

INTRODUZIONE ALLA BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA (a cura del Responsabile Scientifico del Congresso: Dott. Paolo Lanzafame)

La **Biologia Molecolare Clinica** è il settore disciplinare afferente alla Medicina di Laboratorio che racchiude e contraddistingue l'insieme dei test che vengono sviluppati ed eseguiti sulla base di tecnologie ed approcci metodologico-concettuali tipici della Biologia Molecolare e Cellulare. Per test diagnostici molecolari si intendono quei test che comportano la determinazione di DNA, RNA, proteine o metaboliti per rilevare i genotipi, le mutazioni o le variazioni biochimiche che consentono di identificare specifici stati di salute o patologie.

Scopi della Biologia Molecolare Clinica:

- Analisi molecolare a livello di DNA o RNA per:
- Identificare mutazioni in soggetti affetti o portatori di patologie ereditarie
- Identificare mutazioni in soggetti affetti da patologie genetiche acquisite (tumori, leucemie, etc)
- Identificare microrganismi (batteri, virus, miceti, parassiti) infettanti o colonizzanti
- Genotipizzare il DNA individuale

Test molecolari –Finalità:

- Diagnosi
- Monitoraggio
- Suscettibilità
- Variabilità individuale
- Farmacogenetica
- Ricerca

Fasi di un test molecolare:

- Motivazione e preparazione all'analisi
- Analisi
- Interpretazione dei risultati
- Comunicazione del risultato

Test Diagnostici:

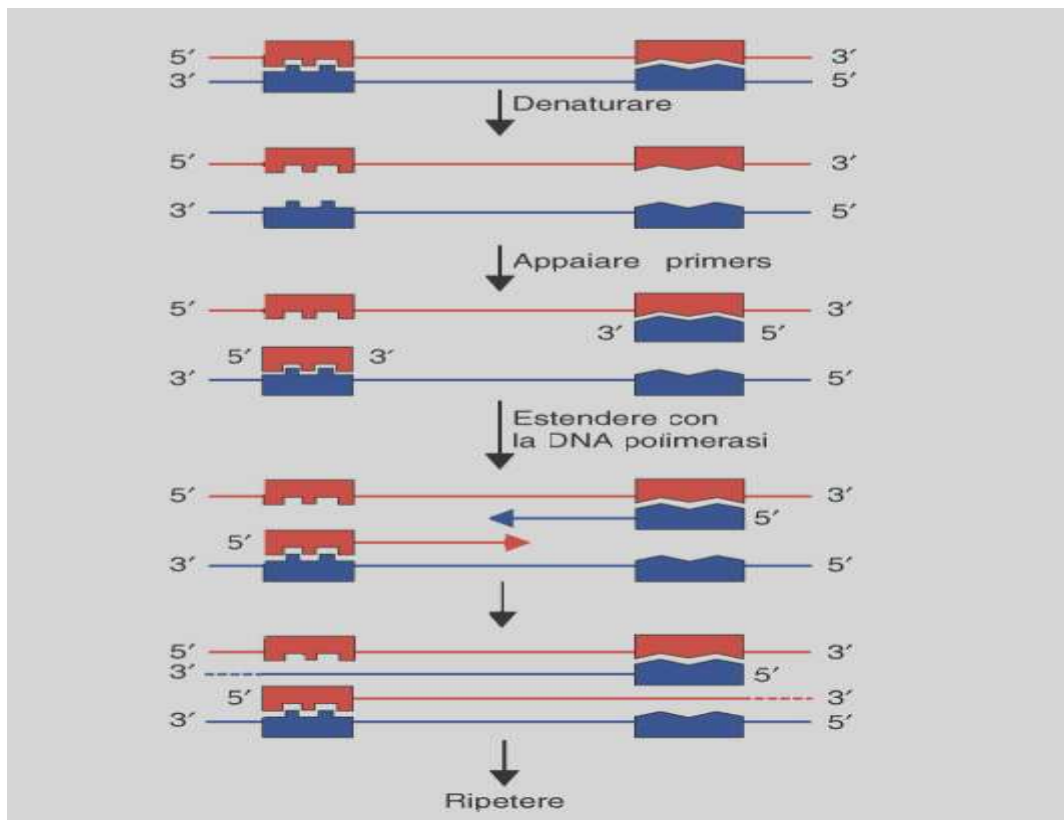
- Per risalire, o contribuire a risalire, alla causa della malattia e, quando possibile, al suo trattamento
- Diagnosi di malattia
- Conferma, in una persona affetta, di un sospetto clinico
- Identificazione di portatori sani (famiglie a rischio, screening di popolazione)
- Test preclinici e/o presintomatici

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente in vitro. E' una metodica relativamente recente che ha rivoluzionato la biologia molecolare, fu ideata da Kary Mullis nel 1985 e da allora le sue applicazioni hanno completamente modificato la ricerca biologica di base e applicata.

Numerosi varianti della PCR trovano applicazioni in biologia molecolare, in diagnostica molecolare e in ambito forense, nell'analisi dell'espressione genica, etc.

Richiede due oligonucleotidi (primer), ciascuno complementare ad una delle due eliche di DNA da amplificare, ed una DNA polimerasi; cicli ripetuti di riscaldamento e raffreddamento amplificano la regione di DNA compresa tra i due primer, producendone grandi quantità.



Lo stesso metodo può essere usato per modificare la sequenza amplificata o per aggiungerle nuova informazione di sequenza. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per potere sintetizzare degli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse, e che una piccola quantità della sequenza sia disponibile per dare inizio alla reazione. Non è necessario che la sequenza da sintetizzare enzimaticamente sia inizialmente presente in forma pura; essa può anche essere una frazione minoritaria di una miscela complessa, come un segmento di un gene a singola copia nel DNA totale umano. La sequenza da sintetizzare può essere presente inizialmente come una molecola discreta oppure può essere parte di una molecola più grande. In entrambi i casi, il prodotto della reazione sarà una molecola discreta di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligomeri utilizzati.

Un tipico ciclo di PCR:

1. Denaturazione al calore di uno stampo di DNA (template) che deve essere copiato (93 - 95 °C). Durante la denaturazione la doppia elica si apre a formare singoli filamenti, e ogni reazione enzimatica cessa (ad esempio le reazioni di allungamento).
2. Appaiamento (annealing) di coppie di oligonucleotidi, (37 - 65 °C). Legami idrogeno si formano e si rompono continuamente tra primers e filamento stampo. Se i primers si adattano perfettamente allo stampo, i legami idrogeno sono così forti che gli inneschi rimangono attaccati.
3. Estensione da parte di DNA polimerasi (Taq) termoresistente a partire dai primer (65-72 °C). La polimerasi aggiunge dNTP agli inneschi in direzione 5'→3', leggendo lo stampo in direzione 3'→5'; le basi aggiunte sono complementari al filamento stampo.

La scelta delle condizioni operative del ciclo (tempo e temperatura) è compito dell'operatore, è una scelta empirica e non prefissata.

Un passaggio graduale tra la temperatura di annealing e la temperatura di estensione permette alla Taq di iniziare l'elongazione senza che i primers si stacchino ($T > T_m$). Via via che la Taq polimerizza la temperatura supera i 72 °C e ricomincia il ciclo con la denaturazione.

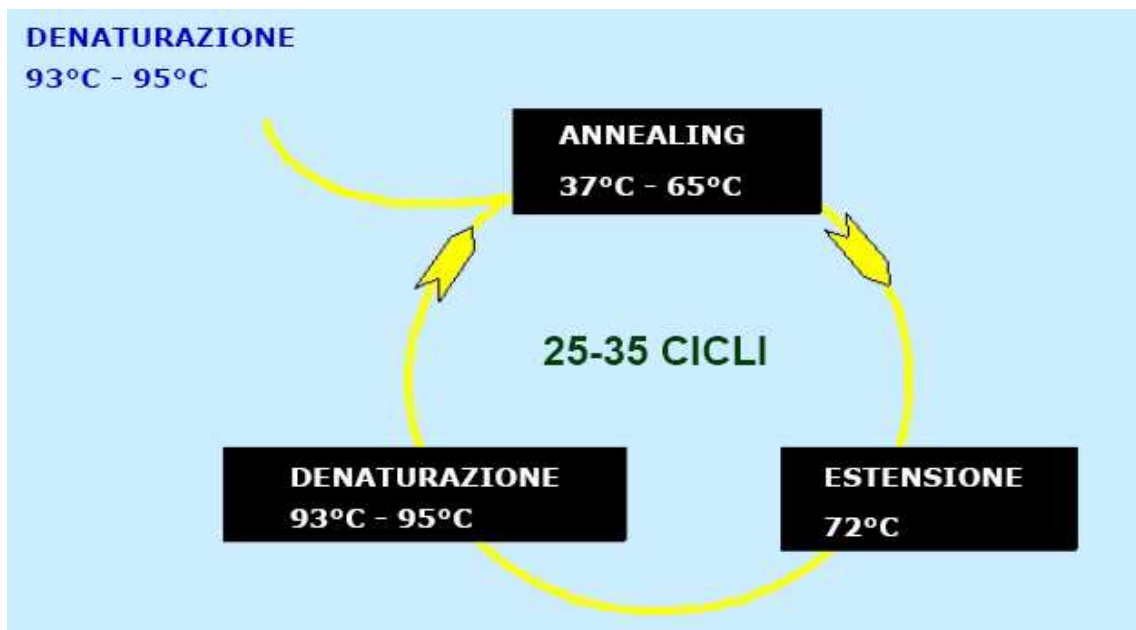
Durante il primo ed ogni successivo ciclo di reazione, l'estensione di ogni oligonucleotide sullo stampo originale produrrà una nuova molecola di ssDNA di lunghezza indefinita. "Questi prodotti lunghi" si accumuleranno in maniera lineare, cioè la loro quantità dopo un numero qualsiasi di cicli sarà linearmente proporzionale allo stesso numero di cicli. I "prodotti lunghi" originati in questo modo

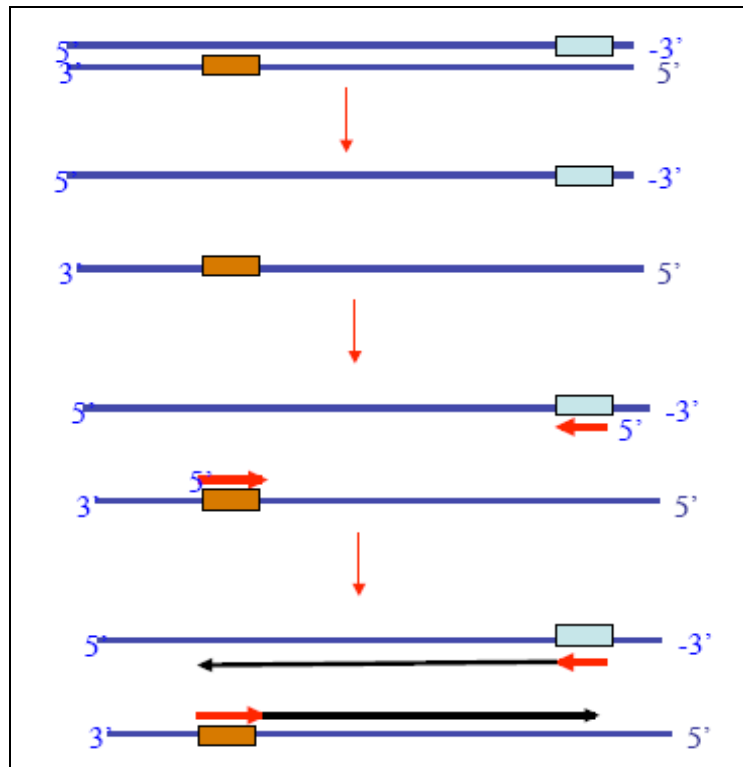
fungeranno da stampi per l'uno o l'altro degli oligonucleotidi durante i cicli successivi, e l'estensione di questi oligonucleotidi dalla polimerasi produrrà molecole di una lunghezza definita, corrispondente a quella della sostanza di interesse. Queste molecole fungeranno anch'esse come stampi per l'uno o per l'altro oligonucleotide producendo altre molecole di grandezza definita. In questo modo si svilupperà una reazione a catena che porterà all'accumulo di uno specifico dsDNA in maniera esponenziale rispetto al numero di cicli di reazione. Il grado di amplificazione finale è dato da $2^{(n-2)}$ dato che i primi due cicli sono nulli.

Il profilo termico della reazione

Denaturazione iniziale: è molto importante che lo stampo di DNA sia completamente denaturato (altrimenti può rinaturarsi inficiando la tappa di annealing dei primers) per cui è buona regola partire con una tappa iniziale di denaturazione di qualche minuto (2 - 5 min).

Primer annealing: la temperatura di annealing viene calcolata in base ad una formula, la sua ottimizzazione avviene tuttavia in maniera empirica. La scelta della temperatura di annealing è il fattore più critico per una buona riuscita della PCR; se troppo alta non si realizza l'annealing, se troppo bassa l'annealing è aspecifico. L'aspecificità di annealing può riguardare l'estremità 3' del/dei primer/s che si ibridizzano consentendone l'allungamento (aspecifico); oppure l'estremità 5' senza coinvolgere l'estremità 3' il che comporta il non allungamento. Se i due primers presentano qualche complementarità di basi (1- 4 basi) alle loro estremità 3' possono, a basse temperature di annealing, appaiarsi tra di loro ed estendersi reciprocamente (primer-dimers)





Gli stadi della PCR

Quali sono i fattori critici per ottenere una buona PCR?

Il modo migliore per rispondere a questa domanda è quello di esaminare i componenti della reazione di PCR e di comprendere in che modo essi contribuiscano alla reazione. In teoria ciascun componente (fisico o chimico) della PCR può essere modificato allo scopo di incrementare la specificità o la sensibilità della reazione; è chiaro tuttavia che qualunque singola variazione ha un effetto globale sulla reazione in quanto i singoli "fattori" non sono indipendenti l'uno dall'altro

REAGENTI PER LA PCR:

Template

I risultati migliori si ottengono con frammenti non superiori a 1.5 kb. Il numero di cicli non deve superare la cinquantina, poiché dopo un certo numero di cicli l'amplificazione non è più esponenziale ma raggiunge un plateau dovuto a:

1. carenza di oligonucleotidi,
2. carenza di dNTP,
3. aumento di PPI,
4. comparsa di DNA parassita amplificato.

Se la sequenza è ricca di GC si aggiunge DMSO (Dimetil-solfossido) e si usa la 7-aza-dGTP al posto del dGTP, ponendo attenzione che questo non inibisca la DNA polimerasi.

Il template può essere:

1. Omogeneo (plasmide purificato) ogni molecola è identica e rappresenta la sequenza da amplificare, il vantaggio è che poche molecole bastano a garantire l'amplificazione
2. Eterogeneo (mix di diverse molecole di DNA, come il DNA genomico, sospensione cellulari o materiale biologico), si deve usare molto DNA per avere un minimo sufficiente per garantire l'amplificazione.

Anche la purezza e il materiale di partenza contano: l'enzima può subire o meno impedimento sterico per raggiungere il template. In questi casi si introducono accorgimenti particolari atti a minimizzare il disturbo, in generale bisogna evitare tutti i contaminanti chimici che non permettano l'attività polimerasica efficace: EDTA chela il Mg^{++} , indispensabile per le polimerasi; gli ac.forti, i sali che potrebbero fare complessi nel sito attivo dell'enzima e inibirlo e, in linea teorica tutte le sostanze che

interferiscono con l'attività enzimatica (sono tutte scritte sulla boccettina di enzima) se fra i non desiderati c'è qualcosa che è stato usato per separare il DNA, andrà eliminato sicuramente.

Precursori (dNTP)

Devono essere bilanciati, perché se ce n'è uno in concentrazione limitanti l'enzima o incorpora qualcos'altro o si ferma. Sono importanti anche la lunghezza: 500 bp necessitano di una concentrazione di dNTP minore di una sequenza di 5000 bp, così come di n° di cicli di reazione. Negli ultimi cicli la quantità di template polimerizzata è molto elevata.

Oligonucleotidi

Prodotti in vitro per sintesi chimica, non sono ammesse preparazioni non pure per quanto riguarda la composizione in basi, o l'amplificazione non sarà specifica. Questo significa anche limitarsi ad un range di dimensioni da 18 a 30 nt, dopodiché il rischio di non precisione e il costo li rende non adatti per la PCR. Non devono essere limitanti ma non devono essere nemmeno in eccesso (aumenta il rischio di dimerizzazione). La coppia di oligonucleotidi deve avere temperature di denaturazione simili ($T_{m1} \sim T_{m2}$).

Temperatura di melting o denaturazione (T_m)

Più la T_m (temperatura di fusione per la denaturazione del DNA) è alta e più aumenta la probabilità che gli oligonucleotidi si appaiano specificatamente (completamente omologhi al template).

La T_m si calcola con formule empiriche: ad una costante fissa viene aggiunto un contributo positivo che deriva dalla ricchezza in GC dell'oligonucleotide (maggior contributo alla stabilità) e si aggiunge un contributo negativo: oligonucleotidi molto corti hanno in proporzione meno interazioni fra le basi e quindi tenderanno a staccarsi dal template a temperature più basse.

Non deve verificarsi self annealing: i due oligonucleotidi non devono appaiarsi fra loro, altrimenti la loro concentrazione effettiva nella miscela di reazione si abbassa notevolmente.

La sequenza non deve permettere formazioni di stem loop.

L'appaiamento col template deve essere stabile, quindi si valutano:

1. Il grado di purezza delle preparazioni (i detergenti destabilizzano l'annealing)
2. La temperatura di annealing

Mg⁺⁺

Non deve essere limitante: tutto ciò che metabolizza polimeri di nucleotidi necessita di Mg⁺⁺.

Se è largamente eccedente determina inaccuratezza, aumentando la frequenza degli appaiamenti degli oligonucleotidi con sequenze non omologhe: le 2 cariche positive possono interagire con i fosfati e dare stabilità all'appaiamento. La [Mg⁺⁺] ottimale si determina tenendo conto che può essere legato sui fosfati di DNAs, Oligonucleotidi e dNTP

Attrezzature

Oggi esistono termociclatori (thermalcycler) automatizzati che permettono di impostare il ciclo e tutti i cambi di temperatura sono automatizzati.

Il thermocycler deve:

- mantenere accuratamente e riproducibilmente le tre diverse temperature di incubazione della PCR,
- cambiare da una temperatura all'altra in un tempo definito (ramping) e con variazioni continue;
- ripetere i tre cicli in maniera riproducibile.

Ogni strumento ha delle caratteristiche specifiche che dobbiamo conoscere, è meglio quindi che in un laboratorio ci siano termociclatori dello stesso modello.

I tubi di reazione: ne esistono di vario tipo per volume e spessore della parete, il che influisce sulla velocità con cui il calore è trasferito dal thermocycler alla miscela di reazione. È conveniente usare sempre lo stesso tipo di provette per tenere costante l'inerzia termica della provetta.

Se una PCR è allestita in condizioni non ottimali può succedere che uno degli oligonucleotidi si appai in una zona non desiderata. L'appaiamento scorretto porta ad un abbondante presenza di un amplificato di dimensioni scorrette.

Il principale problema della tecnica di PCR è la contaminazione da prodotti di amplificazioni precedenti che può causare amplificazione di DNA parassita (falsi positivi). Le precauzioni utilizzabili per ridurre la possibilità di contaminazione sono:

- PCR in stanze separate dalle altre operazioni, vetreria dedicata solo a PCR, massima sterilità.
- Hot Star PCR: Ovvero PCR con partenza a caldo, si tratta di aggiungere la Taq velocemente subito dopo il primo lungo step di denaturazione. Lo stratagemma ha lo scopo di aumentare la specificità dell'annealing elongato.
- Nested PCR: Si tratta di realizzare due PCR successive utilizzando coppie di primers differenti, con la seconda che inquadra una sequenza inclusa in quella amplificata dalla prima coppia. Se la prima amplificazione è artefattuale, nella seconda i primers non si appaieranno. In questo modo si ha un aumento della specificità e del tasso di amplificazione.
- Amplificazione utilizzando dUTP(desossi-Uridintrifosfato) anziché dTTP (desossi-Timidintrifosfato).
- Dopo l'amplificazione lavaggio della provetta con UNG (Uracil-N-Glicosilasi) che viene denaturato con esposizione a calore.

ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI DA CAMPIONI BIOLOGICI

E' il primo step nelle procedure di biologia molecolare: esistono molti metodi la cui scelta varia a seconda di molte variabili, come:

- Tipo di acido nucleico (ssDNA, dsDNA, RNA)
- Fonte (animali, vegetali, procarioti, virus)
- Materiale di partenza (coltura cellulare, organo, sangue)
- Risultato desiderato (quantità, purezza, tempo richiesto)
- Applicazione (PCR, Southern blotting)

Richiede 3 step: 1) Lisi della cellula; 2) Denaturazione e separazione delle proteine; 3) Precipitazione degli acidi nucleici

1) lisi cellulare

La procedura di lisi cellulare deve essere un compromesso:

- abbastanza aggressiva da frammentare il materiale di partenza
- abbastanza gentile da preservare l'integrità degli acidi nucleici

Le tecniche comuni di lisi includono:

- lisi osmotica con sostanze ipotoniche
- lisi chimica
- digestione enzimatica

2) Denaturazione e separazione delle proteine:

Trattamento con un enzima proteolitico ed estrazione con solventi organici (fenolo/cloroformio): prima fenolo che denatura le proteine e le veicola nella interfaccia tra le due fasi, poi cloroformio, che elimina le tracce di fenolo dalla fase acquosa ed appesantisce la fase organica. In ultimo, precipitazione delle proteine utilizzando sali ad elevata concentrazione (salting-out)

3) Precipitazione degli acidi nucleici dalla fase acquosa:

La precipitazione degli acidi nucleici si ottiene usando varie combinazioni di sali ed alcool. I sali si complessano con gli acidi nucleici, riducendone fortemente la solubilità. Questa fase è temperatura dipendente: soprattutto per l'RNA è necessaria una lunga pre-incubazione a -80°C. Se la concentrazione di acido nucleico è bassa, un carrier inerte (es. tRNA, glicogeno) può essere aggiunto per migliorare la resa

INFLUENZANO LA RESA DI UNA PCR

- scelta dei primer, contaminazioni da DNA esogeno = *SPECIFICITÀ ANALITICA*

Per questo si ricorre al controllo POSITIVO (efficienza dei reagenti)

- presenza di inibitori = *SENSIBILITÀ ANALITICA*

Per questo si ricorre al controllo NEGATIVO (per evidenziare eventuali Falsi Positivi)

- Controllo positivo
 - ~100-200 ng di DNA stampo
 - ~10-50 pmol di ciascun primer
- Controllo negativo

- Tubo contenente tutti i componenti della PCR, tranne il template
- Test per le contaminazioni

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione

La visualizzazione dei DNA/prodotti di amplificazione avviene mediante elettroforesi su gel di agarosio che permette di valutare la presenza, la lunghezza del prodotto PCR in base al confronto con bande di migrazione a lunghezza nota.

Il gel è contenuto in una cella elettroforetica. Nella cella è presente una soluzione elettrolitica che favorisce il passaggio di corrente elettrica quando è collegata ad un alimentatore. Il voltaggio è calcolato sulla base della lunghezza del gel (5 V/cm). Il DNA estratto o i frammenti amplificati (gli acidi nucleici in soluzione hanno carica negativa per la presenza dei gruppi fosfati) migrano dal polo negativo verso il polo positivo con velocità differente in funzione di:

- Dimensione dei frammenti di DNA
- Concentrazione di agarosio nel gel
- Voltaggio applicato ai due poli della cella elettroforetica



Cella elettroforetica orizzontale

Il DNA è visualizzato mediante radiazioni ultraviolette, l'apparecchio di emissione è il transilluminatore. In fase di polimerizzazione del gel è aggiunto un agente intercalante le basi azotate (bromuro di etidio). Il bromuro di etidio reagisce emettendo fluorescenza quando esposto ai raggi UV e consente la visualizzazione delle bande di DNA.

Marker / ladder

Sono frammenti di DNA a concentrazione (marker)/lunghezza (ladder) nota, consentono per analogia di stabilire rispettivamente la concentrazione ed il numero di paia di basi dei frammenti amplificati.

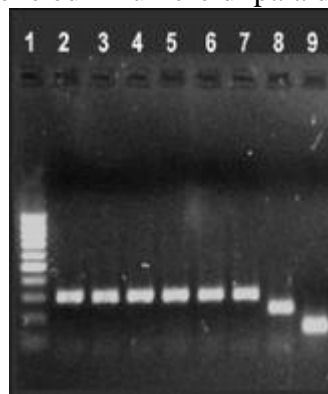


Immagine di gel di agarosio mediante transilluminatore:

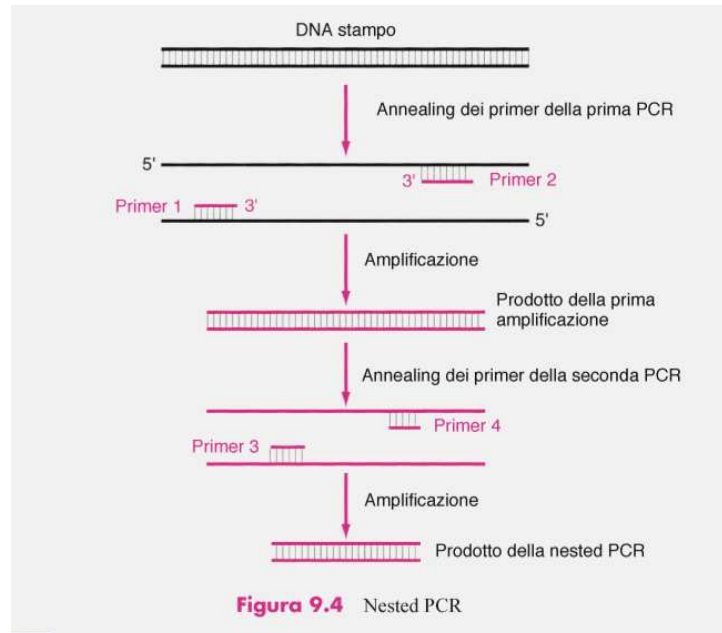
Lane 1: ladder - Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: frammenti di DNA amplificati

VARIAZIONI DELLA PCR TRADIZIONALE

Nested PCR

Il prodotto di una prima reazione di PCR è usato da stampo per una seconda reazione in cui si usano

primer che si appaiano più internamente rispetto alla coppia di primer iniziale. I nuovi primers sono identici ai precedenti, ma con l'aggiunta di una base interna. La nested PCR permette di aumentare la specificità (e/o sensibilità) della reazione di PCR. Nella nested PCR una aliquota della reazione originale è utilizzata come stampo per una seconda reazione (nested) partendo da una coppia di primer complementari a regioni presenti all'interno del primo prodotto amplificato. Se il prodotto della prima reazione fosse aspecifico, nella seconda reazione è improbabile che questo possa essere amplificato.



Multiplex PCR

Amplificazione contemporanea nella stessa provetta di molti frammenti di lunghezze diversa (es. esoni all'interno dello stesso gene-malattia) grazie all'utilizzo di diverse coppie di primers, che devono avere T_m simili. Talvolta si può scegliere di aumentare la concentrazione di agarosio per aumentare il potere risolutivo.

Long-PCR

La Taq polimerasi è priva di attività proofreading ed incorpora, in media, una base sbagliata ogni 10000 sintetizzate ($1,1 \times 10^{-4}$). Esistono in commercio DNA polimerasi termostabili, con attività proofreading e con tassi di errore più bassi che permettono di amplificare frammenti lunghi fino a 40 kB

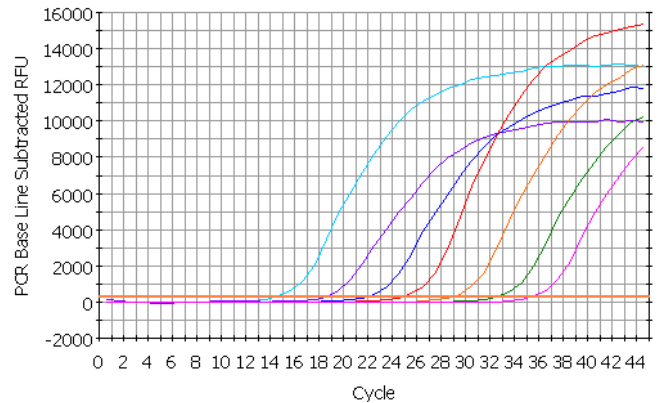
PCR quantitativa

Sfrutta la proprietà per cui l'amplificato è proporzionale alla dose genica. L'analisi viene fatta nella fase esponenziale: la PCR viene interrotta al 22° ciclo. A questo livello il segnale dell'amplificato è molto basso e sarà potenziato da un sistema rivelatore: l'utilizzo di un dNTP marcato con radioattivo. Dopo la PCR si fa un elettroforesi su agarosio con Etidio Bromuro, poi si esegue un'autoradiografia. Insieme ai primers per il prodotto genico incognito, si coamplifica in duplex sullo stesso template anche un prodotto a dose genica nota, che servirà come riferimento nell'autoradiografia. La sua intensità di segnale verrà letta da un computer e identificata come R1. Poi il computer valuterà l'intensità del segnale del prodotto genico incognito e lo identificherà come R2. Il rapporto tra R2/R1 si chiamerà D, ed è l'indice diagnostico. Se $D=1$ il soggetto ha due copie geniche (2 alleli: sano); se $D=0,5$ il soggetto avrà una sola copia genica (1 allele: delezione); se $D=1,5$ il soggetto avrà tre copie geniche (3 alleli: duplicazione).

Talvolta si utilizza come metodica di rivelazione l'elettroforesi capillare, che produce un cromatogramma con picchi di altezza diversa. In tal caso si parla di PCR semiquantitativa.

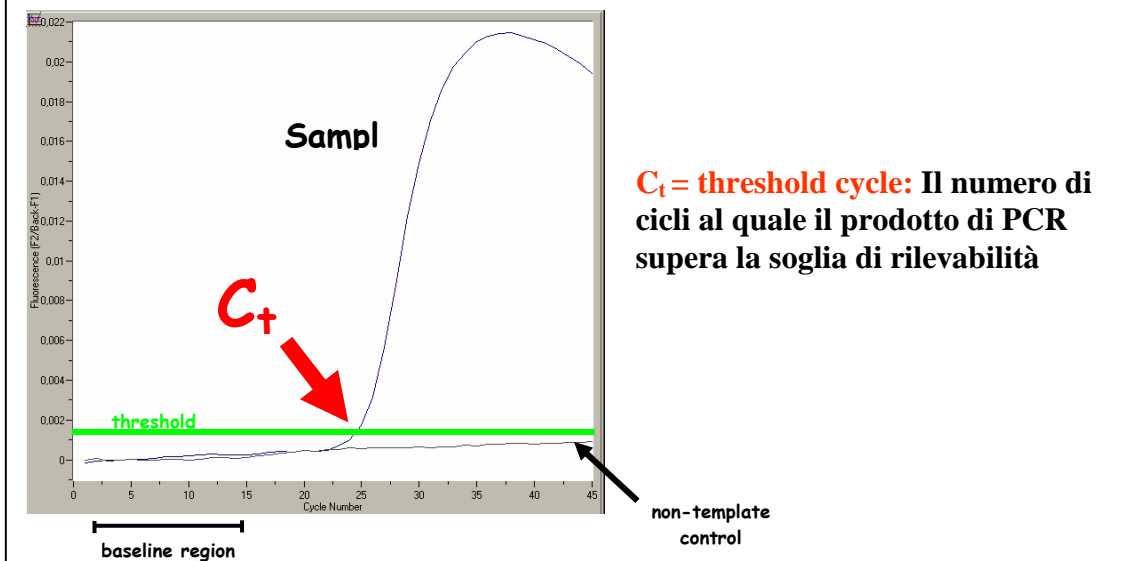
Real Time PCR

E' un metodo cinetico per valutare la concentrazione di DNA prodotto mentre la reazione avviene. Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. Con la PCR classica, il dosaggio dei prodotti viene effettuato in fase 3, e quindi offre una valutazione poco attendibile. Con la RT-PCR, invece, la valutazione è fatta in fase 1, ovvero al punto di flesso tra la fase iniziale e la fase esponenziale; la macchina registra ad ogni ciclo la variazione di fluorescenza al punto di flesso. Ad ogni registrazione la soluzione viene diluita di 10 volte: il segnale comincia a comparire sempre più tardi. Viene stabilita in base a standard di riferimento una soglia al flesso, che rappresenta il flesso tra la fase esponenziale e il rumore di fondo: al di sopra di essa il segnale diventa significativo. Ogni campione avrà una propria soglia ad ogni ciclo, a seconda della quantità di bersaglio. Se due campioni hanno la stessa soglia allo stesso ciclo, vuol dire che hanno la stessa quantità di bersaglio. Lo standard della Real Time PCR non può essere messo nello stesso tubo di reazione, perché la macchina non è in grado di fare multiplex. Quindi di allestiscono più tubi di reazione con il gene di riferimento e il gene incognito, poi in un tubo saranno inseriti i primers per il gene di riferimento, in un altro quelli per il gene in analisi. Inoltre lo standard deve essere a dose genica nota. Il tipo di rivelazione è la fluorescenza e il metodo può essere diretto (quando c'è la doppia elica) o indiretto (singola elica)

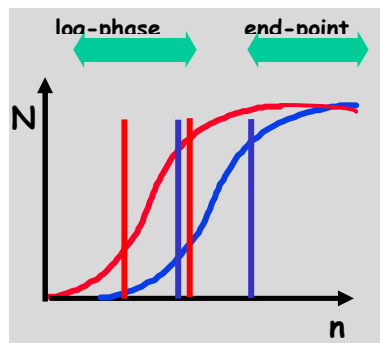


Principio base della Real-Time PCR

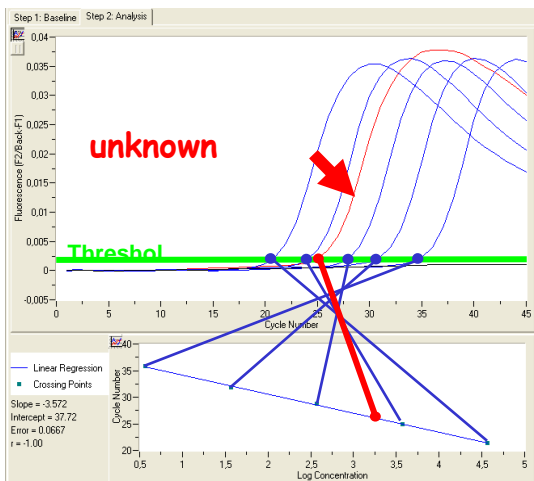
Si determina *QUANDO* viene generato il segnale piuttosto che l'intensità del segnale stesso (analisi all'end-point)



La quantificazione nella PCR Real-Time



- █ Alta concentrazione
- █ Bassa concentrazione
- N:** numero delle molecole amplificate
- n:** numero dei cicli di amplificazione



La quantità iniziale di DNA è inversamente proporzionale al numero di cicli necessario per la rivelazione (Ciclo soglia, Ct)

Amplificando quantità note dello stesso template, le quantità ignote si ricavano per interpolazione dalla curva standard.

Evidenziazione diretta dei prodotti di Real Time PCR

Si utilizza un fluoroforo che emette luce solo quando complessato al dsDNA. Aumentando la quantità di dsDNA prodotto ad ogni ciclo si osserva un segnale di fluorescenza maggiore.

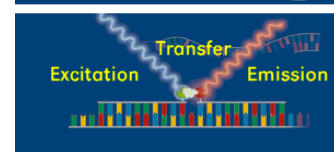
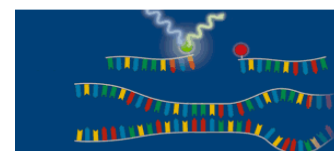
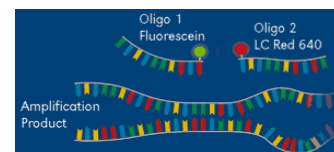
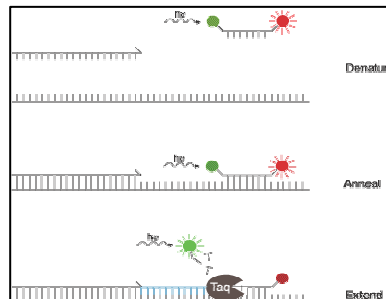
Sistema TAQMAN (indiretto)

- Basata su un oligo interno al prodotto di PCR marcato con due pigmenti fluorescenti
- Degradazione dell'oligo proporzionale al prodotto di amplificazione
- Emissione della fluorescenza nel corso della fase di sintesi

SONDE TAQMAN: Si ibridano con il prodotto di amplificazione e hanno una estremità 3' bloccata (non può essere allungata dalla Polimerasi). La sonda ha due domini fluorescenti

- Q = Quencher (può anche non essere fluorescente) - R = Reporter (sempre fluorescente)

Il Reporter emette fluorescenza, ma quando la Sonda è integra e legata al ssDNA stampo, il Quencher assorbe la fluorescenza del Reporter, e quindi non viene emesso nessun segnale. Quando arriva la polimerasi, con la sua attività Esonucleasica 5'-3' degrada la sonda, liberando in soluzione il Reporter, che si allontana quindi dal Quencher ed emette fluorescenza. Pertanto la Fluorescenza viene letta nella fase di sintesi



Sistema LIGHTCYCLER (indiretto)

- Basata su due oligo interni al prodotto di PCR marcati con due pigmenti fluorescenti
- Appaiamento degli oligo in tandem proporzionale al prodotto di amplificazione
- Emissione di fluorescenza misurata nella fase di annealing

Quando il template è dsDNA, i due oligo sono liberi in soluzione e non emettono fluorescenza. Lo stesso avviene quando il template è ssDNA. Soltanto alla temperatura di annealing i due oligo si appaiano in tandem alla regione complementare del template, e questo porta i due fluorofori ad essere vicini e ad emettere fluorescenza. Il segnale viene emesso in questa fase.

Analisi qualitativa

- Identifica specifici prodotti di PCR
- Identifica mutazioni mediante l'analisi della curva di melting

Analisi quantitativa

- Quantizza prodotti di PCR in real-time

Interpretazione dei risultati

- **Rn (normalized reporter)**: Intensità della fluorescenza emessa dal fluorocromo normalizzata in rapporto alla fluorescenza emessa da un reference passivo presente nel campione
- **Rn+** : Rn a un determinato ciclo in una reazione contenente il DNA stampo
- **Rn-** : Rn ai cicli iniziali, prima di incrementi significativi della fluorescenza

Sistema SYBR GREEN (diretto)

- Basata sull'utilizzo di un colorante fluorescente intercalante, il Sybr green
- Quantità del colorante nel dsDNA proporzionale al prodotto di amplificazione
- Emissione di fluorescenza misurata nella fase di rinaturazione

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

La RT-PCR presuppone la retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA. La maggior parte del DNA genomico non è espresso in RNA. Migliori informazioni sulla funzione di un gene possono essere ottenute dall'analisi del prodotto di quel gene. Il DNA retrotrascritto deriva principalmente da sequenze che codificano per proteine. Quindi il DNA complementare (cDNA) all'mRNA è utile per studiare la funzione genica. Per copiare l'mRNA nel DNA complementare (cDNA) si usa l'enzima trascrittasi inversa. Una DNA polimerasi copia poi il cDNA formando un DNA duplex.

Perché analizzare l'RNA?

- Perché è un indicatore dell'attività cellulare
- rRNA indica l'attività generale della cellula
- mRNA legato a espressione genica/sintesi proteica

Tuttavia, lavorare con l'RNA è difficile sia per la sua alta suscettibilità alle RNasi cellulari, sia perché non può essere amplificato in quanto tale. Per questo motivo si ricorre ad una Reverse Transcriptase PCR, che comporta la retrotrascrizione di RNA in DNA e la sua amplificazione con una PCR

Applicazioni dell'RT-PCR

- Clonaggio
- Analisi qualitativa
 - Diagnosi di infezioni virali
 - Presenza di trascritti aberranti
 - Identificazione di mutazioni
 - Valutazione della dimensione
 - Splicing alternativi
- Analisi quantitativa
 - Diagnosi di infezioni virali
 - Presenza di trascritti aberranti
 - Presenza/assenza di trascritti specifici
 - Valutazione dei livelli di espressione di specifici geni in specifici tessuti

Steps per l'RT-PCR

- ❖ Isolamento/purificazione dell'RNA
- ❖ Trascrizione inversa
- ❖ Amplificazione del cDNA

SOUTHERN BLOTTING

Si usa in genere per evidenziare alterazioni grossolane a carico di determinate regioni di DNA. La regione può essere un singolo gene, o una parte di un DNA più grande, quale un genoma virale.

- Identifica mutazioni, delezioni e altri riarrangiamenti genici
- Può essere usato per diagnosi di malattie genetiche
- Nelle leucemie da traslocazione
- Nella diagnosi di infezione da HIV e di altre malattie infettive

Il metodo si basa sull'ibridizzazione (l'ibridizzazione è l'appaiamento che si verifica tra due molecole autocomplementari di acido nucleico a singola elica - la sonda e il gene target)

Sono due le caratteristiche importanti dell'ibridizzazione:

- La reazione è specifica - la sonda lega solo la sequenza target complementare
- La sonda è in grado di trovare una molecola di target in una miscela di milioni di sequenze simili ma non complementari

Steps per Southern Blotting

1. Digestione del DNA con enzimi di restrizione
2. Separazione dei frammenti di restrizione mediante elettroforesi
3. Denaturazione del DNA
4. Trasferimento su filtro di nitrocellulosa
5. Preibridazione
6. Ibridizzazione con un eccesso di sonda
7. Eliminazione della sonda in eccesso
8. Autoradiografia

Reverse DOT BLOT

La tecnica prevede una Multiplex-PCR (di diverse regioni del gene), incorporando nei primers dei nucleotidi coniugati con biotina. In seguito si passa ad ibridare i frammenti amplificati con sonde complementari alla sequenza Wild-Type o mutata. In questo modo ci sarà appaiamento selettivo (o solo sonda mutata o solo wild-type) con il DNA del propositus; queste sonde hanno al 5' un gruppo amminico, in modo tale da aderire ad una membrana di nitrocellulosa (con carica negativa).

Su questa membrana, sfruttando la biotina, si fa avvenire una reazione colorimetrica (biotina+streptavidina+fosfatasi alcalina+substrato cromogeno).

MICROARRAY

Un DNA microarray (comunemente conosciuto come *gene chip*, *DNA chip*, o *biochip*) è costituito da una collezione di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o *chip* silicici formanti un array. Tali array sono usati per esaminare il profilo d'espressione di un gene o per identificare la presenza di un gene o di una breve sequenza in miscela di migliaia (spesso anche tutto il patrimonio genetico di un individuo umano o non). I microarray sfruttano una tecnica di ibridazione inversa, consiste cioè nel fissare tutti i probe su un supporto e nel marcare invece l'acido nucleico target. È una tecnica che è stata sviluppata negli anni '90, oggi permette l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni. Per studiare gli mRNA, essi vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA (DNA copy), con l'uso di un enzima chiamato transcriptasi inversa e allo stesso momento marcati con una sonda fluorescente. Quando si fa avvenire l'ibridazione fra la sonda presente sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimarrà legato alla sonda e può essere identificato semplicemente rilevando la posizione dove è rimasto legato. Le principali applicazioni dei microarray sono l'analisi dei polimorfismi SNP, il confronto di popolazioni di RNA di cellule diverse e l'utilizzo per nuove metodologie di sequenziamento del DNA, nonché per lo screening di sequenze senso e antisenso nella ricerca degli oligonucleotidi usati in campo farmaceutico.

Il segmento di DNA legato al supporto solido è noto come probe. Migliaia di probe sono usati contemporaneamente in un array, l'ipotetica mutazione puntiforme si trova alla fine dell'appaiamento

della sonda con il DNA. La sonda costituisce quindi una sorta di innesco per una polimerasi che inserisce una sola BASE in corrispondenza del nucleotide in analisi. I nucleotidi inseriti nella miscela sono marcati con 4 diversi fluorocromi. Dalla fluorescenza emessa dalla base inserita si risale per complementarità alla base presente sul DNA in quel sito. In caso di eterozigoti, si avranno due segnali diversi di fluorescenza. Questa tecnologia è nata da una tecnica più semplice (Southern blotting), dove frammenti di DNA attaccati ad un substrato sono testati da sonde geniche aventi sequenze conosciute. La misura dell'espressione genica mediante microarrays ha un notevole interesse sia nel campo della ricerca di base che nella diagnostica medica, in particolare di malattie a base genetica, dove l'espressione genetica di cellule sane viene comparata con quella di cellule affette dalla malattia in esame.

SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento del DNA serve a stabilire, con precisione, l'ordine delle basi in un frammento di informazione genetica. Conoscere l'esatta sequenza delle basi è di fondamentale importanza per tutti i modelli di ricerca in biologia molecolare poiché rende possibile stabilire la presenza di mutazioni, la struttura primaria dei geni, la localizzazione di specifici elementi (promotori, terminatori, sequenze satelliti) e via dicendo.

Qualsiasi processo di sequenziamento si compone di diverse fasi:

1. preparazione DNA stampo, sequenziamento con marcatura --> serie di frammenti con un'estremità fissa e una variabile,
2. separazione (elettroforesi ad alta risoluzione in condizioni denaturanti),
3. rilevazione frammenti di DNA,
4. lettura della sequenza.

1ª REAZIONE - SEQUENZA E MARCATURA:

Consente di ottenere un set di frammenti, marcati solo su una delle 2 eliche, che hanno una loro estremità uguale, e l'altra estremità variabile di un solo nucleotide (tra un frammento e l'altro c'è solo una base di differenza). Per separare questo frammento si usa o elettroforesi su gel o elettroforesi capillare: i frammenti devono migrare solo in base al peso molecolare. Nell'ultima fase di lettura, abbiamo metodi come l'autoradiografia (marcatura radiattiva), o la reazione con i fluorocromi (marcatura a fluorescenza).

Due metodi: chimico (Maxam e Gilbert) e enzimatico (Sanger, dei terminatori di catena o dei dideoxi) entrambi messi a punto nel 1977. Il chimico è più laborioso e meno automatizzabile, l'enzimatico è stato ottimizzato negli anni.

Lo schema generale di una reazione di sequenza (per entrambi i metodi) parte da un campione ds di DNA, si fa in modo di ottenere dei campioni ss che hanno un'estremità fissa, da questo si ottengono 4 sottocampioni, ciascuno dei quali è un mix di oligo che terminano con un nucleotide preciso: un sottocampione terminerà con Citosina, uno con Guanina, uno con Timidina, uno con Adenina.

METODO enzimatico di SANGER.

I vantaggi del metodo enzimatico rispetto al chimico hanno fatto sì che questo metodo si sviluppasse sempre più, permettendo oggi anche il sequenziamento passivo di interi genomi.

Per far avvenire la reazione si usa un'enzima, la DNAPol. Si parte dal campione a doppia elica, si utilizza un piccolo (20 bp) nucleotide che viene usato da primer: l'innesco è necessario per far partire la DNAPol e iniziare la reazione di polimerizzazione. Le DNAPol sintetizzano nella direzione 5' -->3', il primer dovrà, quindi, avere un'estremità 3'-OH libera che sarà quella da cui partirà la polimerizzazione. Nella mix di reazione si pongono diversi dNTP, che consentono di sintetizzare il nuovo filamento. Il primer deve avere estremità 3'-OH libera perché nel corso della polimerizzazione i nucleotidi vengono aggiunti all'estremità 3'-OH del nucleotide precedentemente inserito. Per far sì che la reazione di polimerizzazione si interrompa in punti precisi si suddivide il campione in quattro sottocampioni e in ognuno di questi si aggiungono nella mix di reazione anche dei dideossinucleotiditri-fosfato (ddNTP) ovvero i terminatori di catena. Questi non presentano il gruppo OH sul C3' ribosio, quindi una volta inseriti sul filamento nascente bloccano la reazione della polimerasi, e la reazione si bloccherà in corrispondenza del ddNTP inserito. La concentrazione dei ddNTP sarà tale che non in tutti i punti questi

vengono inseriti, come nel caso del metodo chimico: la reazione deve essere parziale. Il risultato sarà sempre quello di avere un mix di nucleotidi che terminano in tutte le posizioni in cui sullo stampo era presente una T (o una A, G, C). Contemporaneamente a questa reazione si farà avvenire anche la reazione di marcatura. Per il metodo chimico si utilizza solo la marcatura radioattiva, per quello enzimatico funziona anche la marcatura a fluorescenza.

	Vantaggi	Svantaggi
Metodo Chimico	<ul style="list-style-type: none"> - Non ci sono interferenze da parte di alcune strutture secondarie che si possono formare sul DNA da sequenziare; - Non è necessario utilizzare un innesco (primer); - Consente di sequenziare anche oligo piuttosto piccoli. - È più accurato 	<ul style="list-style-type: none"> - È molto laborioso (doppio trattamento per ogni sottocampione); - Difficoltà nell'automatizzazione; - Bassa risoluzione. - Reagenti tossici - Richiesta maggior quantità di DNA.
Metodo Enzimatico	<ul style="list-style-type: none"> - Ogni sottocampione è trattato una volta sola, quindi essendo meno laborioso è anche più rapido; - Più facilmente automatizzabile; - Si possono esaminare più campioni contemporaneamente; - Miglior risoluzione. - Minori richiesta di DNA 	<ul style="list-style-type: none"> - La polimerasi, nel caso in cui dovesse incontrare strutture 2arie (forcine) si blocca e si può staccare dallo stampo. Questo causa degli oligo con estremità non deossi (falsi stop) e causano la lettura di una base inesistente. - Subcloning in vettori - Accuratezza legata all'enzima utilizzato

Sequenziamento manuale del DNA

I primi esperimenti di sequenziamento erano effettuati con l'ausilio di tecniche esclusivamente manuali. L'idea di base era semplice e, allo stesso tempo, efficace. Il DNA estratto veniva clonato più volte ed inserito in quattro provette differenti. In ognuna di queste provette vengono inserite i nucleotidi deossitriofosfato ed una aliquota di nucleotidi dideossitriofosfato che, rispetto ai primi, mancano di un ossigeno nello zucchero pentoso. Inoltre viene inserito una molecola marcata mediante la quale è possibile tenere traccia della sequenza. La polimerasi allunga la catena usando i nucleotidi deossitriofosfato e, casualmente, aggiunge un nucleotide deossitriofosfato che fa terminare la catena poiché la polimerasi non è capace di procedere ulteriormente. L'inserzione è di tipo casuale per cui, in ogni tubo, si formano una serie di frammenti più o meno allungati che possono essere distribuiti in base alla loro dimensione mediante corsa elettroforetica su un gel particolarmente sensibile. Le lastre vengono quindi "fotografate" e i punti di radioattività, corrispondenti ai vari segmenti, vengono individuati grazie a dei punti nella fotografia. Affiancando i quattro risultati è possibile stabilire la sequenza nucleotidica proprio perché ognuna delle quattro corsie corrisponde ad uno specifico nucleotide.

Sequenziamento automatico del DNA

Il sequenziamento manuale del DNA ha un inconveniente: è estremamente lento e necessita di una figura che supervisioni e trasciva la sequenza. Per velocizzare il processo si è perfezionato un sistema di lettura automatico che prevede l'utilizzo di nucleotidi trattati in modo da restituire una determinata lunghezza d'onda quando eccitati da una luce laser. In altre parole ogni base restituisce una specifica lunghezza d'onda che può essere rilevata da appositi strumenti.

Le macchine sequenziatrici possono operare letture estremamente rapide permettendo il sequenziamento di genomi in tempi compatibili con la ricerca scientifica. Inoltre l'utilizzo di sostanze non radioattive elimina ogni potenziale pericolo di contaminazione e rende più semplice il protocollo di sequenziamento.

Pyrosequencing

Il pyrosequencing è una tecnica di sequenziamento del DNA per sintesi a temperatura ambiente in tempo reale. L'incorporazione di ogni nucleotide è monitorata grazie ad una cascata enzimatica altamente sincronizzata che porta alla produzione di un segnale di bioluminescenza a seguito del rilascio di pirofosfato, da cui il nome. La tecnica consente il monitoraggio in tempo reale della sintesi di DNA mediante il rilevamento della bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche, la quale, a sua volta, viene innescata dall'incorporazione di un nucleotide. L'intensità del segnale luminoso è direttamente proporzionale al numero delle basi introdotte dalla polimerasi nel nuovo filamento di DNA che si va formando per estensione del primer di sequenziamento, appaiato al prodotto di amplificazione denaturato.

Il pyrosequencing è già stato usato in svariati programmi di sequenziamento genomico per le sue qualità di rapidità, economicità ed affidabilità su sequenze corte. Una delle caratteristiche peculiari del pyrosequencing sta nel fatto che l'efficienza di sequenziamento è massima nella regione adiacente al primer di sequenziamento mentre si riduce progressivamente a valle del primer stesso e questo è responsabile della lunghezza ridotta delle sequenze ottenibili. Per questo motivo il pyrosequencing non si sostituisce al sequenziamento classico ma ne costituisce una valida e conveniente alternativa in materia di genotipizzazione.

Il pyrosequencing può essere impiegato per il sequenziamento *de novo* di brevi frammenti di DNA, ad esempio in microbiologia per l'identificazione di genotipi o specie microbiche e per l'analisi di sostituzioni nucleotidiche puntiformi sia singole che multiple, anche tetralleliche, inserzioni e delezioni di una o poche basi, con un'elevatissima accuratezza ed un'attendibilità paragonabile a quella del sequenziamento tradizionale. Inoltre, grazie alla sua capacità di fornire dati quantitativi, si propone come l'unico metodo di sequenziamento in grado di determinare le frequenze alleliche, nonché gold standard per l'analisi del grado di metilazione del DNA.

La semplicità e velocità della procedura e la presenza di un sistema intrinseco al software per il controllo di qualità dei dati hanno fatto del pyrosequencing una tecnologia applicabile anche nei laboratori di diagnostica clinica.