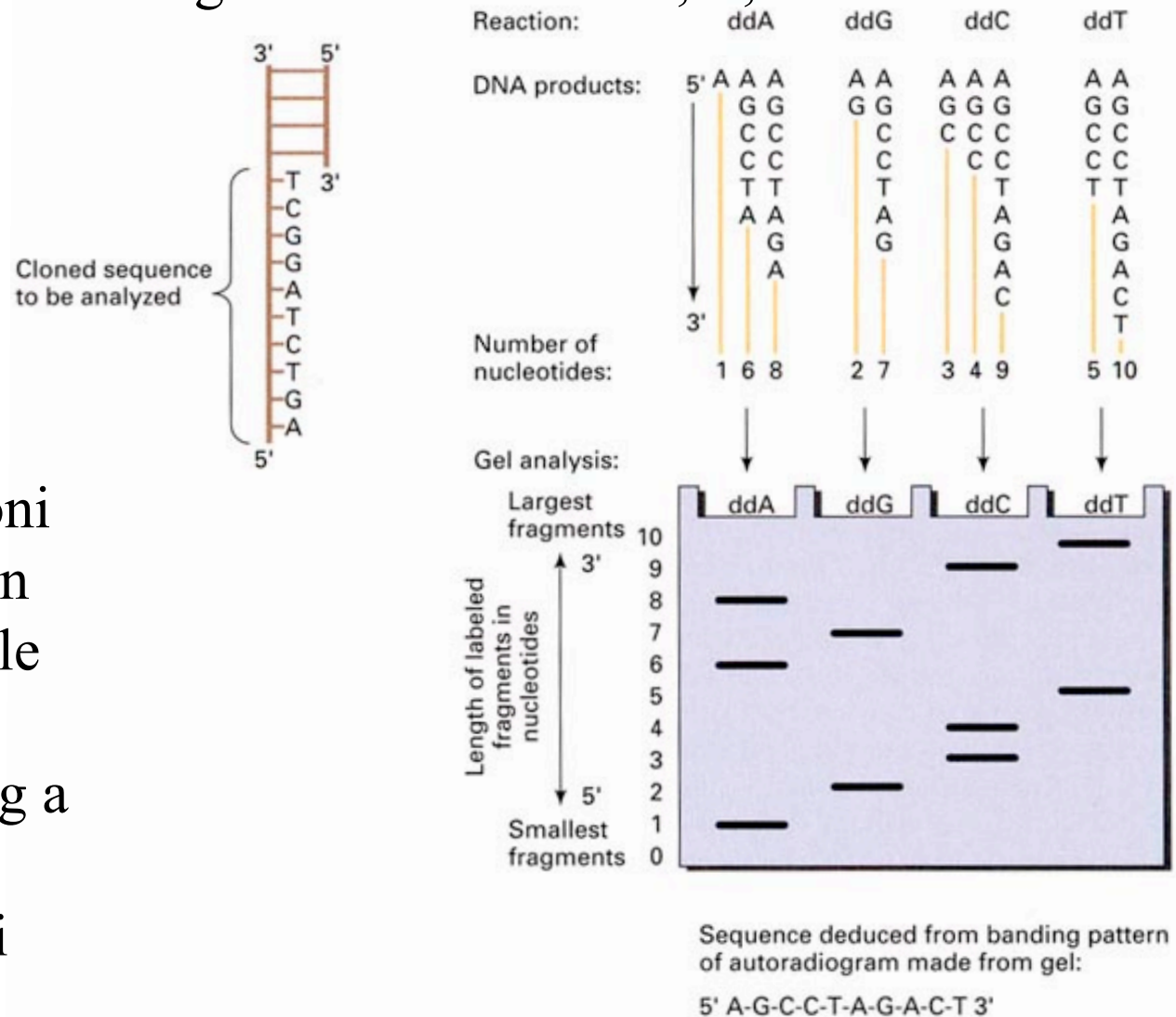
## Cosa sono i didesossinucleosidi trifosfati ?

**Definizione:** un desossinucleotide che **manca del gruppo idrossilico in 3'OH** ed è perciò incapace di formare un legame 3'-5' fosfodiesterico necessario per l'allungamento della catena.  **Quando viene casualmente incorporato nella polimerizzazione la catena qui si blocca.** Si creeranno quindi famiglie di frammenti di dimensione diversa e ognuno potrà avere anche la differenza di 1 solo nucleotide in più.



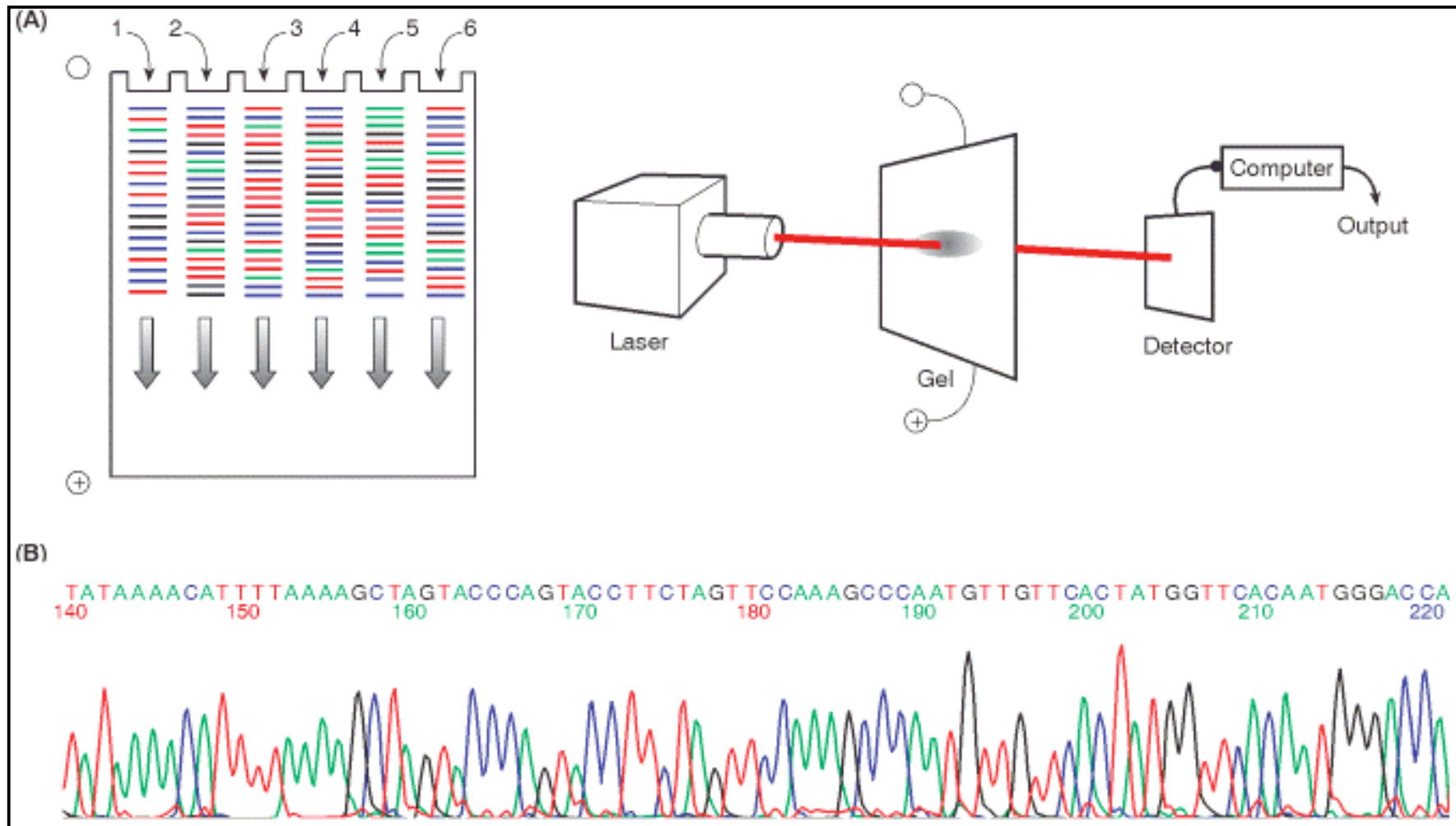
Il metodo di Sanger originale prevedeva l'utilizzo di 4 ddNTPs marcati con radioisotopi, dunque ogni campione da sequenziare veniva in realtà suddiviso in 4 mix di reazione, ognuna con un ddNTPs radioattivo specifico per una singola base azotata: A, T, C o G:

I prodotti delle 4 reazioni venivano fatte correre in parallelo su un gel che le separava al meglio di 1 solo nucleotide (vedi fig a lato) e lette dal basso verso l'alto spostandosi tra le 4 lanes

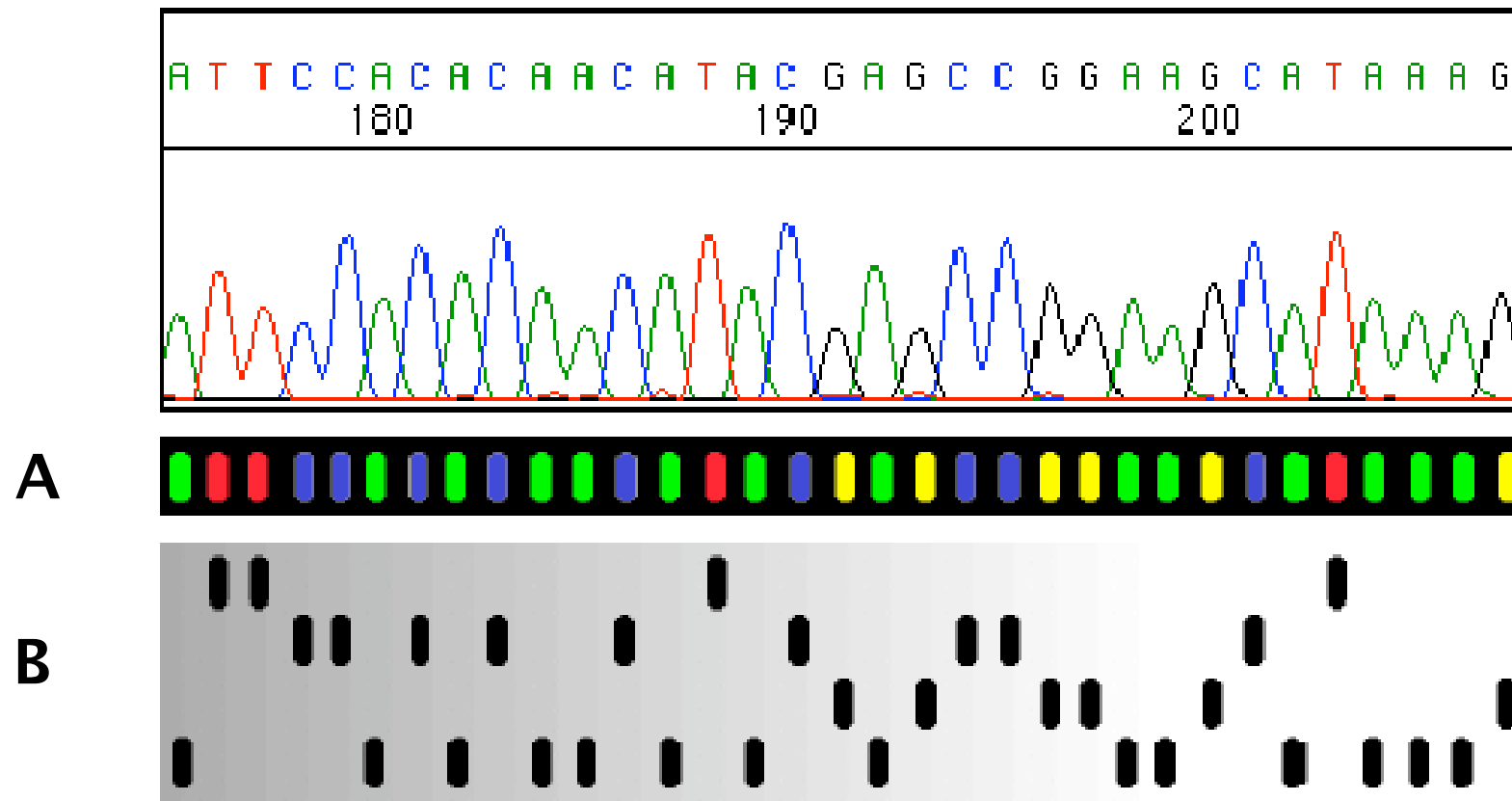


I didesossinucleosidi trifosfati sono ognuno coniugato con un fluorocromo diverso che viene eccitato dal laser man mano che i frammenti migrano attraverso il gel: così la reazione può essere 1 sola invece che 4

**A = verde, T = rosso, C = blu, G = nero**

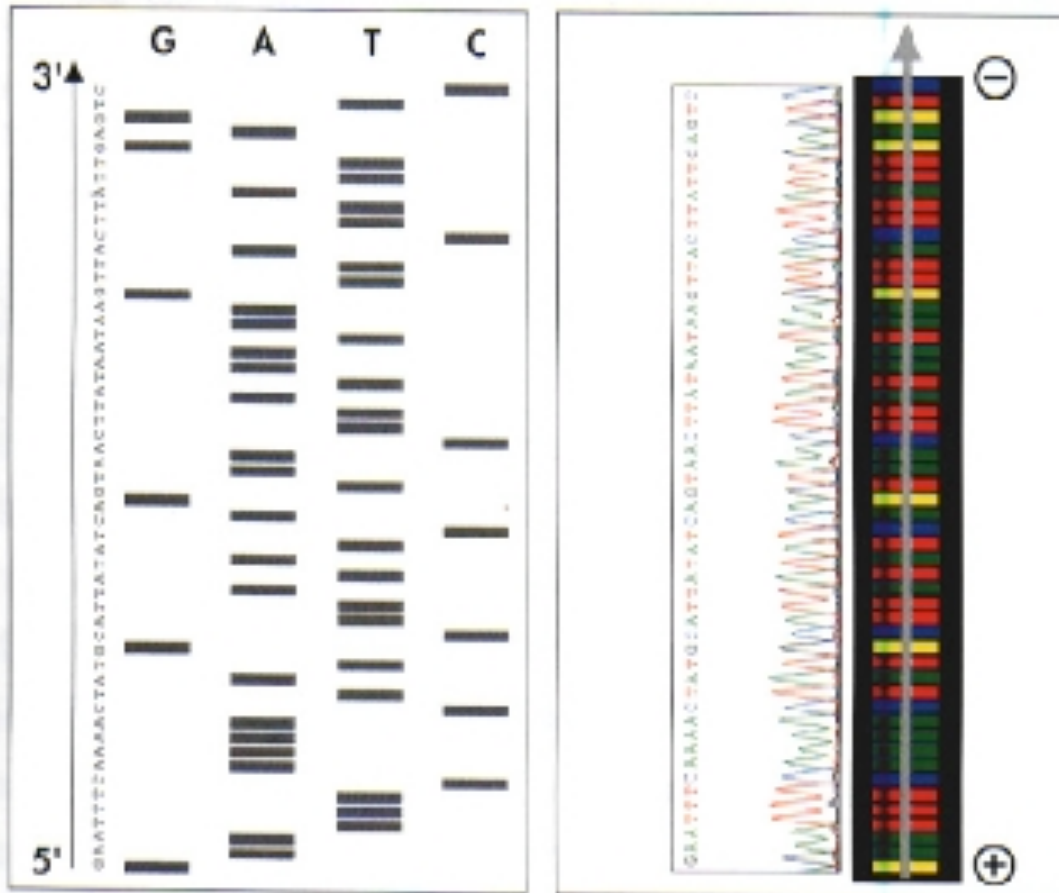


# Confronto tra il sequenziamento automatico (A) ed il metodo di Sanger (B)



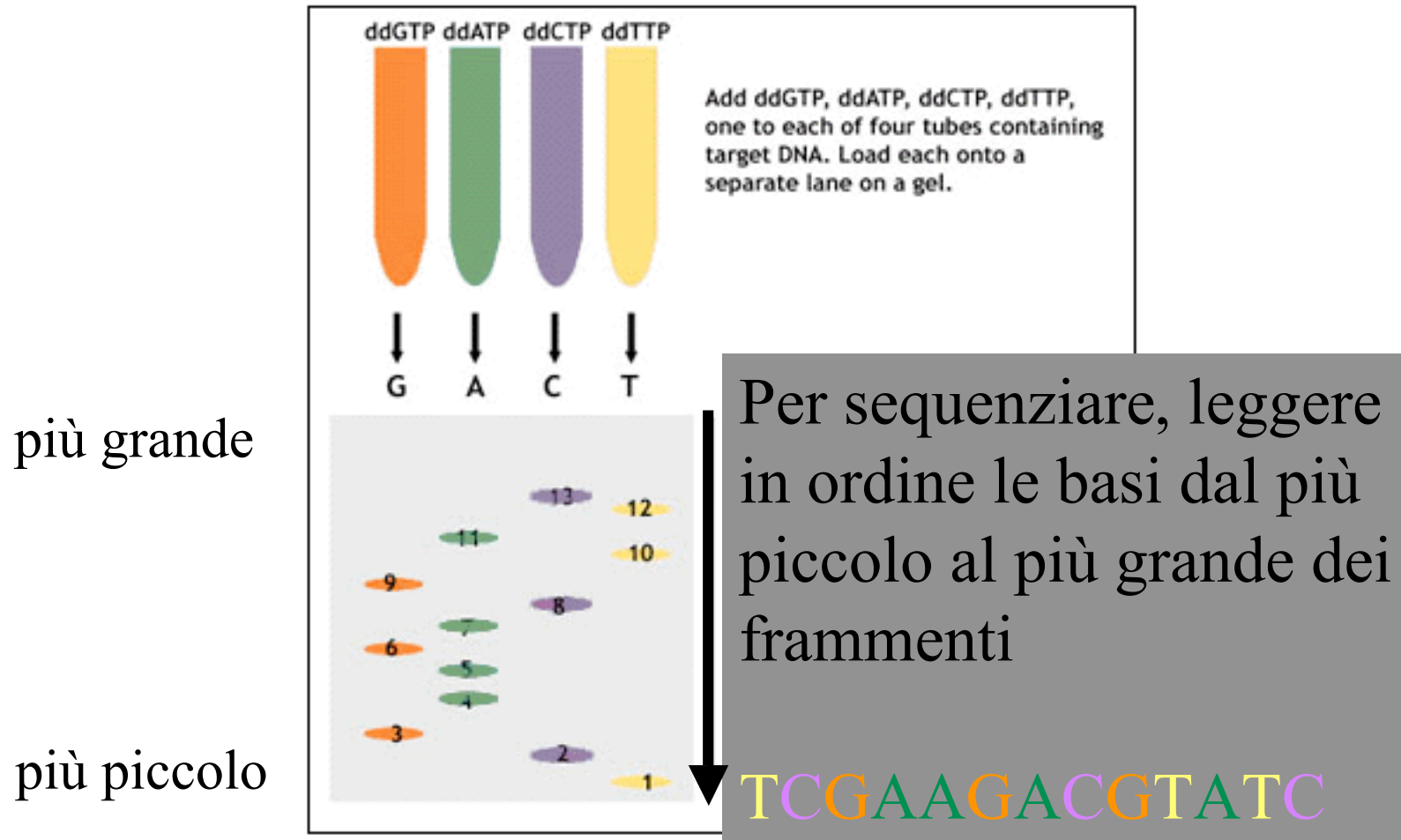
4 colori/1 sola lane (A) *versus* 1 colore (radioisotopo)/4 lane per ogni campione (B)

## Confronto tra i due metodi

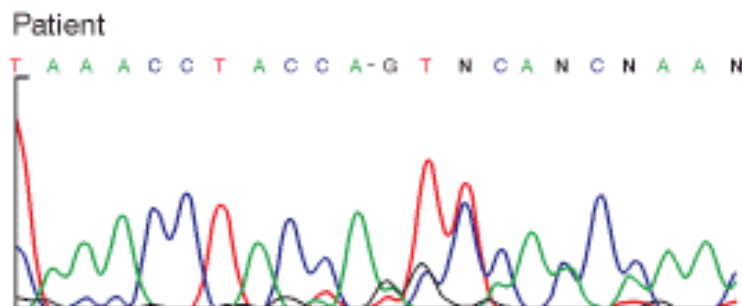
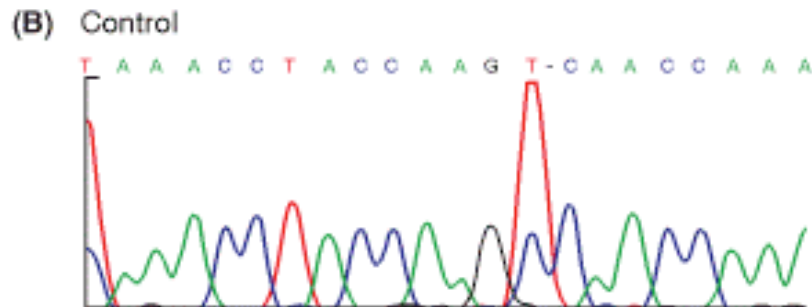
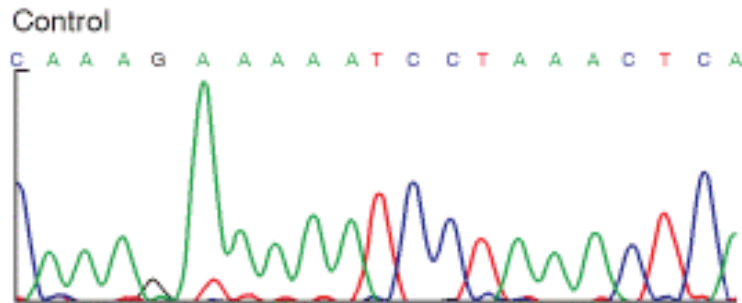
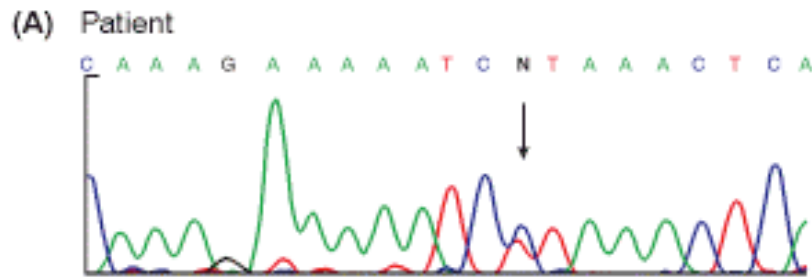


La lettura dei picchi è fatta a partire dai frammenti più piccoli che migrano di più a quelli più grandi. Ogni frammento differirà di 1 nucleotide solo così da rendere possibile la lettura sequenziale del campione un nucleotide alla volta, un nucleotide dietro l'altro

## Ancora un altro esempio...







## Fibrosi cistica:

es. di mutazione in eterozigosi  
332C>T (sostituzione aa. P67L)

es.:Una delezione di una singola base  
3659 del C nell'esone 19.

La sequenza che segue la delezione  
risulta confusa poiché riflette la  
sovrapposizione delle sequenze dei  
due alleli in eterozigosi (gli stampi  
sono sfasati nella lettura). **La**  
**mutazione** **andrebbe** **confermata**  
**sequenziando** **anche** **il** **filamento**  
**antisense.**

*Da Strachan e Read: Genetica umana molecolare*