

Tecniche-Bio-Mol - prof. aniello francesco

Biologia generale (Università degli Studi di Napoli Federico II)

BIOLOGIA MOLECOLARE

Identificazione e quantificazione degli acidi nucleici

DNA

RNA

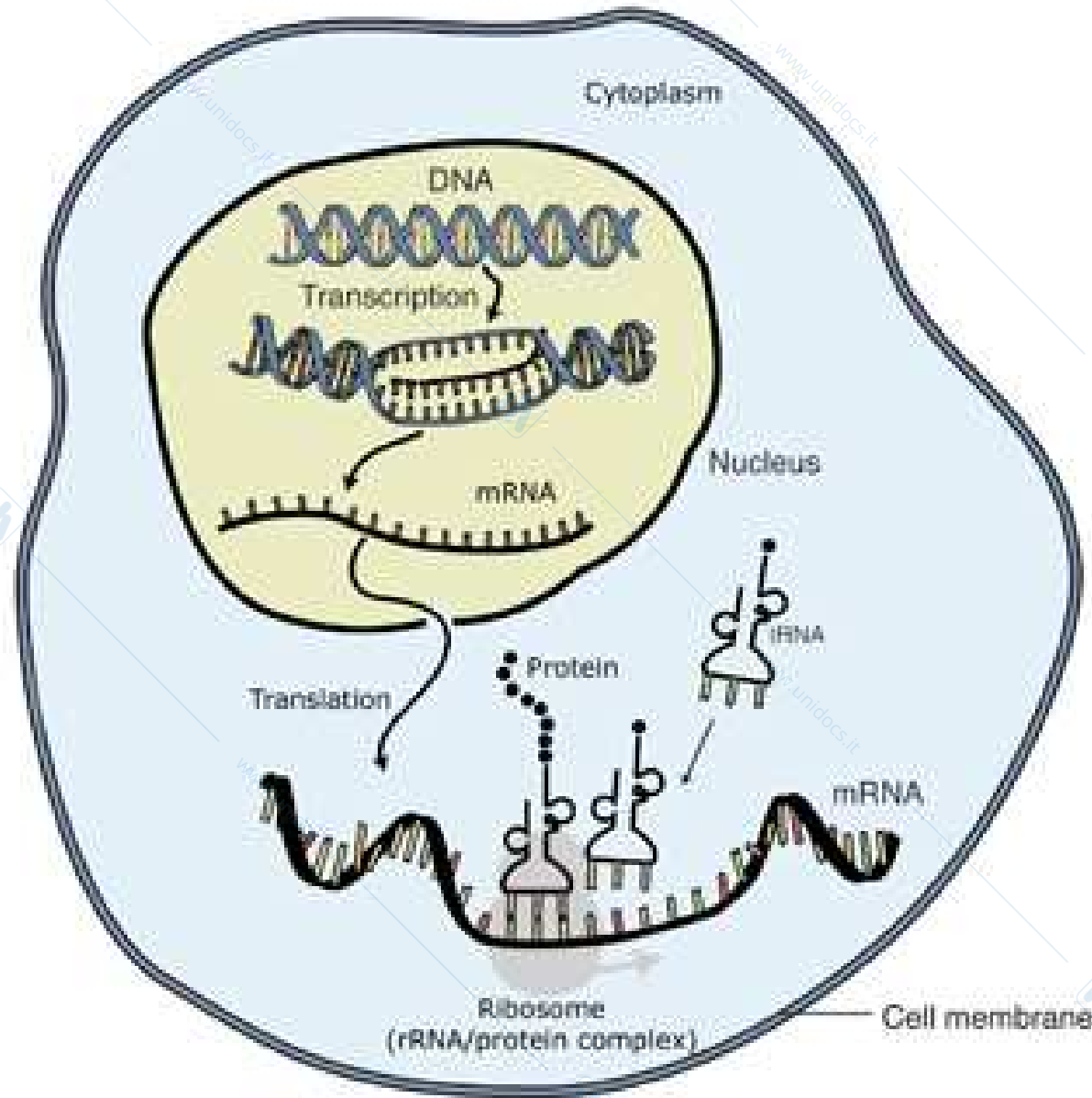


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

DNA genomico

RNA 
→ **totale**
→ **messaggero**

1) OMOGENIZZAZIONE – LISI

Soluzione alcalina concentrata (EDTA-SDS); Guanidina tiocianato per l'RNA

2) DIGESTIONE CON DNase O RNase

3) ESTRAZIONE CON SOLVENTI ORGANICI fenolo, cloroformio, IAA

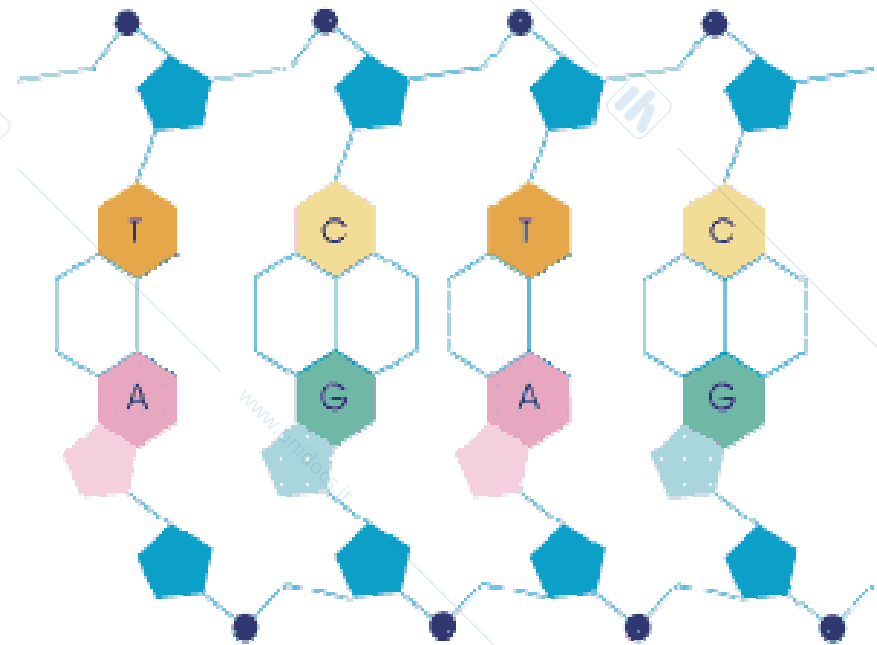
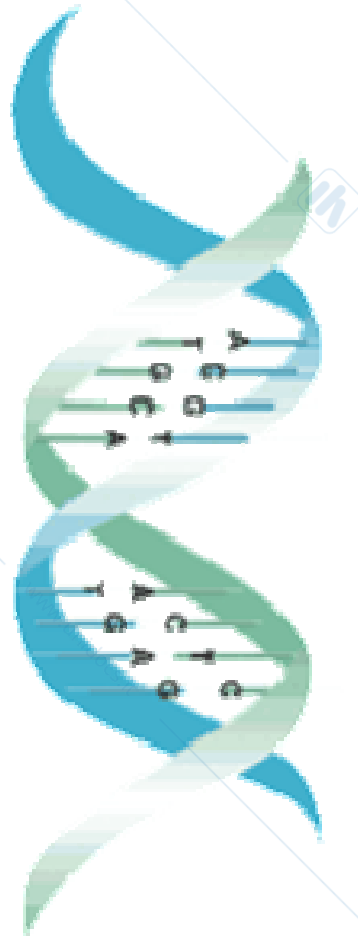
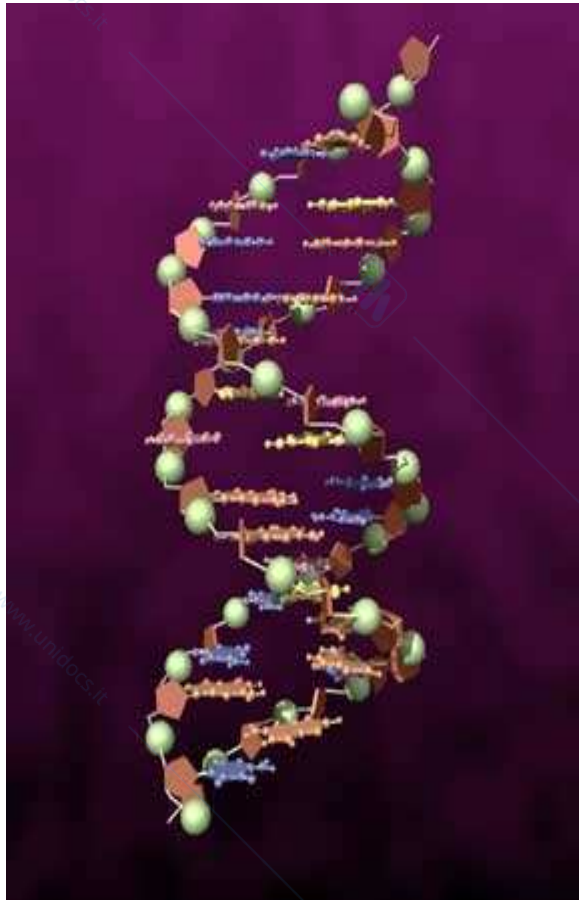
4) PRECIPITAZIONE IN ETANOLO ASSOLUTO

5) CENTRIFUGAZIONE

→ DNA genomico, 5000xg, RT

→ RNA 14000xg, 4°C

DNA genomico



NUCLEOTIDE	
● Fosfato	
■ Desossiribosio	
■ Timina	■ Citosina
■ Adenina	■ Guanina

ANALISI DEL DNA

- estrazione da tessuto – cellule
- purificazione
- **PCR**
- **southern blot**

Polymerase Chain Reaction (PCR)

quando abbiamo materiale da studiare in quantità molto piccola

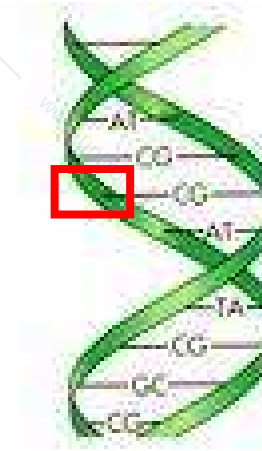
- nella diagnosi di malattie genetiche
- nello studio di mutazioni genetiche che stanno alla base dello sviluppo di tumori
- nello studio di infezioni virali o batteriche

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- DNA template
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq polimerasi
- Primer senso
- Primer antisenso
- Mg^{++}
- H_2O

THERMOCYCLER





P SENSO

5' acgtactgatcacgtgactgac 3'

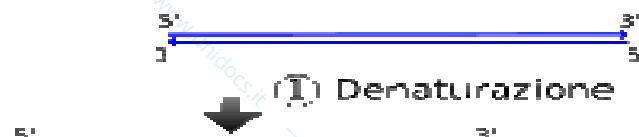
5' acgtgtcatacgtactgatcacgtgactgacctagcttcgactgactgtcaacgtgtcatgactgactcagtac
 tagctagcttcgactgactgtcaacgtgtcatgactgactgcagtcagctagctagcttcgactgactgtcaacg
 tgtcatgactgactgcagtcagctagctagcttcgactgactgtcaacgtgtcatgactgactgcagtcagctag
 ctgcttcgactgactgtcaactgactagctgcgtaacgtacgtactgatcacgtgactgactgctagcgtcacgc 3'

3' tgcatgactagtgactgactg 5'

P ANTISENSO

SCHEMA DI 1 CICLO DI PCR

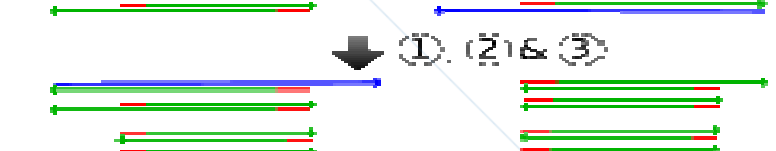
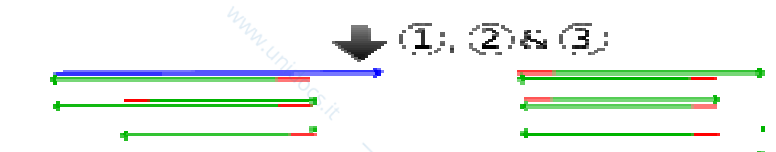
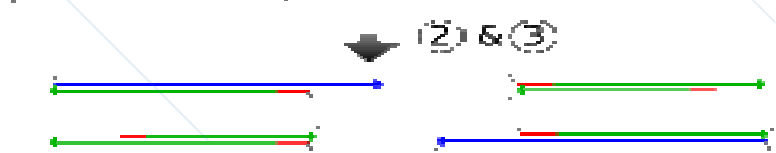
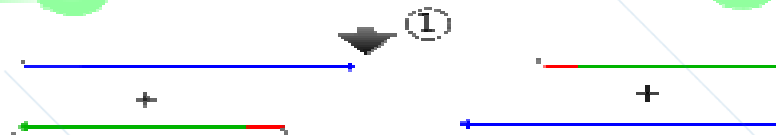
94°C; 5min



30-55°C; 30 sec



65-75°C; 2-3 min

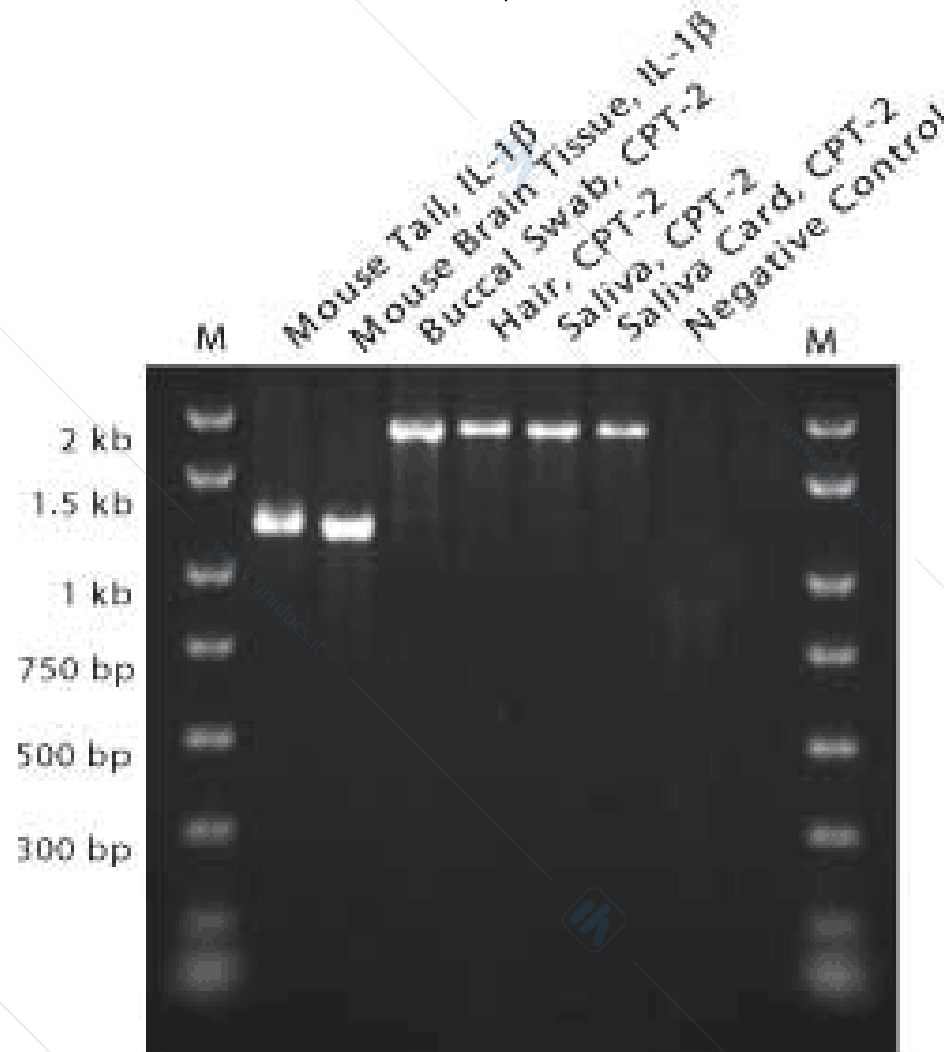


Crescita esponenziale dei segmenti prodotti

PRIMER 1
(ANTISENSO)

PRIMER 2
(SENSO)

Prodotto della PCR

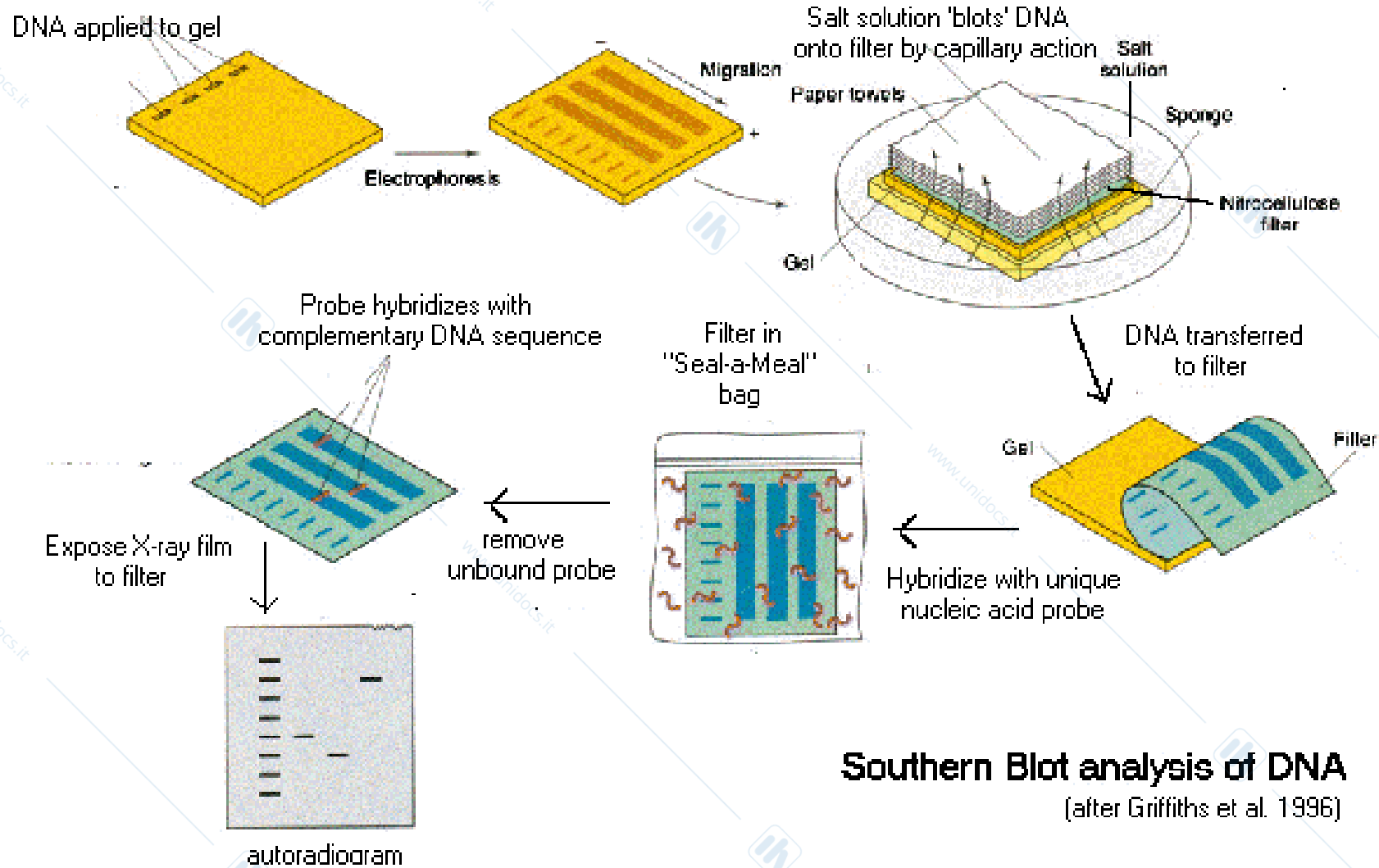


Southern Blot

è una tecnica usata per rivelare la presenza di specifiche sequenze di DNA in una miscela complessa

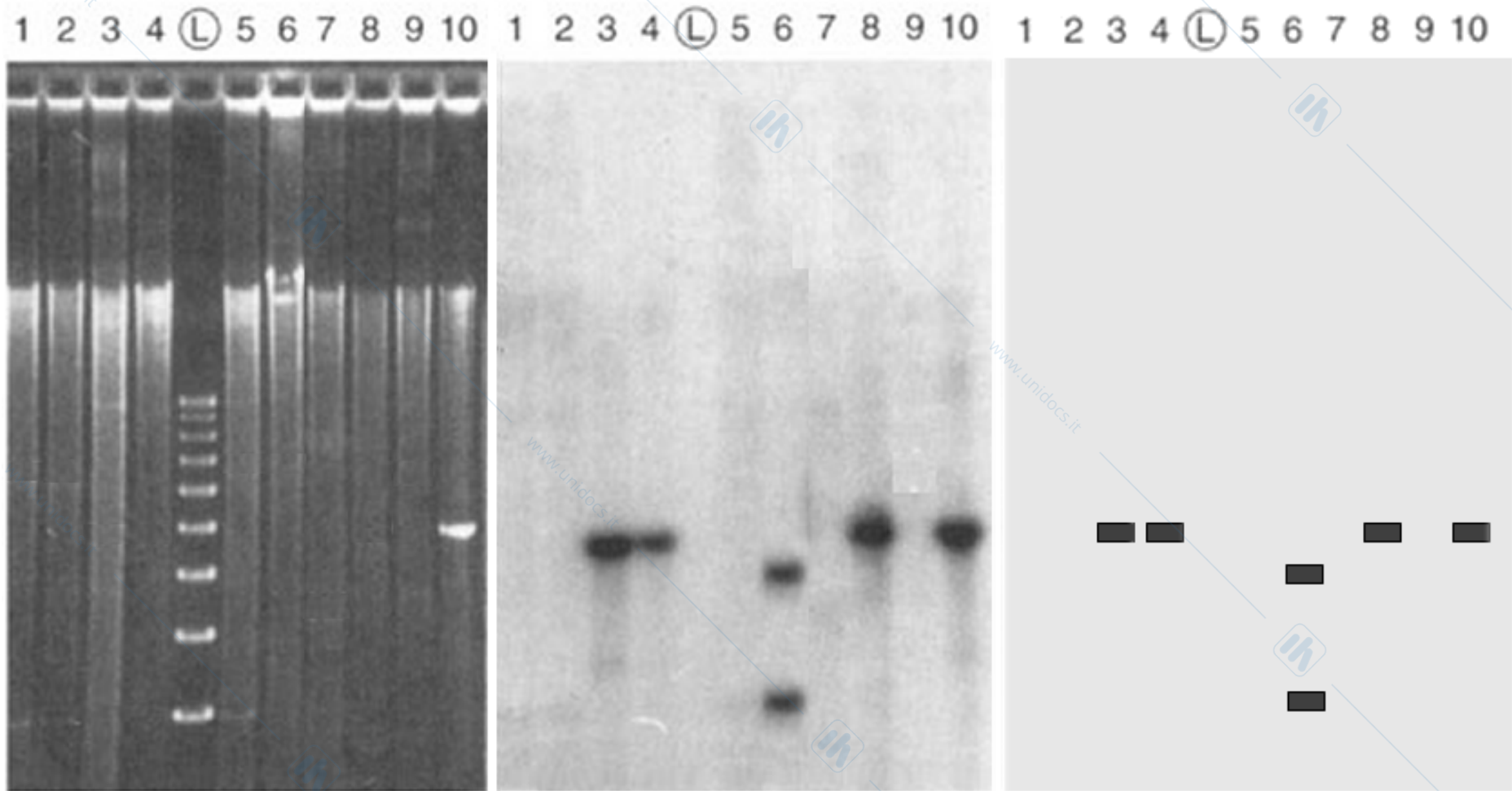
- Estrazione e purificazione
- Restrizione
- Corsa elettroforetica

Southern blot



Southern Blot analysis of DNA
(after Griffiths et al. 1996)

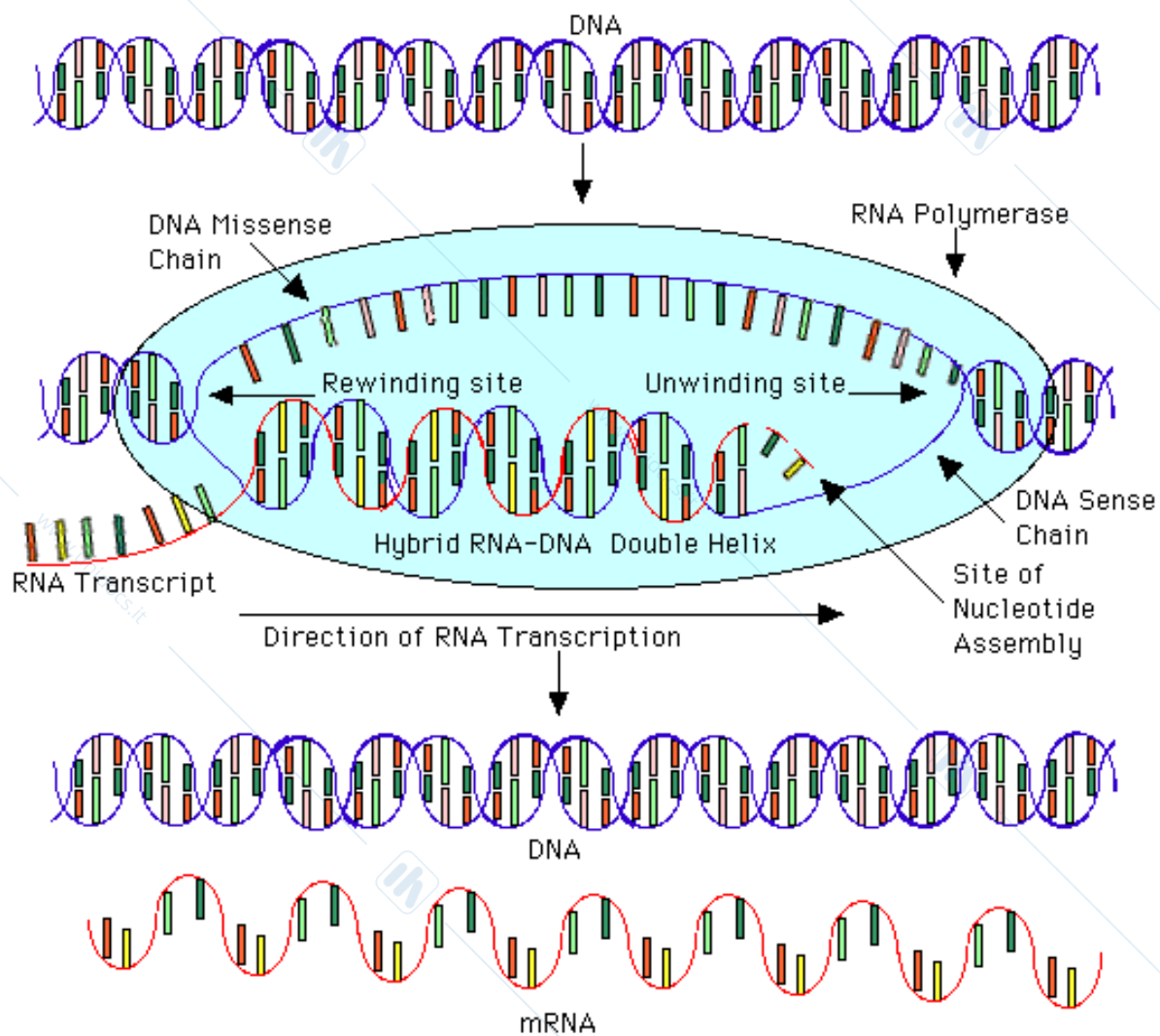
Southern blot



RNA

- elevata quantità di RNA in una cellula
- facilità nel purificare l'RNA
- facilità nell'ottenere la mappa dell'RNA
- più facilmente decodificabile rispetto al DNA

mRNA



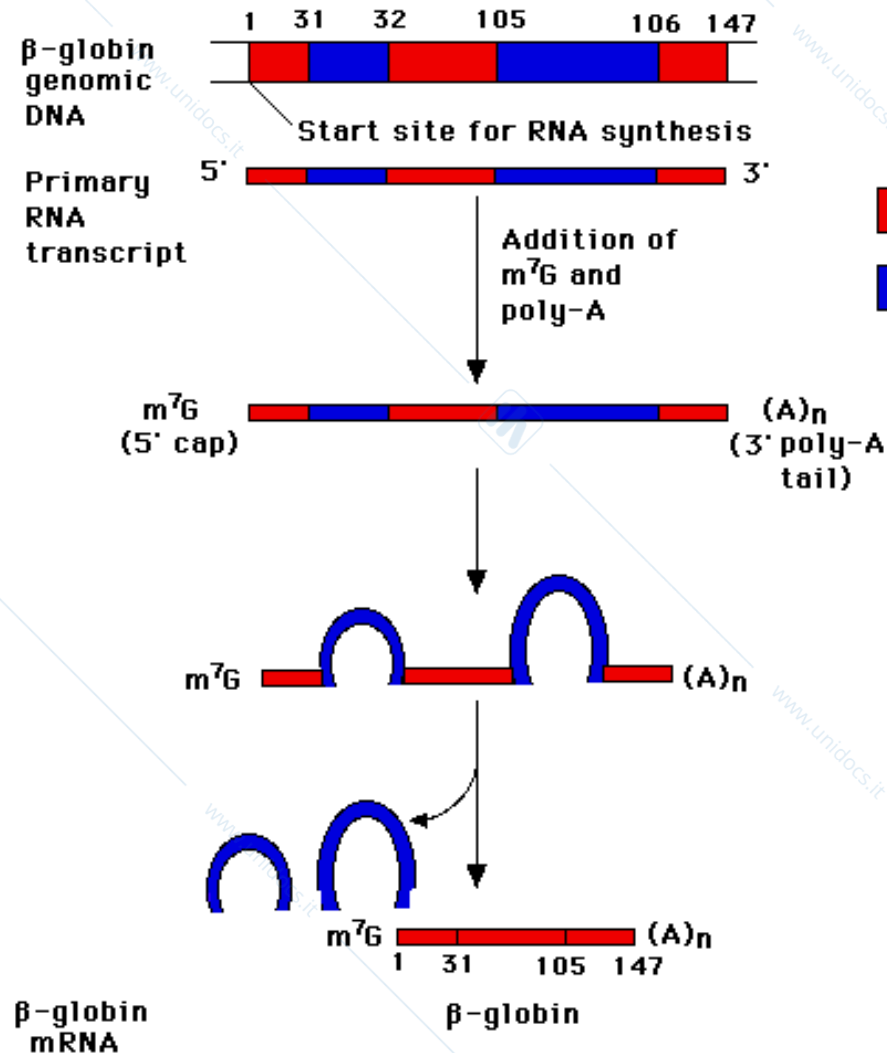


Fig. Overview of RNA processing in eukaryotes using β -globin gene as an example. The β -globin gene contains three protein-coding segments, called exons, and two intervening noncoding segments, called introns. After addition of the 5' cap and 3' poly-A tail, the introns are removed during splicing of the exons. The sequence of the resulting mRNA corresponds to that of the protein β -globin. The small numbers refer to positions in the sequence of β -globin, which contains 147 amino acids.

ANALISI DELL' mRNA

- RT-PCR
- NORTHERN BLOT
- IN SITU HYBRIDIZATION
- DIFFERENTIAL DISPLAY

RT-PCR

Reverse Transcription

mRNA

5' ————— AAAAAAAAAA3'

Anneal primer

5' ————— AAAAAAAAAA3'
| | | | | | | | | |
TTTTTTTTT
3' 5'

1st strand cDNA
synthesis with
reverse transcriptase

5' ————— AAAAAAAAAA3'
3' - - - - - TTTTTTTTTT5'

cDNA Pool Generated for Use in PCR

RT-PCR

- RNA template
- **Trascrittasi inversa** (primer antisenso...TTTTTTTTTTT..)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq polimerasi
- Primer antisenso
- Primer senso
- Mg^{++}
- H_2O

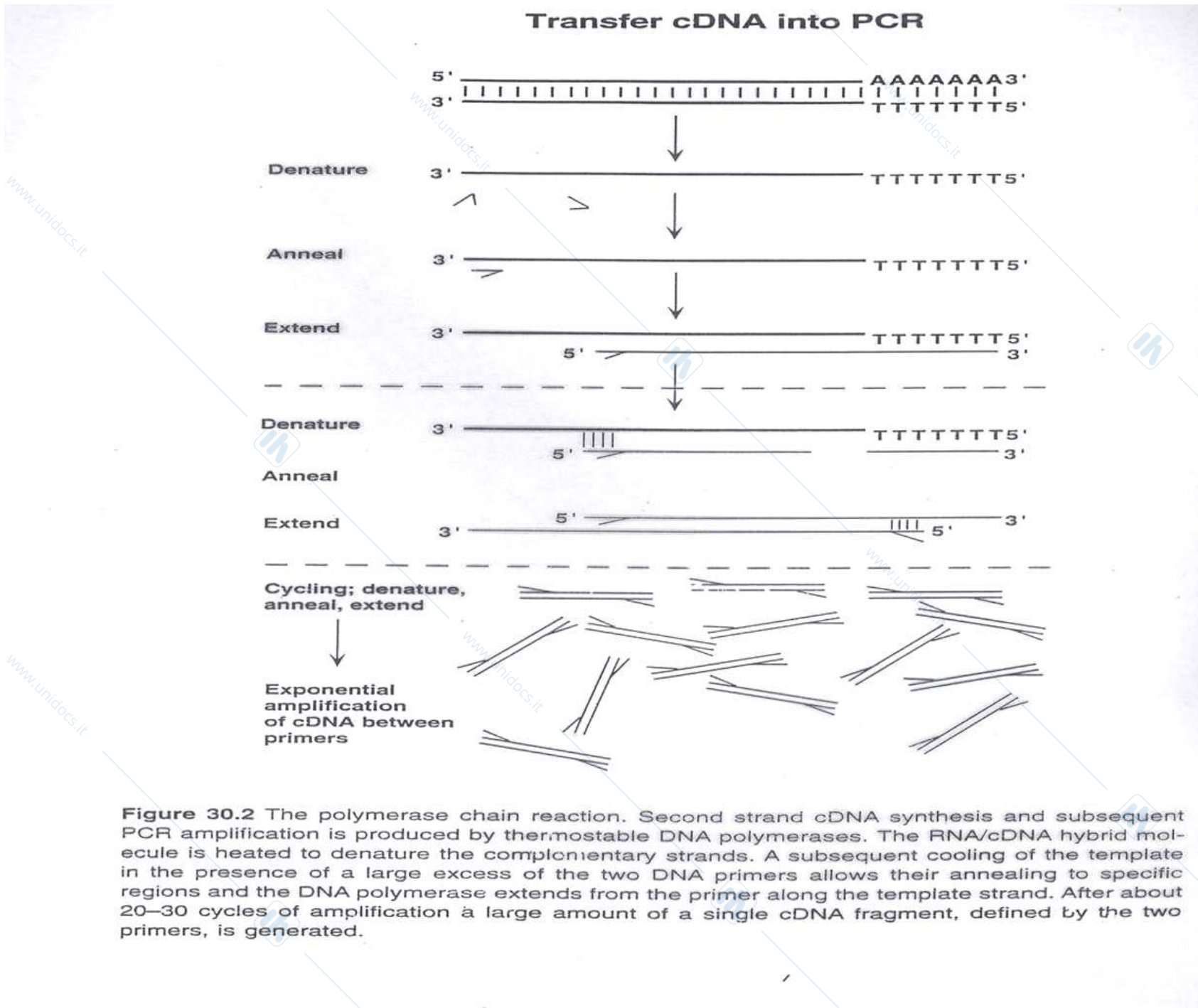


Figure 30.2 The polymerase chain reaction. Second strand cDNA synthesis and subsequent PCR amplification is produced by thermostable DNA polymerases. The RNA/cDNA hybrid molecule is heated to denature the complementary strands. A subsequent cooling of the template in the presence of a large excess of the two DNA primers allows their annealing to specific regions and the DNA polymerase extends from the primer along the template strand. After about 20–30 cycles of amplification a large amount of a single cDNA fragment, defined by the two primers, is generated.

Northern Blot

è l'analogo del southern blot
ma permette di evidenziare e studiare l'mRNA

NORTHERN BLOT

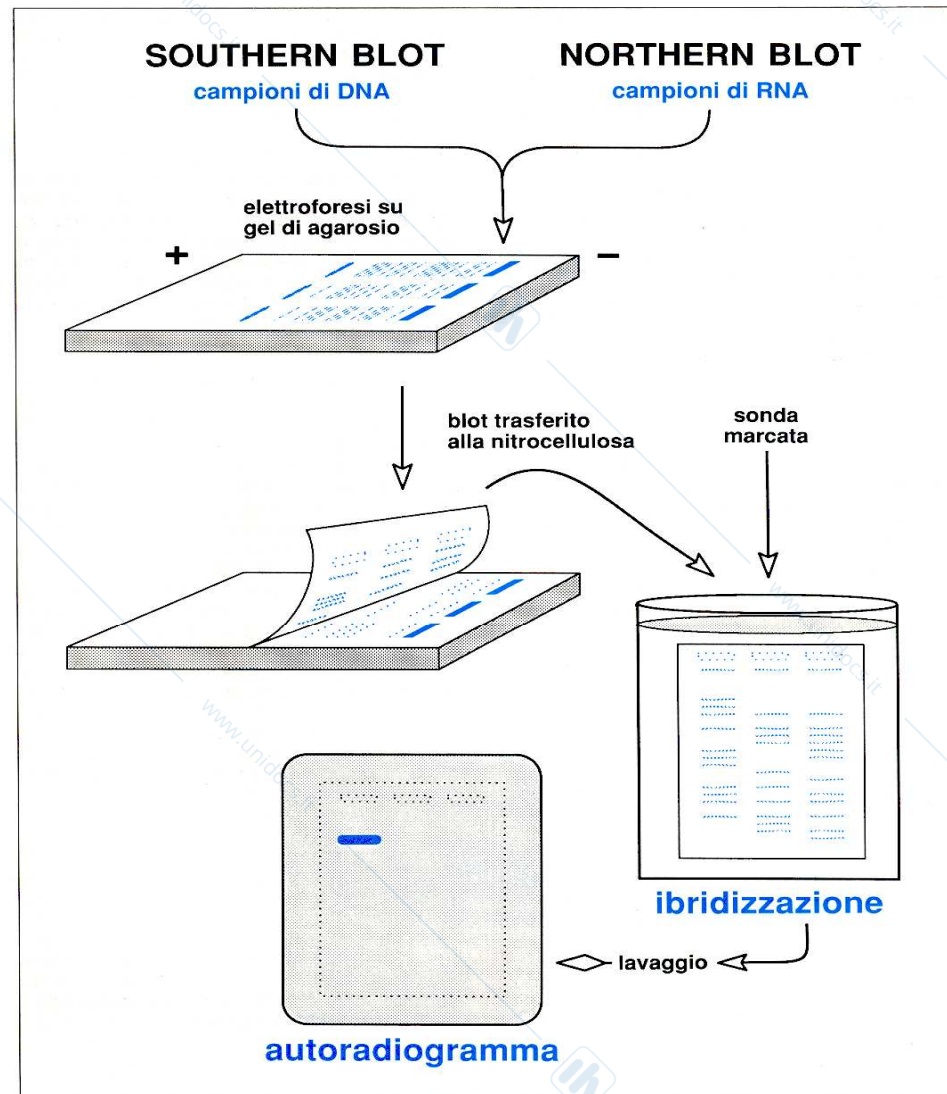


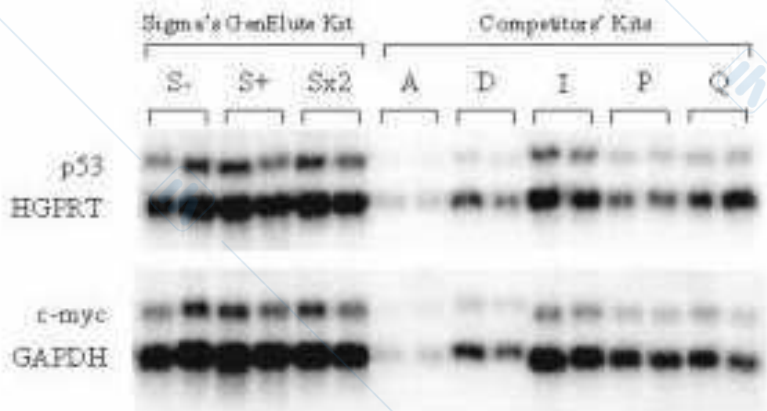
Figura 15 - **Le tecniche del Northern e del Southern blotting.** Campioni di DNA (Southern blot) o di RNA (Northern blot) sono separati nei loro componenti mediante elettroforesi su gel di agarosio. Gli RNA o i DNA separati sono trasferiti per diffusione ("blotting") su una membrana di supporto solida (in genere di nitrocellulosa o di nylon) per formare un "blot" che replica l'immagine delle molecole separate. I singoli componenti dell'immagine possono a questo punto essere identificati per ibridizzazione con una sonda di acido nucleico complementare radiomarcata. Il tracciato da ibridizzazione è visualizzato mediante autoradiografia.

Accorgimenti:

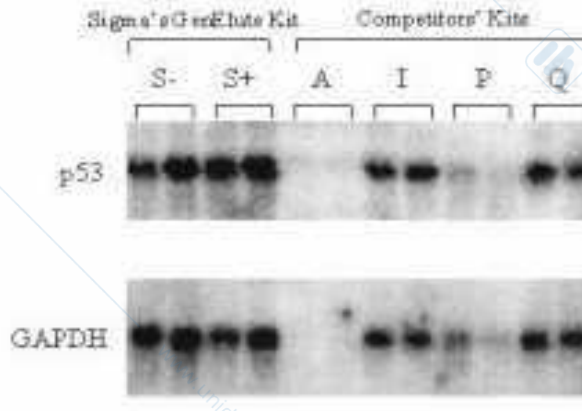
- Denaturare l'mRNA
- Sterilizzare
- Pulire gli strumenti con NaOH

NORTHERN BLOT

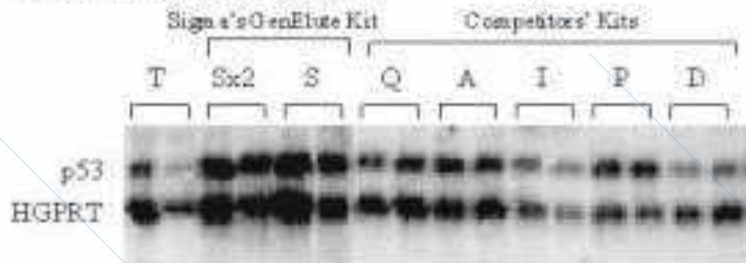
Direct from cells



Direct from tissue



from Total RNA (cells)



from Total RNA (tissue)



***IN SITU* HYBRIDIZATION**

L'ibridizzazione in situ è una metodica che utilizza delle sonde (probes) di mRNA, marcate radioattivamente, che possono essere usate per ibridare l'mRNA direttamente sul tessuto.

***IN SITU* HYBRIDIZATION**

1) PREPARAZIONE DEL TESSUTO

- congelamento a -80°C
- taglio al criostato ($12\ \mu\text{m}$)
- fissaggio del tessuto
- trattamento con anidride acetica

2) IBRIDIZZAZIONE CON PROBE (RNA o cDNA) MARCATO CON ^{35}S

3) RISCIACQUI PER RIDURRE IL BINDING ASPECIFICO

4) AUTORADIOGRAFIA

Ibridazione "in situ" dell'mRNA per la calmodulina

Asp - Ala - Asp - Gly - Asn - Gly - Thr - Ile - Asp - Phe - Pro - Glu Calmodulina (Domain II)
GAU - GCC - GAC - GGG - AAU - GGC - ACC - AUU - GAG - UUC - CCA - GAG mRNA Calmodulina

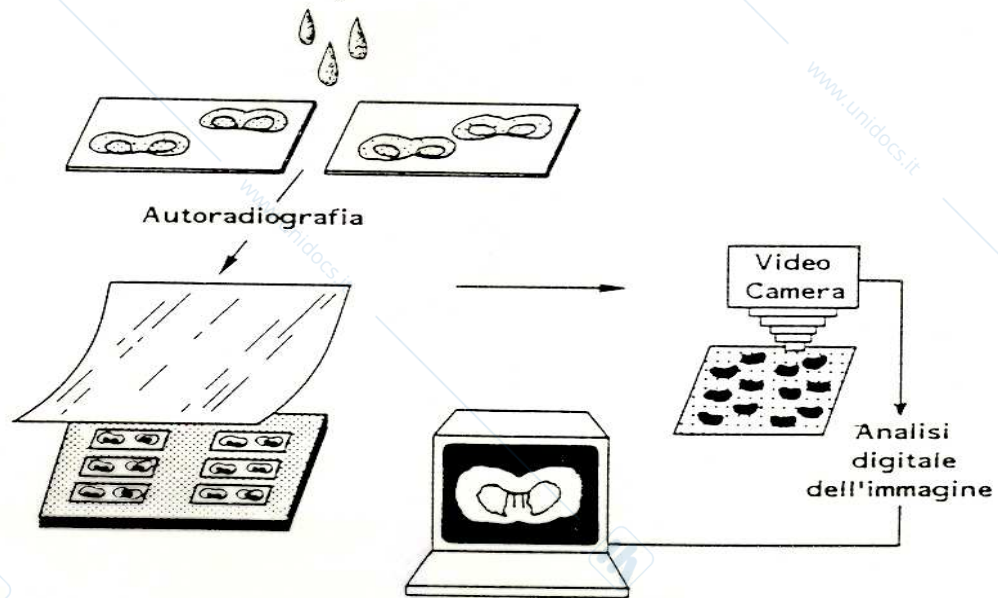
Sintesi del Probe

CTA - CGG - CTG - CCC - TTA - CCG - TGG - TAA - CTC - AAG - GGT - CTC Probe Complementare

Marcatura del probe

³⁵S
³⁵S
³⁵S
³⁵S
³⁵S
CTA - CGG - CTG - CCC - TTA - CCG - TGG - TAA - CTC - AAG - GGT - CTC Probe Marcato

Ibridazione



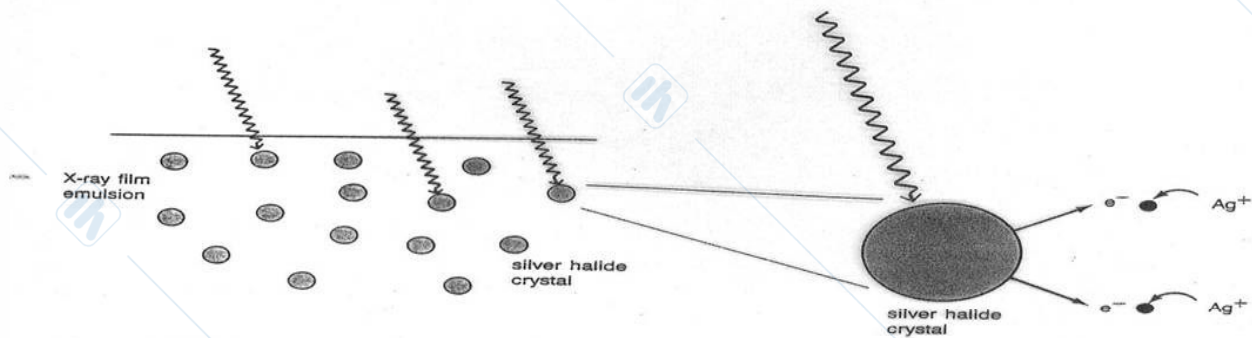
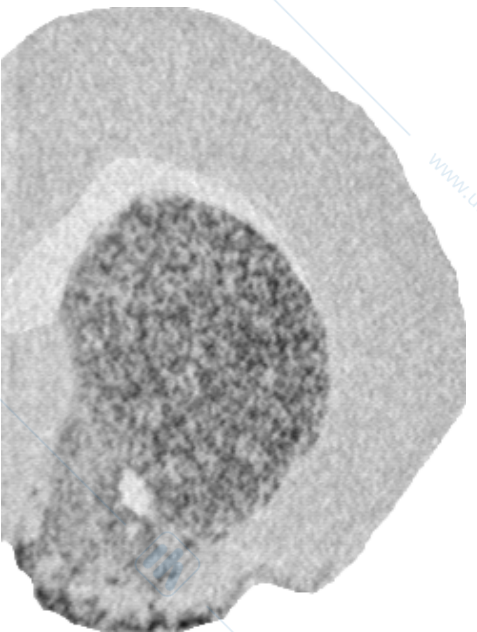
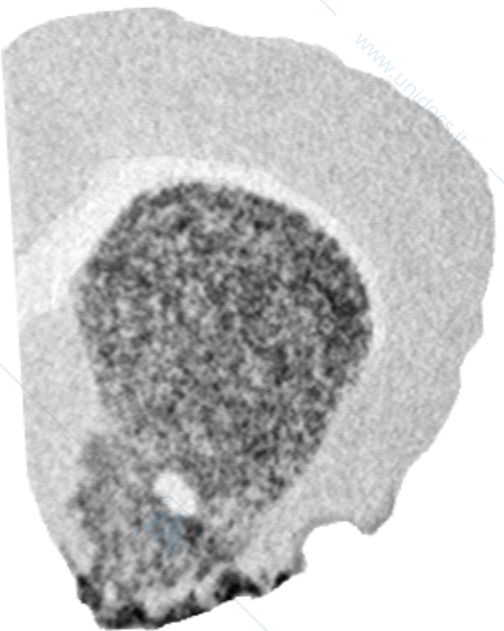
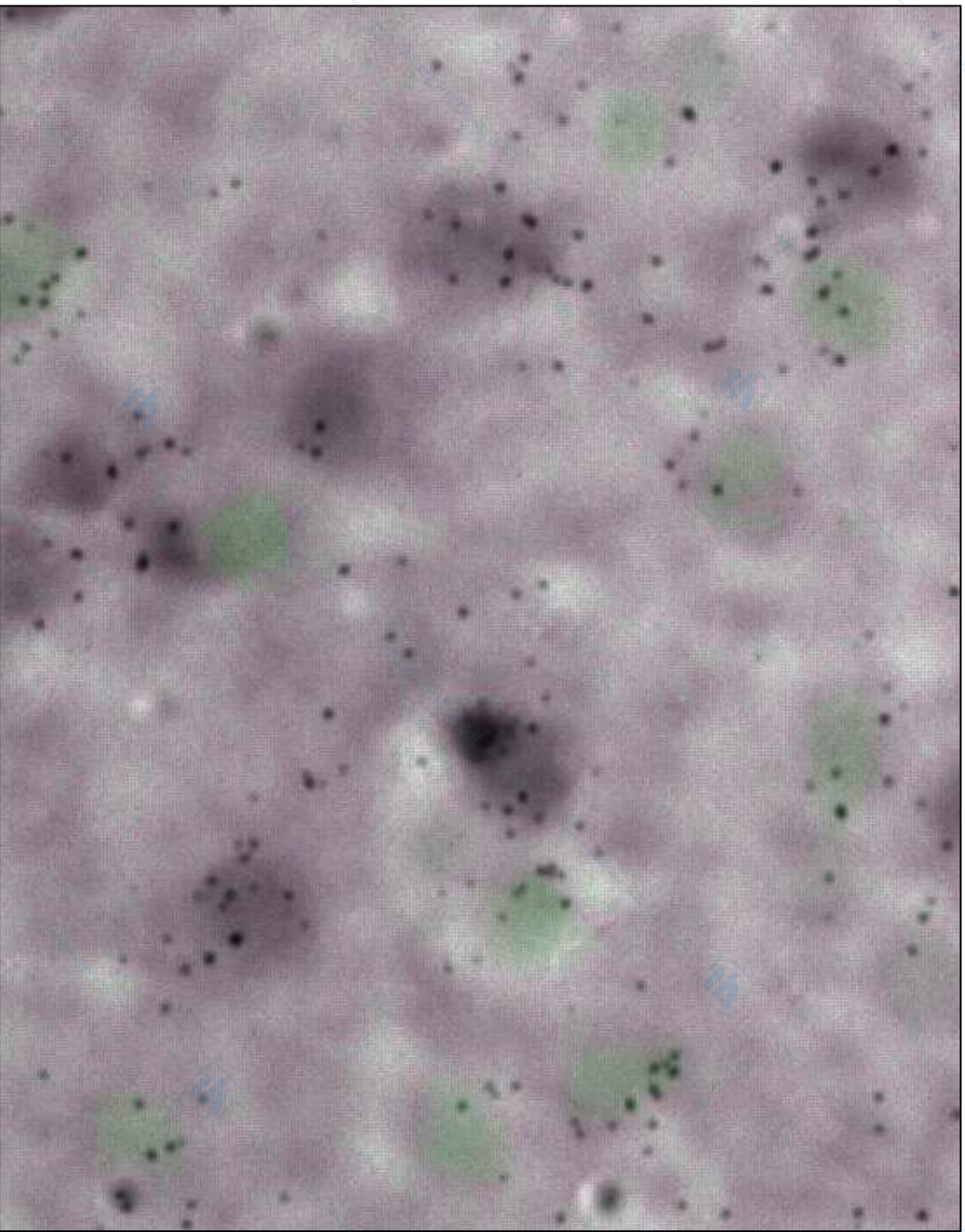


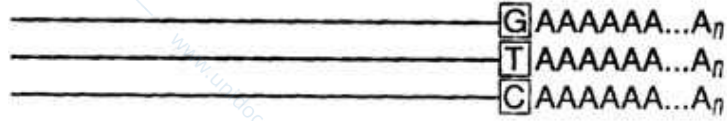
FIGURE E.2 Events leading to the formation of an autoradiographic image. The diagram shows that particles entering autoradiographic film cause ejection of electrons from silver halide crystals. These electrons attract positively charged silver ions, generating precipitates of silver atoms.



DIFFERENTIAL DISPLAY

Tecnica che consente di amplificare e visualizzare tutto l'mRNA presente in un tessuto, permettendo l'identificazione di geni non noti

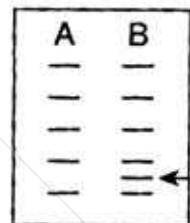
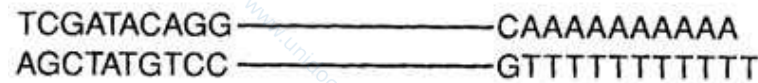
Popolazione di mRNA eterogeneo



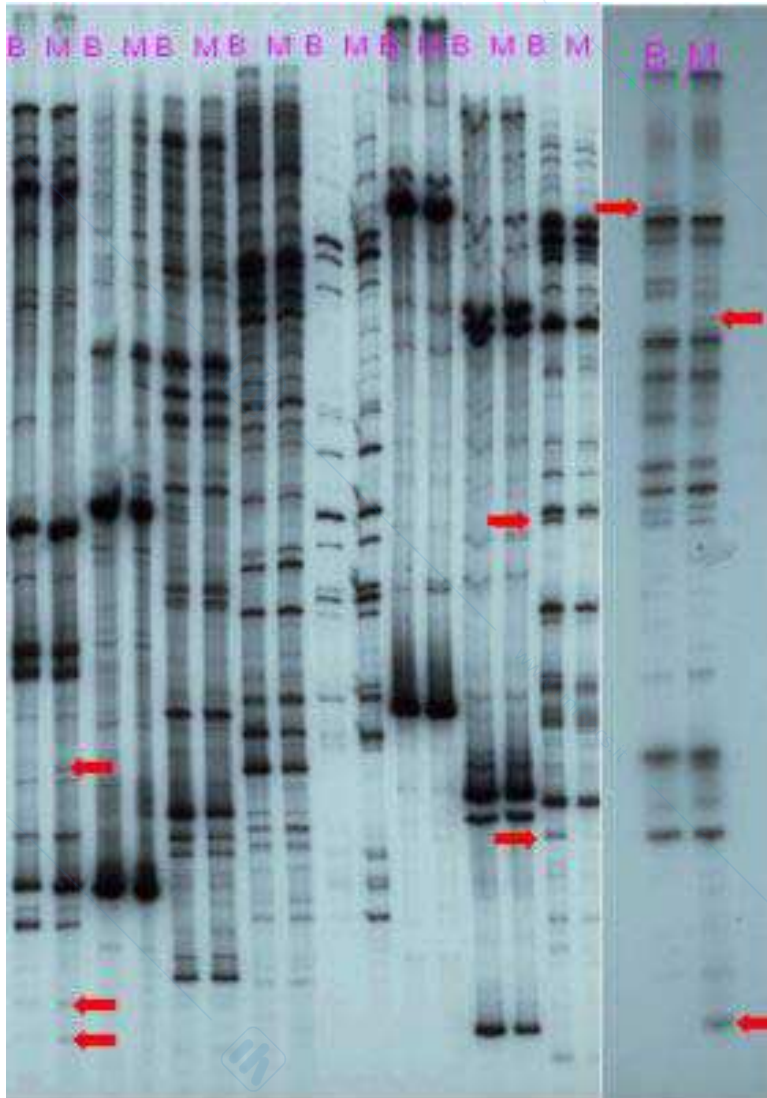
Trascrittasi inversa con *primer* oligo(dT) modificato, ad es. T₁₁G



Amplificazione PCR con T₁₁G e *primer* arbitrario di 10 nucleotidi, ad es. TCGATACAGG



Elettroforesi su gel di poliacrilammide



Esempio di Differential Display tra due linee cellulari differenti di *Candida albicans*. L'esperimento prevedeva l'utilizzo di un primer 3' T11C e di nove differenti primer 5'. I prodotti dell'amplificazione sono fatti correre in parallelo nel gel. Le bande specifiche delle singole linee cellulari sono indicate da frecce rosse.

CLONAZIONE DI GENI



Isolare e riprodurre un gene

PCR

Inserzione in un plasmide

Studi successivi

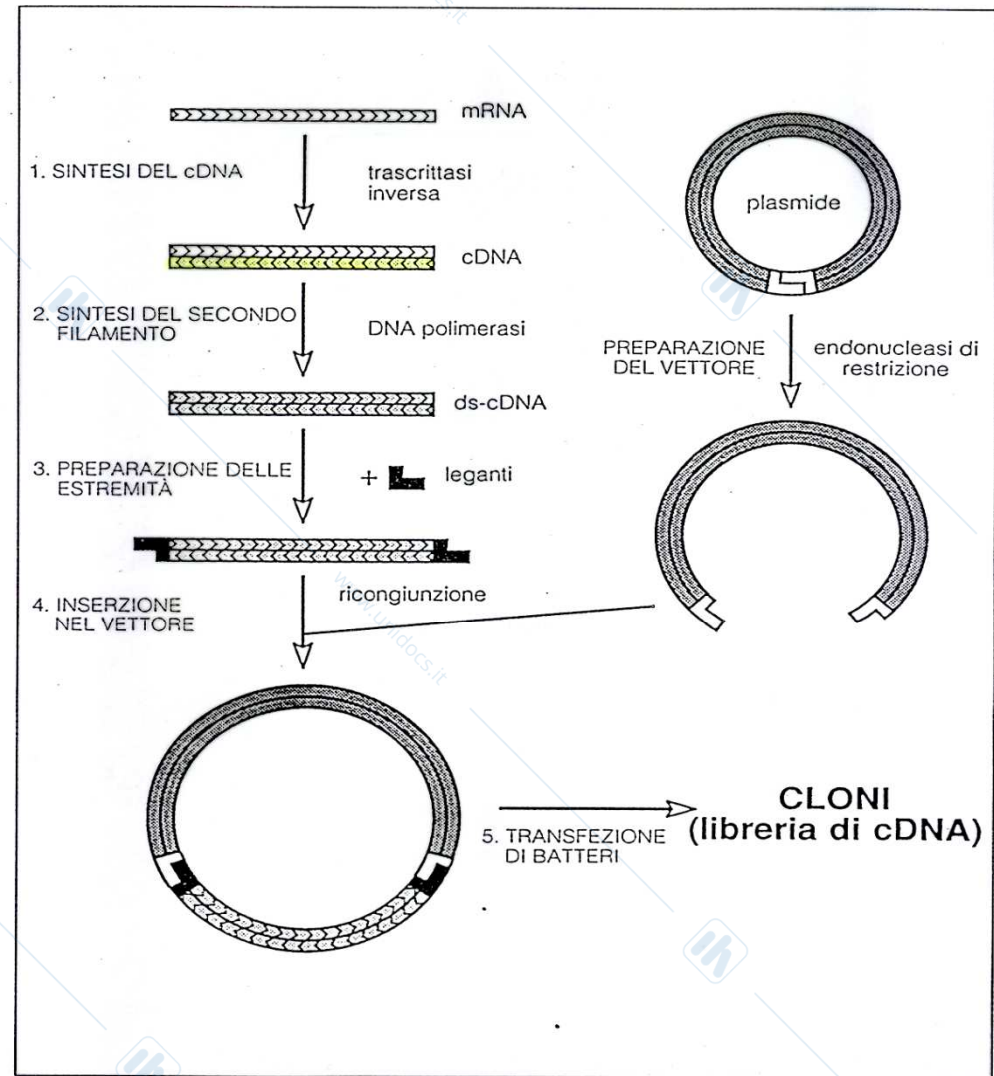
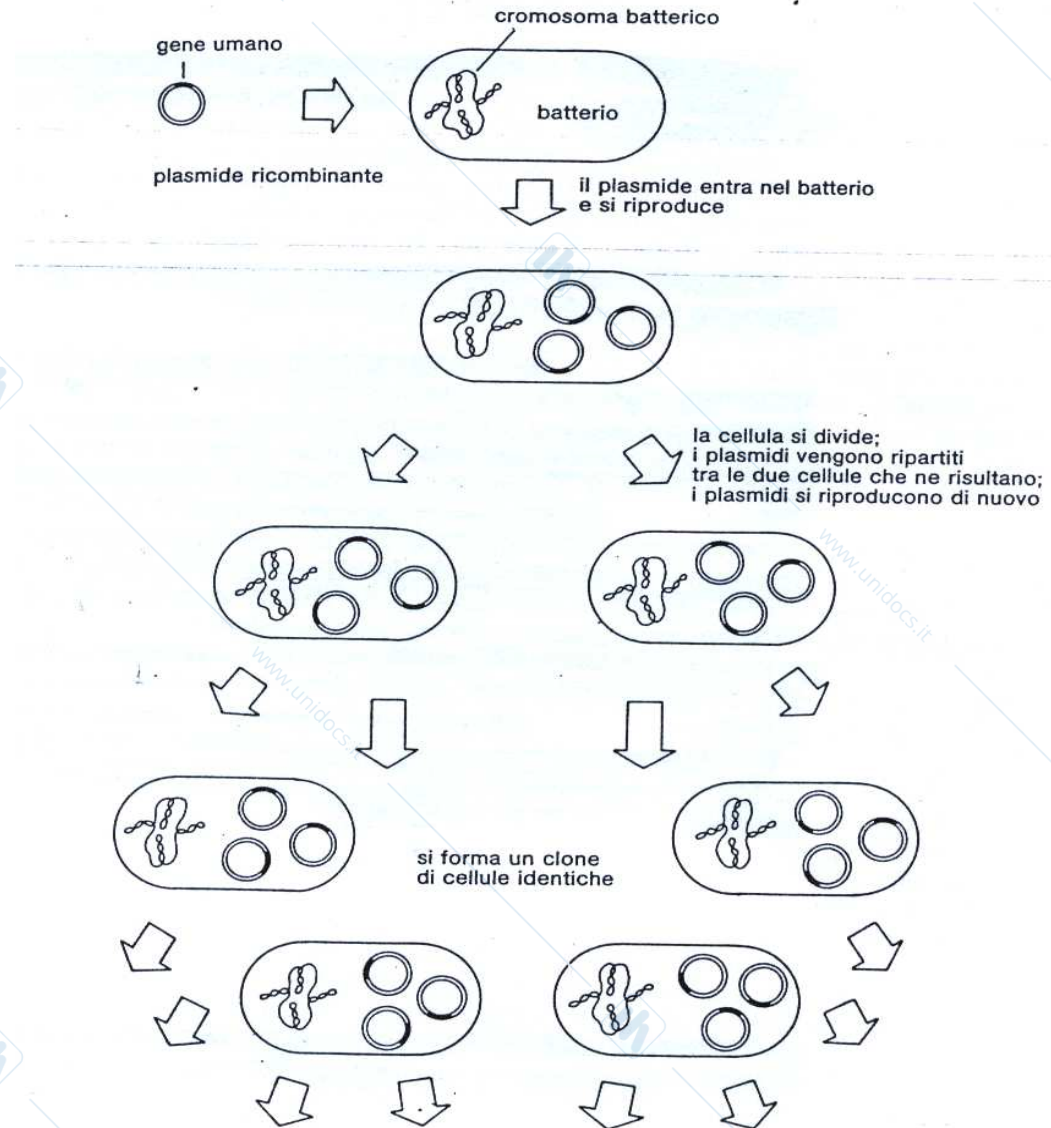
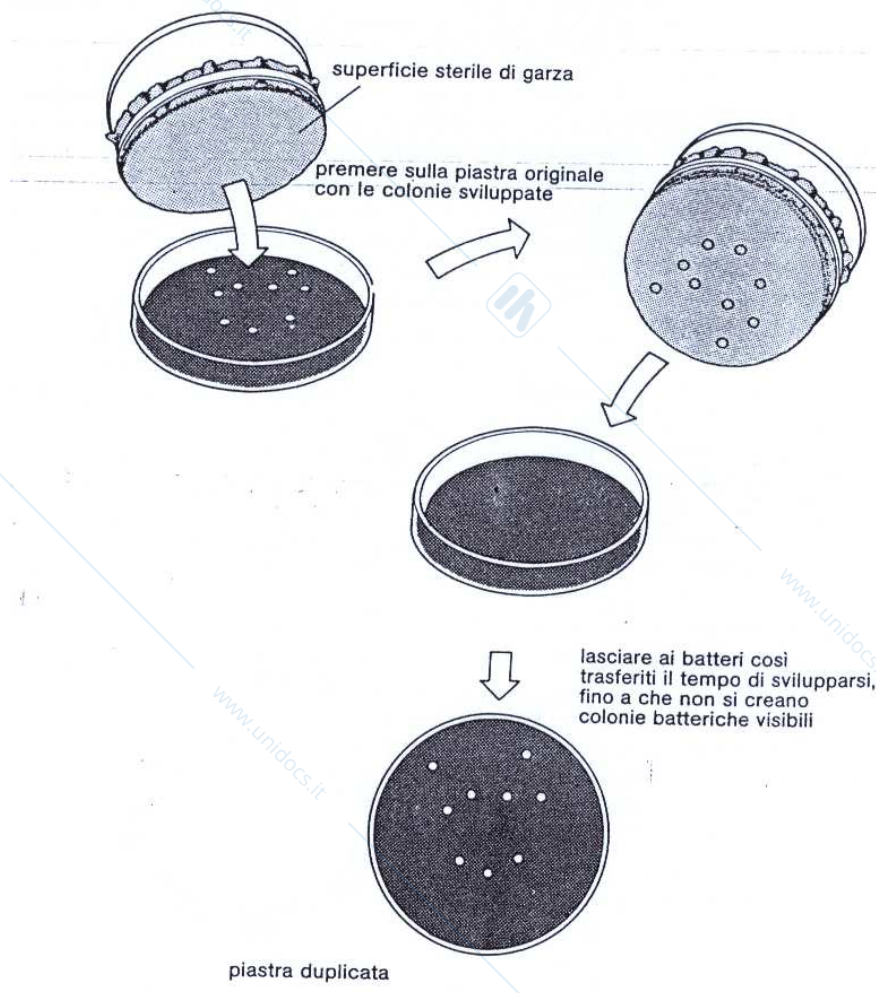


Figura 4 - Allestimento di una libreria di cDNA. In questa figura schematica le molecole di RNA sono in bianco e quelle di DNA in blu; la loro polarità dall'estremità 5' a quella 3' è indicata dalle punte di frecce. Gli mRNA sono convertiti in cDNA a doppio filamento (ds-cDNA) nella tappa 1 e 2, quindi questi vengono preparati per l'inserzione nel vettore mediante attacco dei leganti (tappa 3): questi sono brevi frammenti di DNA a doppio filamento sintetizzati chimicamente, che vengono attaccati al ds-cDNA dall'enzima DNA ligasi. I leganti sono preparati in modo che le loro sequenze corrispondano per appaiamento di basi alle estremità del vettore preparato. Dopo l'inserzione in quest'ultimo (tappa 4), le molecole ricombinanti, chiuse ad anello, sono transfettate in batteri (tappa 5) per produrre una libreria di cDNA.

REPLICAZIONE





Aggiungere ampicillina al mezzo di coltura

Struttura dei plasmidi

Vengono utilizzati vettori contenenti:

- **il gene per la resistenza all'ampicillina**

i batteri che hanno inglobato il plasmide sopravvivono in presenza di ampicillina

i batteri che non hanno inglobato il plasmide non sopravvivono in presenza di ampicillina

Struttura dei plasmidi

Vengono utilizzati vettori contenenti:

- il gene per la resistenza all'ampicillina
- il gene Lac Z (gene per la β -galattosidasi)

in presenza di IPTG e XGAL

Plasmidi con esatta inserzione del cDNA

Gene LacZ interrotto: no produzione β -galattosidasi

Plasmidi con mancata inserzione del cDNA

Gene LacZ intatto: produzione β -galattosidasi

colorazione blu delle colonie batteriche

- L'insulina è prodotta dalle cellule β del pancreas e regola il metabolismo dei carboidrati
- Prima dell'82 era possibile somministrare solo insulina dal pancreas di bovino o suino

PRODUZIONE DELL'INSULINA UMANA CON LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

1. produzione di proinsulina, inserendo nei batteri il gene completo e quindi convertendo la proinsulina, prodotta dai batteri, in insulina, come avviene nelle cellule normalmente;
2. produzione da parte di due colture batteriche separate (rispettivamente ingegnerizzate con i geni che codificano per le catene (A e B) delle singole catene polipeptidiche e quindi legandole chimicamente tra loro per ottenere la molecola attiva.

Per ottenere il gene dall'insulina umana:

- isolare l'RNA messaggero che codifica per l'ormone insulina dalle cellule del pancreas che lo contengono in gran quantità e usare la trascrittasi inversa per fare una stampo di cDNA;
- sintetizzare chimicamente in laboratorio il gene della proinsulina umana o delle singole catene dell'insulina umana legando nel corretto ordine le basi nucleotidiche desunte dalla sequenza di amminoacidi nella molecola della proinsulina e insulina.

Dopo aver ottenuto il gene, questo viene inserito nel batterio *Escherichia coli*. I batteri ricombinanti coltivati nei bioreattori producono l'insulina umana e la secernono all'esterno, facilitandone l'estrazione.

Il primo vaccino ricombinante è stato quello dell'epatite B.

Applicando le tecniche dell'ingegneria genetica è stato clonato in un vettore il gene che codifica per l'antigene di superficie del virus e quindi trasferito ed espresso in un lievito, il *Saccharomyces cerevisiae*: il prodotto presenta tutte le caratteristiche dell'antigene.

TERAPIA GENICA

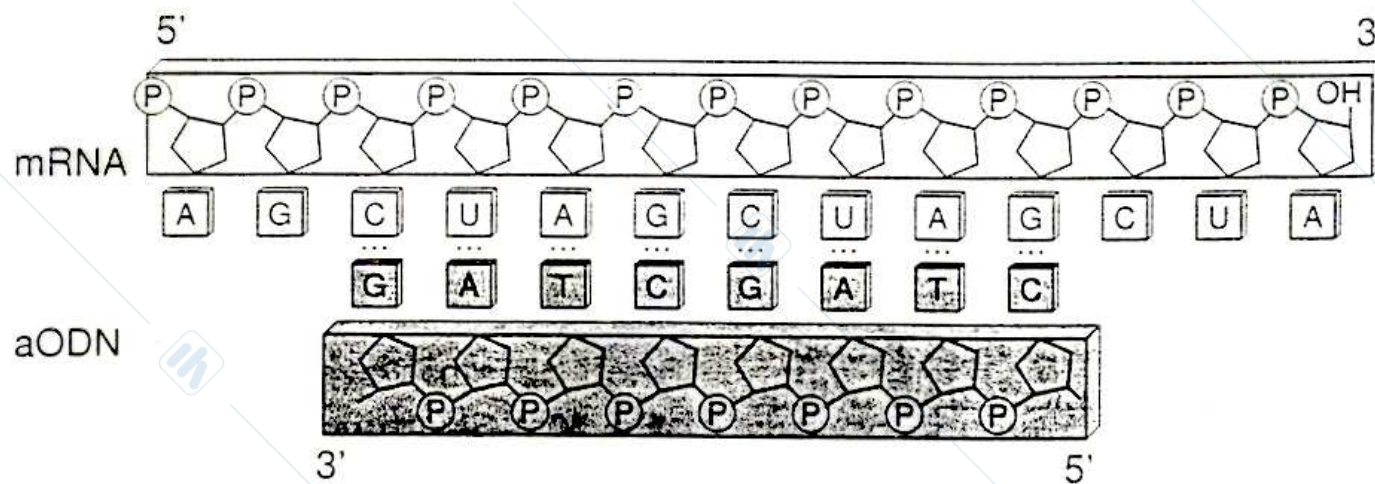
Terapia mirata a sostituire geni malati
o a impedire il funzionamento di un determinato gene



OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSEN

OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

bloccare mRNA e traduzione di proteine



L'oligonucleotide antisense si lega in modo specifico alla sequenza complementare dell'mRNA.

Il tratto di catena ibrida che così si forma determina per impedimento sterico l'inattivazione dell'intero messaggero.

- Dimensione minima per inibire la traduzione: 15-18 oligomeri
- E' necessario conoscere la sequenza nucleotidica dell'mRNA
- Regioni di mRNA in cui il legame con l'antisense provoca un arresto più efficiente della traduzione

OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

- in oncologia
- nella terapia antivirale
- ricerca

VANTAGGI

- efficacia
- semplicità progettazione
- selettività

SVANTAGGI

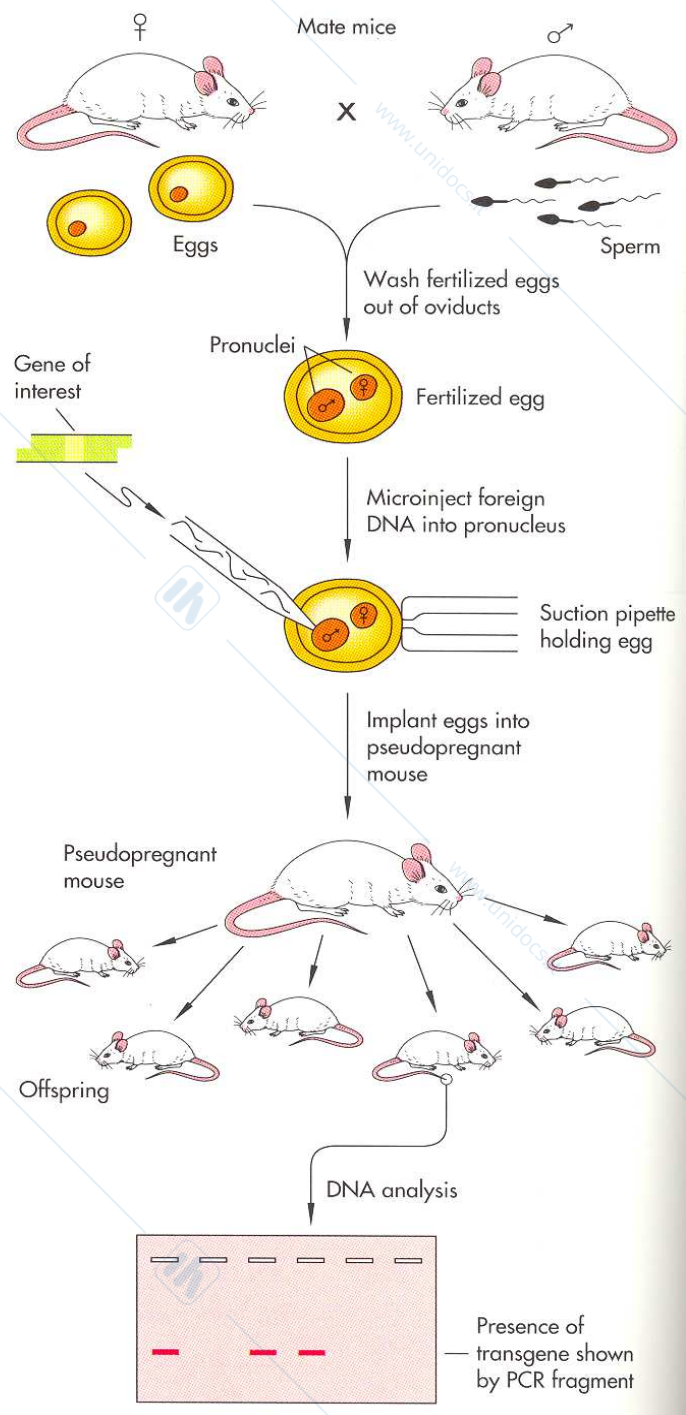
- scarsa stabilità chimica (bersaglio nucleasi)
- difficoltà attraversamento membrane (dimensione, meccanismi di trasporto)
- alti costi di produzione

ANIMALI TRANSGENICI

- Aggiunta di nuovi geni
- Eliminazione di uno o più geni (KO)

APPLICAZIONI:

- modelli di patologie umane
- produzione di farmaci ricombinanti. Es. tPA (attivatore tissutale del plasminogeno) secreto nel latte di una topina
- donatori di tessuti e organi da trapiantare



Producing transgenic mice

The gene of interest is injected into one of two pronuclei of fertilized eggs. The injected eggs are transferred to a pseudopregnant female mice. Three weeks after the birth, the offspring are checked for the presence of the transgene by Southern blotting of DNA extracted from a small piece of the tail. Screening can be performed rapidly using the polymerase chain reaction.

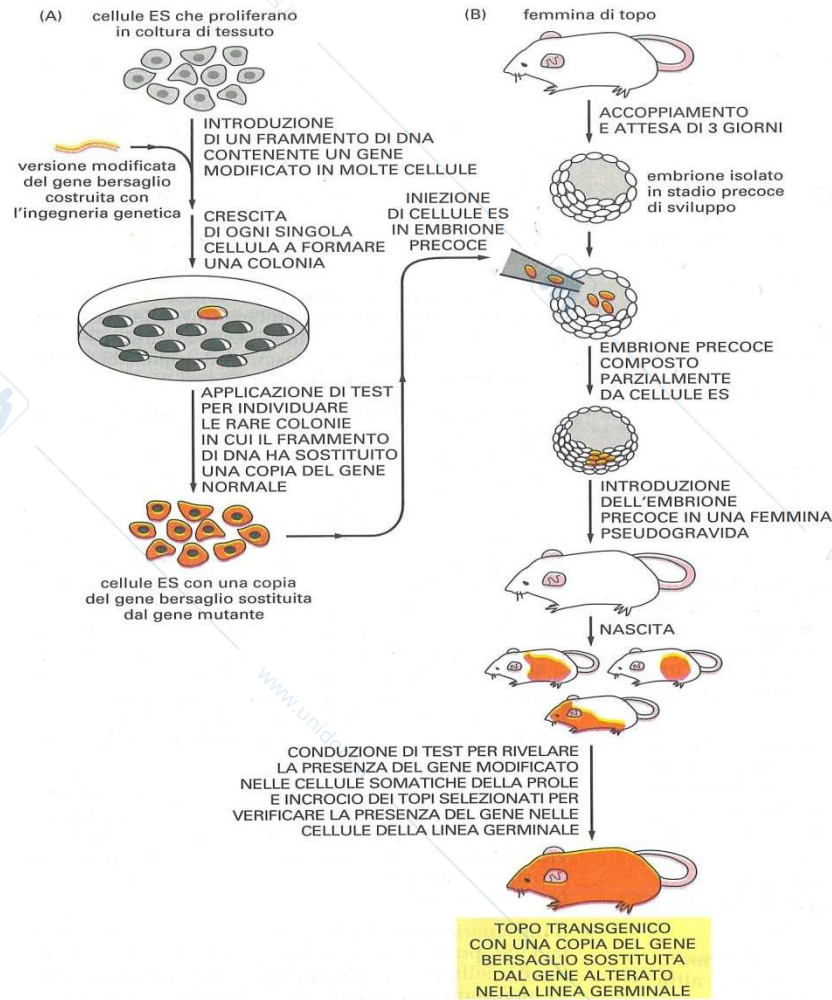
Animali geneticamente modificati per produrre biofarmaci:

- Tracey, pecora che codifica l'antitripsina, una sostanza chiave dell'organismo che in una persona su 2000 risulta carente provocando gravi malattie come la fibrosi polmonare, enfisema e cirrosi epatica.
- Herman, toro transgenico le cui figlie mucche producono latte con lattoferrina, proteina molto rara in grado di curare numerosi mali, dai tumori alle malattie del sistema immunitario, che solo la specie umana era in grado finora di produrre nel latte materno.
- Genie, scrofa transgenica il cui latte contiene la proteina C del sangue umano.
- Rosie, mucca transgenica il cui latte contiene una proteina umana utile ai nati prematuri.
- Grace, capra transgenica nel cui latte è presente una proteina antitumorale.
- Polly, clone transgenico che contiene il gene per una proteina umana, il fattore IX.

Animali KNOCK - OUT

Gli animali Knock-out sono considerati una tecnica investigativa che tiene conto dell'eliminazione di un gene in particolare, nel tentativo di definire che effetto ha nell'organismo

TECNICA KNOCK - OUT



Animali conditional Knock-out

- Lo scopo dei **Knock-out condizionali** è eliminare un gene in un tessuto, in un organo o in una fase particolare di sviluppo.

VANTAGGI:

- topi Knock-out conditional sopravvivono più a lungo
- i metodi sono anche più precisi