



Università degli Studi di Napoli Parthenope

DIAGNOSTICA MOLECOLARE

A cura di:

Brunetti Sara Teresa 0123003207

Castiello Sabrina 0123002924

Coppola Viviana 0123002968

Gaudio Gaia 0123002945

Pullano Rossella 0123002738

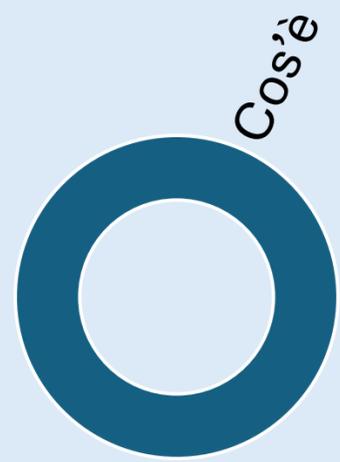
Sarcano Vittoria 0123002735

Scerbo Sonia Ursula 0123002756

Professoressa Elena Chianese



DNA



Southern Blotting

Introduzione

Tecniche su cui si basa

Funzionamento

Protocollo di esecuzione

Analisi dei dati ottenuti

Limiti e vantaggi e confronto con altre tecniche

Campi di applicazione

Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)





Introduzione

Il Southern blotting ha avuto un enorme impatto sullo studio del DNA ed è una tecnica ancora molto usata nei laboratori molecolari, in quanto permette di rispondere a una serie di quesiti, come:



Si è verificato il riarrangiamento o la delezione di una particolare regione o gene del DNA?



Il DNA è presente in un particolare campione?



Una procedura di clonazione ha avuto successo?

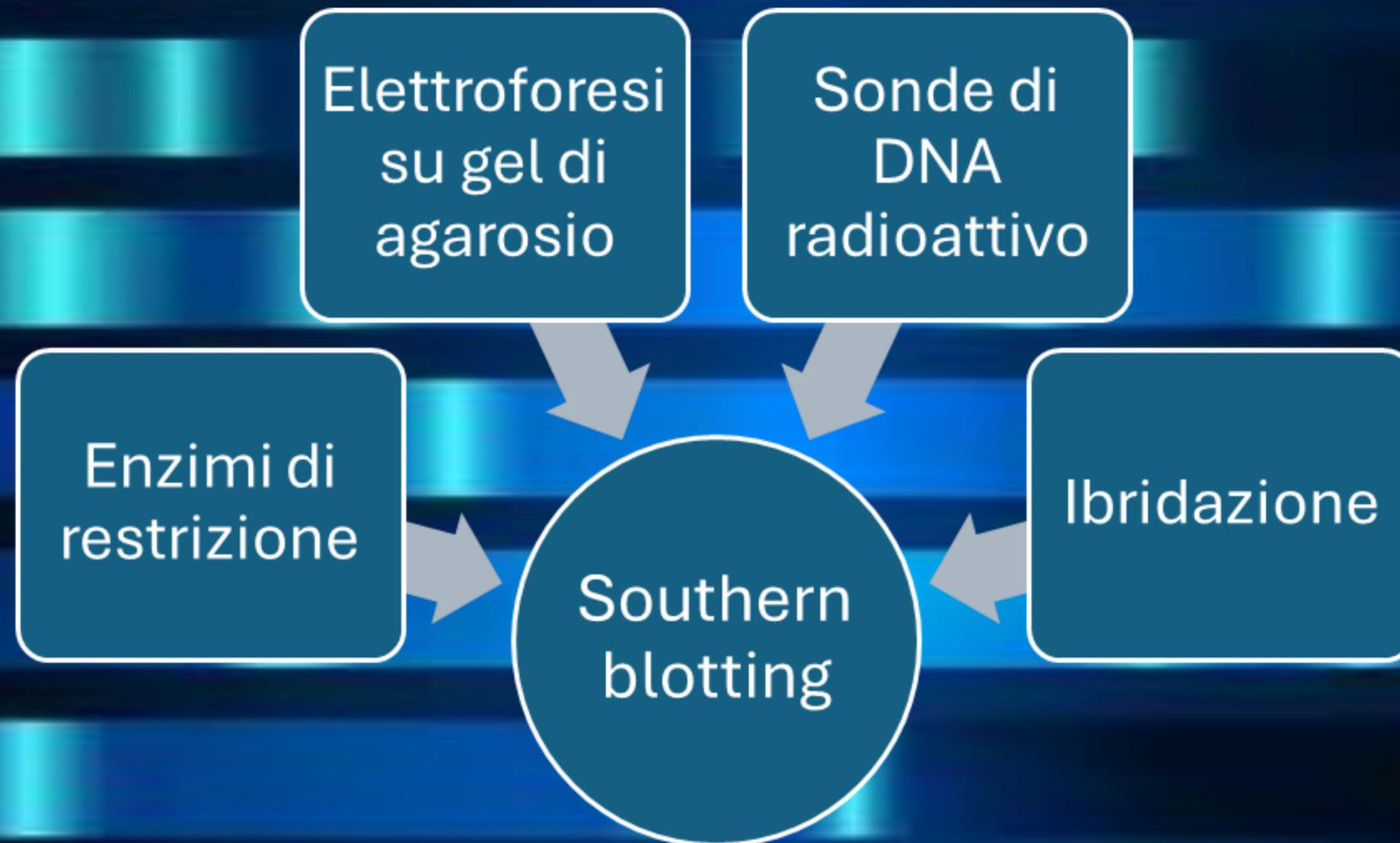


C'è una mutazione presente in una particolare regione importante del DNA come un gene?



Quanto è grande un frammento specifico di DNA?

Tecniche su cui si basa



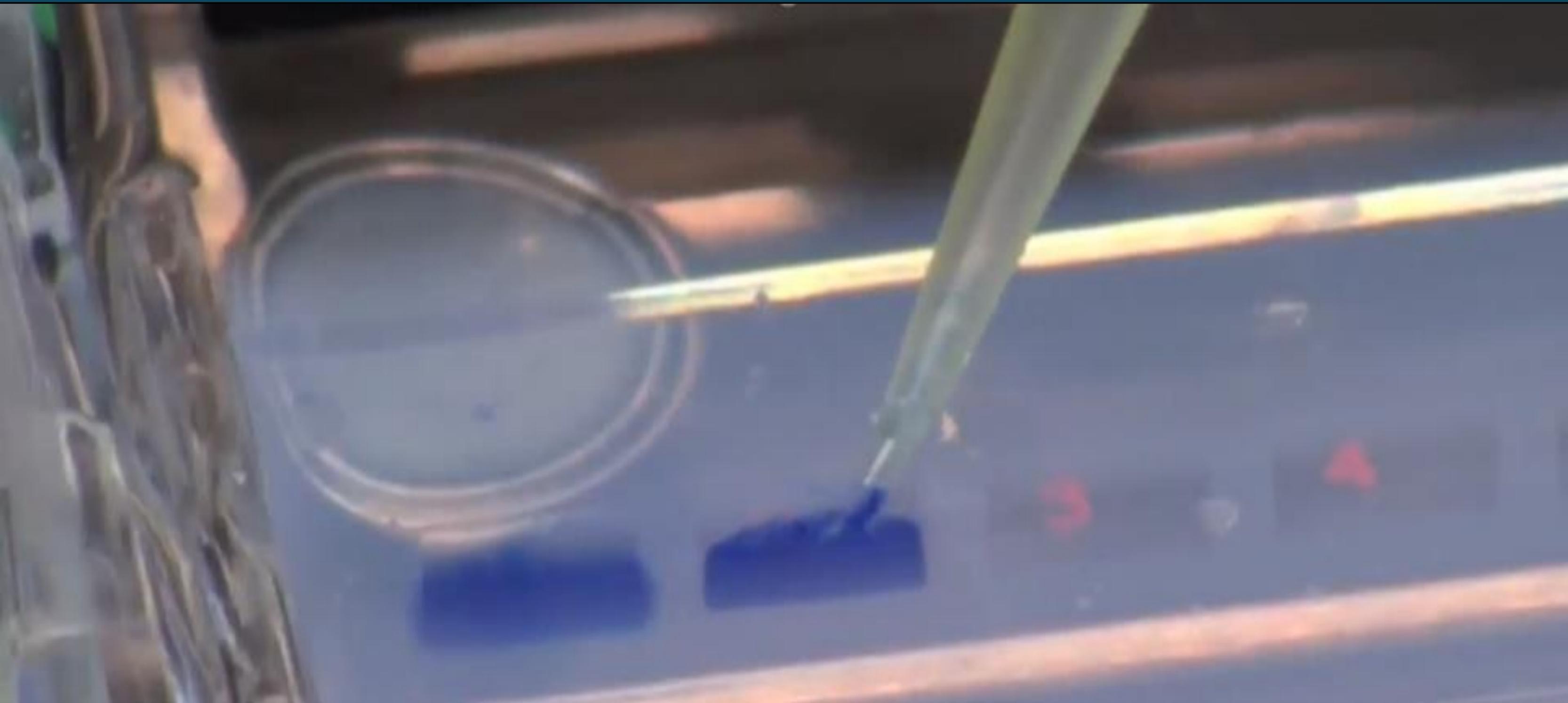
1. Enzimi di restrizione

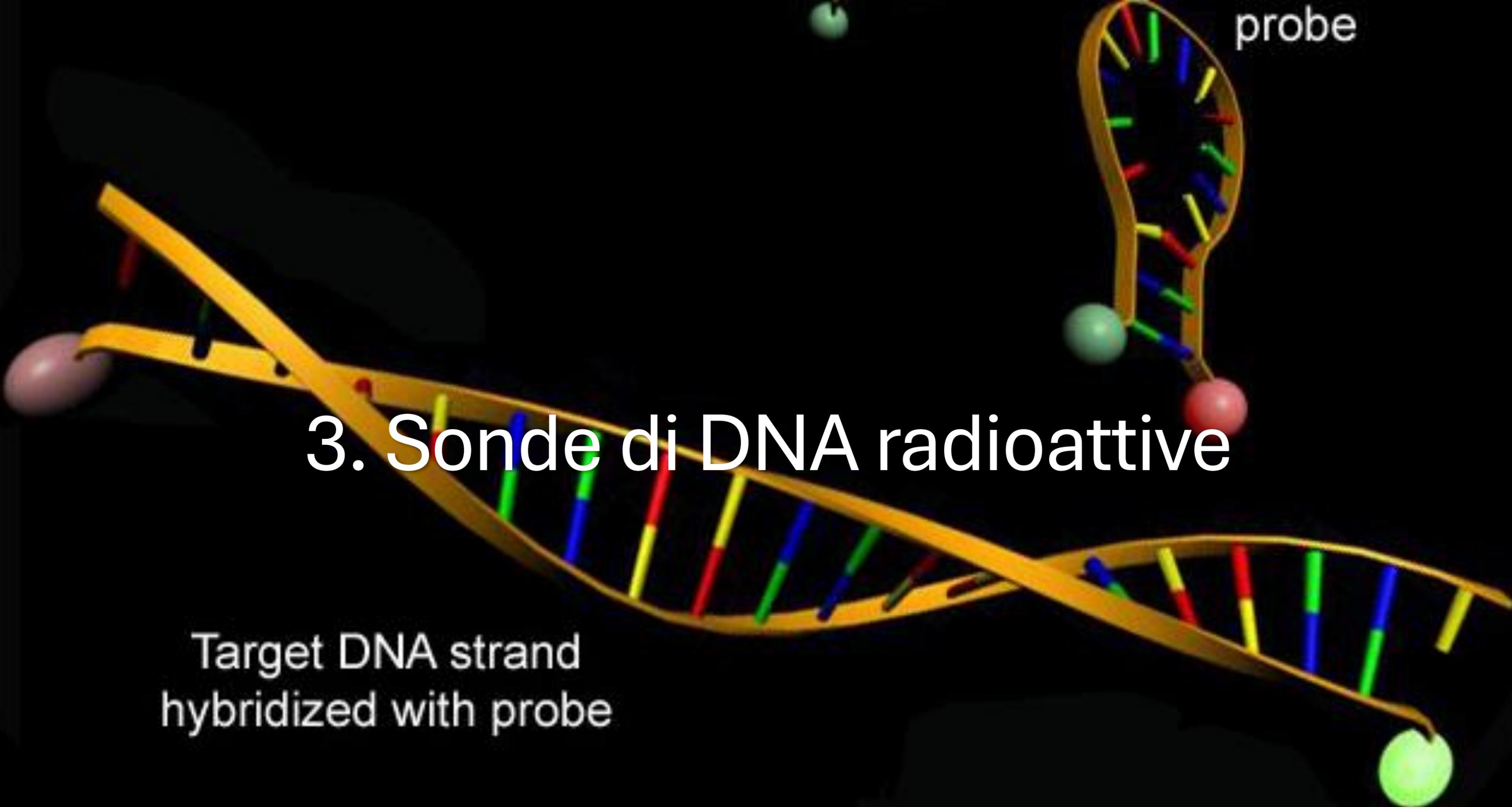
Sono catalizzatori biologici che, aggiunti a un campione di DNA, introducono tagli nel DNA stesso, ma solo in particolari sequenze, ovviando il problema di scomporre il DNA in pezzi gestibili in laboratorio

Es:

- EcoRI, isolato dal batterio *Escherichia Coli*, rimuoverà la sequenza GAATTC, dopo aver riconosciuto la sequenza complementare.
- Sau3A isolato da *Staphylococcus aureus* taglierà il DNA ogni volta che incontra la sequenza GATC

2. Elettroforesi





probe

3. Sonda di DNA radioattiva

Target DNA strand
hybridized with probe

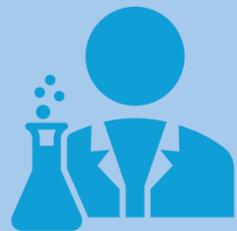
4. Ibridazione



Una soluzione di frammenti di DNA a doppio filamento che viene riscaldata a 65-70s si separerà in singoli filamenti.



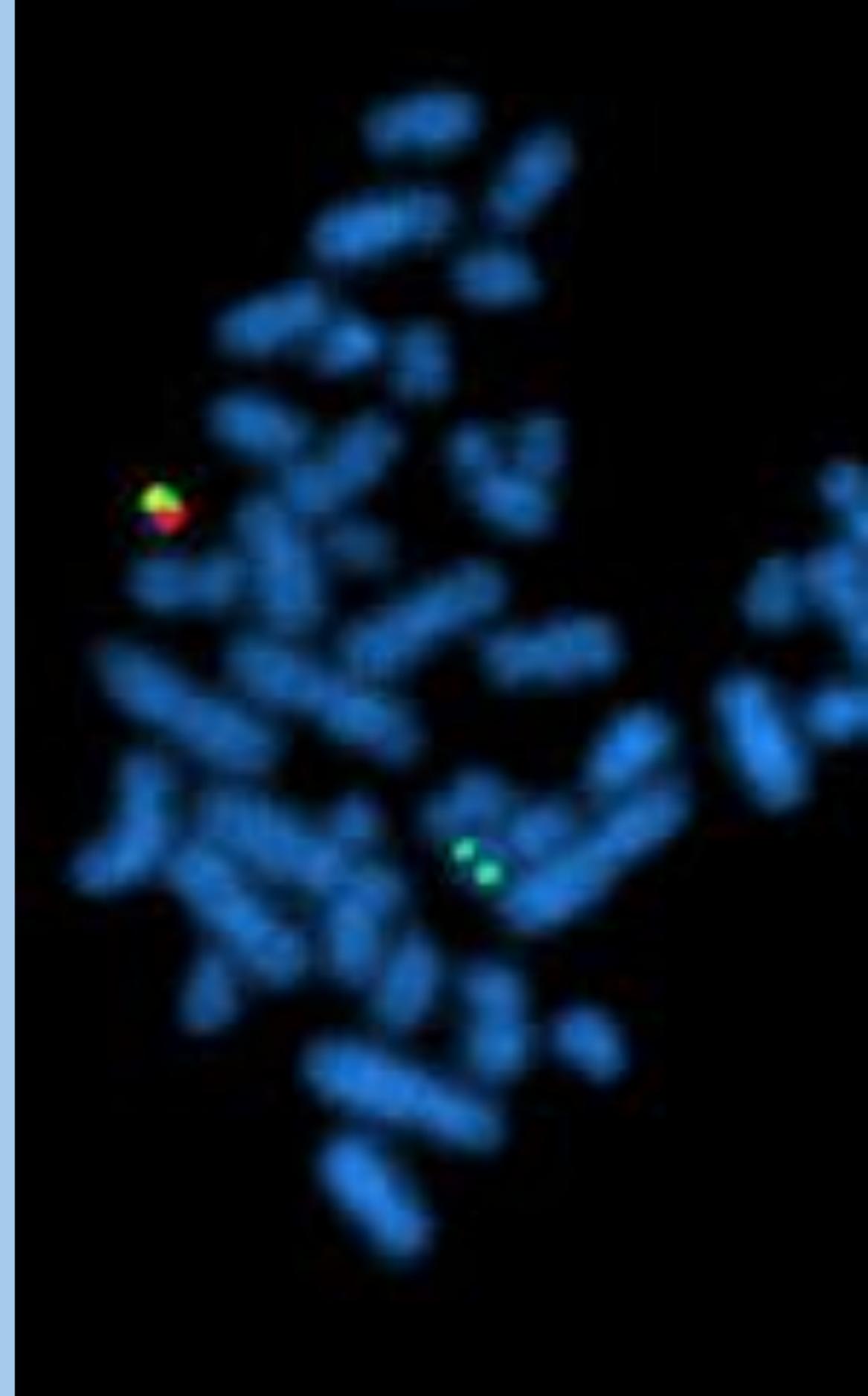
Al raffreddamento i filamenti si riuniranno esattamente come prima, in quanto sono tra loro complementari, esiste, infatti, una rigorosa regola di base-pairing.



Per ogni singolo filamento prodotto quando il DNA viene fuso, c'è solo un singolo filamento che lo completerà esattamente. Questo processo noto come ibridazione è la base di un rilevamento molto sensibile usato nel Southern blot.



Il principio dell'analisi di ibridazione è che una molecola di DNA o RNA a filamento singolo con sequenza definita (la "sonda") può appaiarsi con una seconda molecola di DNA o RNA che contiene una sequenza complementare (il "bersaglio"), con la stabilità dell'ibrido a seconda dell'entità dell'accoppiamento di basi che si verifica.



Funzionamento



Scomporre il DNA



Estrazione dei filamenti dal gel tramite blotting.



Costruzione della piramide di trasferimento.



La soluzione salina estrae il DNA dal gel.

Extract purified DNA from biological sample



Digest DNA with restriction enzymes into fragments

Restriction Enzymes



Separation of nucleic acids by size via gel electrophoresis

Uso degli enzimi di restrizione

Corsa elettroforetica.

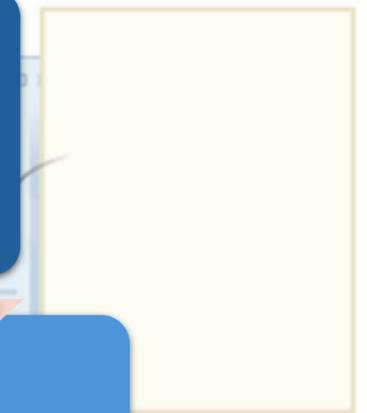
Colorazione e fotografia.

Depurinazione.

Verifica del processo.

Apply nitrocellulose membrane to agarose gel

Nitrocellulose membrane



Protocollo di esecuzione

Blotting and migration of nucleic acids onto membrane



Nitrocellulose membrane

UV Light



Nitrocellulose membrane with bound unlabeled nucleic acids



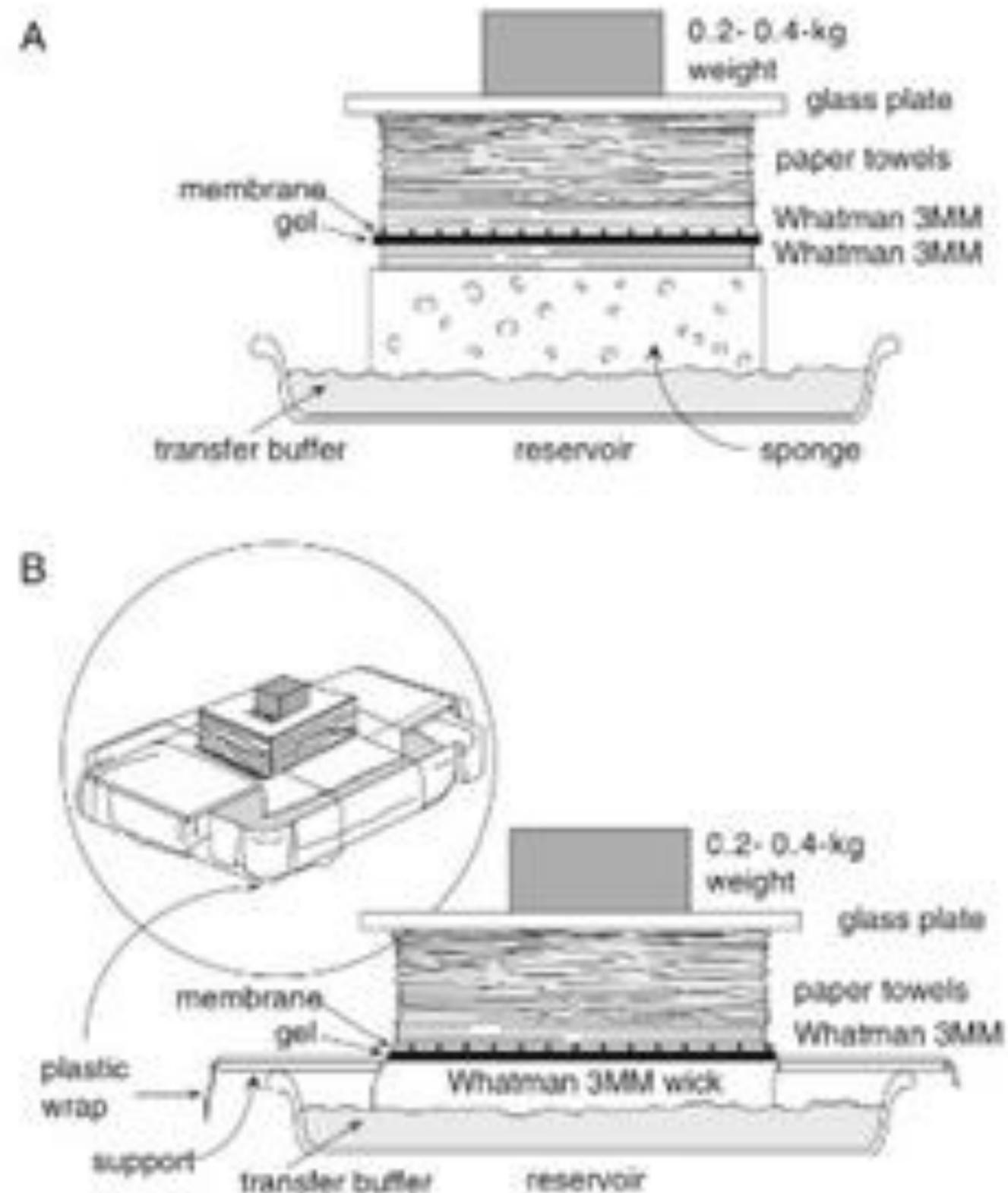
Eliminare l'HCl e sostituire con una soluzione di denaturazione.

Portare il pH del gel a <math><9,0</math>. A pH più elevato, il DNA trasferito non si legherà alla nitrocellulosa.

Immobilizzazione del DNA.

Configurazione del trasferimento.

Impregnare la spugna nel tampone 20xSSC.



3.1 Two alternative transfer pyramid setups for Southern blotting via upward flow. (A) Sponge method. (B) Whatman 3MM filter paper wick method.

PESO

coperchio



vassoio



- Il filtro di nylon viene inserito in un contenitore con una soluzione detta di preibridazione a riscaldato a 65 °C.



- I filamenti separati diventano accessibili alla sonda.



- La soluzione con la sonda etichettata viene aggiunta al filtro nel contenitore a 65 °C.

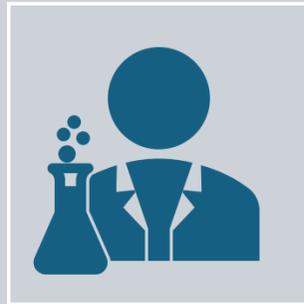


- La sonda legherà la regione del genoma legata al filtro a essa complementare.



- Preparare gli autoradiografi.

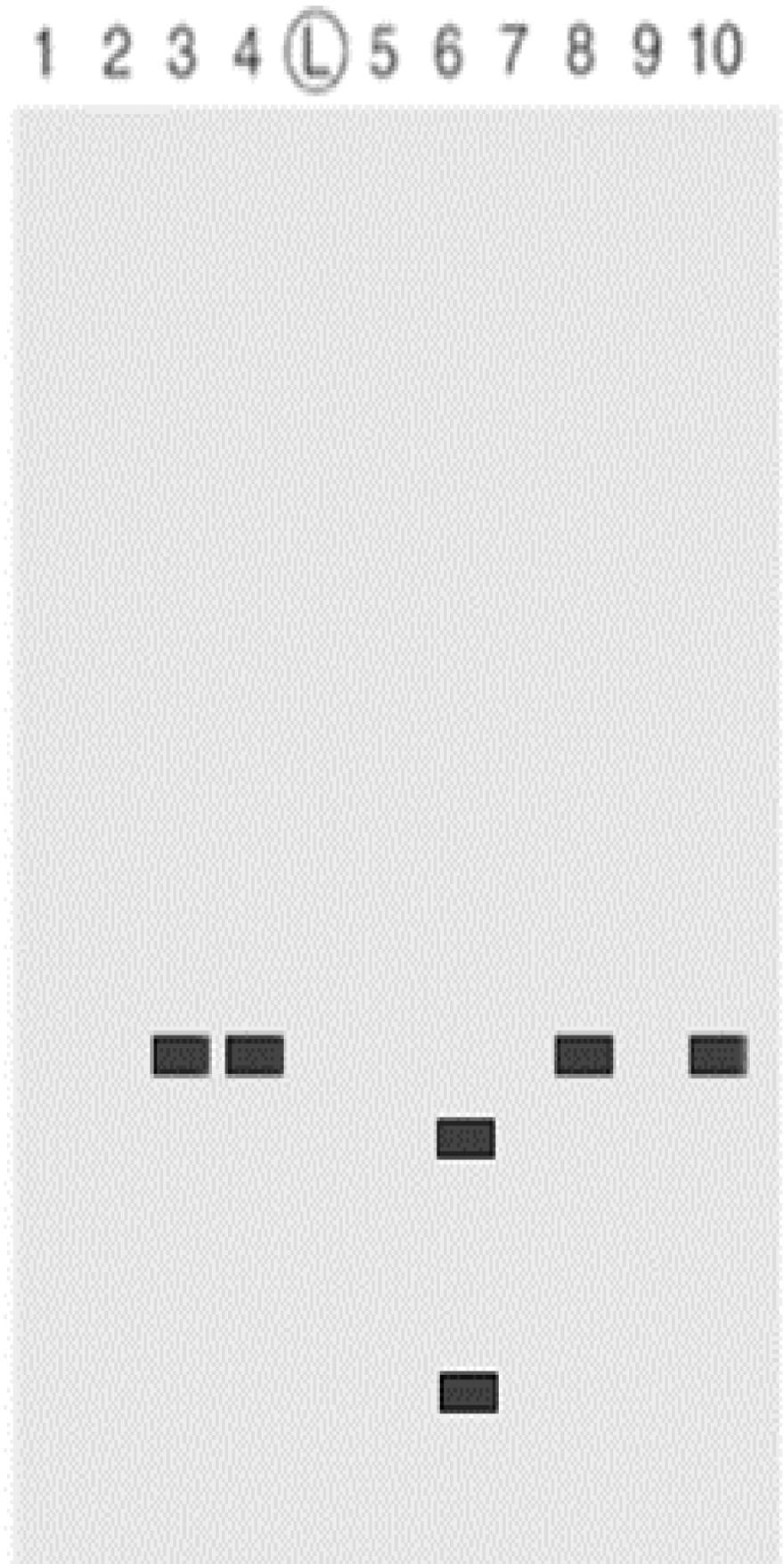
Analisi dei dati ottenuti



L'autoradiografia è una tecnica che permette di studiare l'impronta fotografica prodotta dalle radiazioni emesse da atomi radioattivi.



Nel Southern blot la presenza della banda mostra che una sequenza di DNA è stata legata alla sonda.



Lane
1

Lane
2

Lane
3

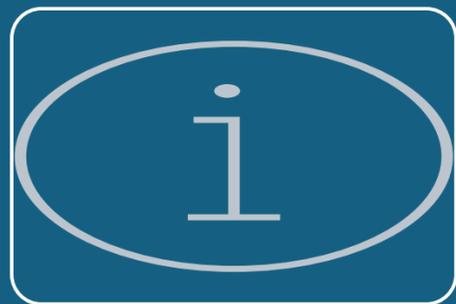
MWt

6-2kb

Le
immagini
forniscono



La posizione delle molecole di DNA ibridate.



Il numero e la loro dimensione.

3.4kb

Limiti e vantaggi e confronto con altre tecniche



Acquisire dati quantitativi.

Identificare sequenze nucleotidiche specifiche, mutazioni, delezioni, riarrangiamenti genetici.

Non si basa sull'amplificazione PCR.

È utile per l'analisi di sequenze ripetitive.

Buona sensibilità.

Ottima specificità.

Costi elevati.

Il gel può essere schiacciato dalle carte da filtro, riducendo l'azione capillare.

Tempi di esecuzione molto lunghi.

Le sonde marcate radioattivamente sono pericolose e costose.

Quantità grande di DNA input.

Non è scalabile.

Possono portare a risultati atipici.

Tecnica	Western Blot	Northern Blot	Macchia del sud
Molecola bersaglio	Proteina	RNA	DNA
Preparazione del campione	Estrazione delle proteine	Isolamento dell'RNA	Estrazione del DNA
Separazione	Elettroforesi su gel/SDS-PAGE	Elettroforesi su gel	Elettroforesi su gel
Materiale della membrana	Nitrocellulosa/PVDF	Nylon	Nylon
Sonda	Utilizza un singolo anticorpo primario o una combinazione di anticorpi primari e secondari coniugati a un fluoroforo o a un enzima	RNA, DNA o oligodeossinucleotide	Sonda per acido nucleico
Rilevamento	Pellicola, telecamera CCD, sistema di imaging a LED o a infrarossi	Pellicola radiografica, chemiluminescenza	Pellicola radiografica, chemiluminescenza

Oggi sono disponibili metodi più rapidi di blotting, come il trasferimento sottovuoto.

La tecnica del Southern blotting è stata poi ampliata alle proteine e alle molecole di RNA.

Confronto tra la reazione a catena della polimerasi e l'analisi Southern Blot nel rilevamento e nella tipizzazione dell'acido desossiribonucleico del virus del papilloma umano nei tumori del tratto genitale femminile inferiore

Monaco, Bradley JMD; Cuoco, Nathan BS; Ahn, Chul Ph.D.; Vasilev, Steven AMD; Berman, Michael LMD; Wilczynski, Sharon P Ph.D.

[Informazioni sull'autore](#) 

Diagnostica Molecolare Patologia 3(4):p 283-291, dicembre 1994.

Confronto tra Southern Blot e analisi qPCR della lunghezza dei telomeri dei leucociti nello studio Health ABC

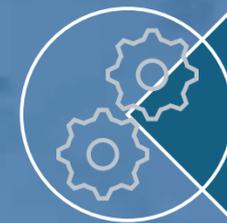
[Clara C. Elbers](#) , ¹ [Melissa E. Garcia](#) , ² [Masayuki Kimura](#) , ³ [Steven R. Cummings](#) , ⁴ [Mike A. Nalls](#) , ⁵ [Anne B. Newman](#) , ^{6, 7} [Vicki Park](#) , ⁸ [Jason L. Sanders](#) , ^{7, 9} [Gregory J. Tranah](#) , ¹⁰ [Sarah A. Tishkoff](#) , ¹ [Tamara B. Harris](#) , ² e [Abraham Aviv](#) ³

✉

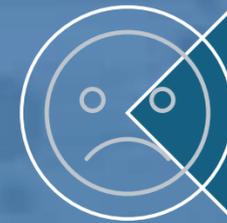
► [Informazioni sull'autore](#) ► [Note sull'articolo](#) ► [Informazioni su copyright e licenza](#) [Dichiarazione di non responsabilità di PMC](#)

La scelta tra le due tecniche dipende dall'obiettivo dell'analisi e dalle informazioni che si desidera ottenere.

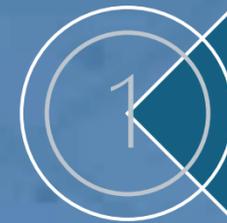
In generale, si differenziano per:



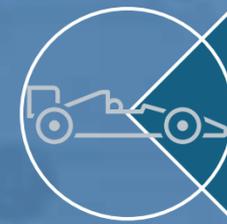
Principio di base



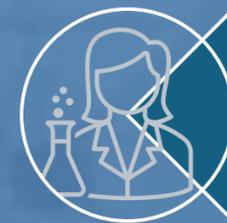
Sensibilità



Specificità



Velocità



Applicazioni

Campi di applicazione

- Identificazione di infezioni virali e di alcune infezioni batteriche.
- Utile anche nello studio delle mutazioni e dei riarrangiamenti genici, ad esempio viene utilizzato per identificare la presenza del gene mutato della globina β che causa l'anemia falciforme.
- Diagnosi delle malattie neonatali.
- Negli studi filogenetici.
- Nell'analisi di paternità e maternità.
- Negli studi forensi nell'identificazione personale.
- Conferma dei risultati di esperimenti di clonazione o knockout.



Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)/ Francesca Decorosi.

– Firenze : Firenze University Press, 2010. Premio FUP. Tesi di dottorato

Digerito con
enzimi di
restrizione
MluI e PvuII

Depurato
e
denaturato

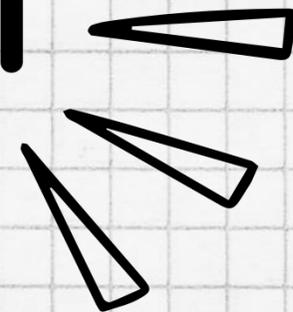
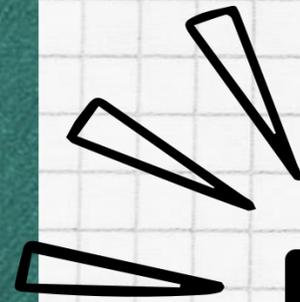
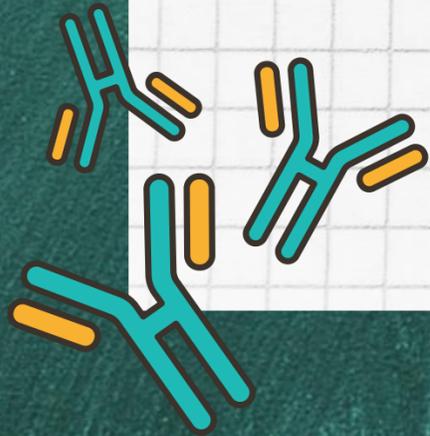
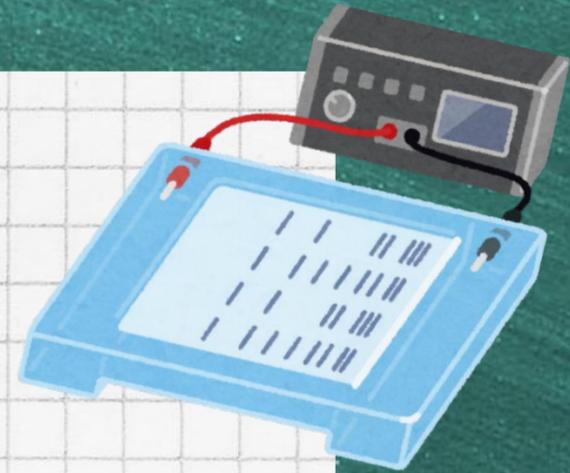
Ibridato

Sottoposto
a elettro
foresi su gel
di agarosio

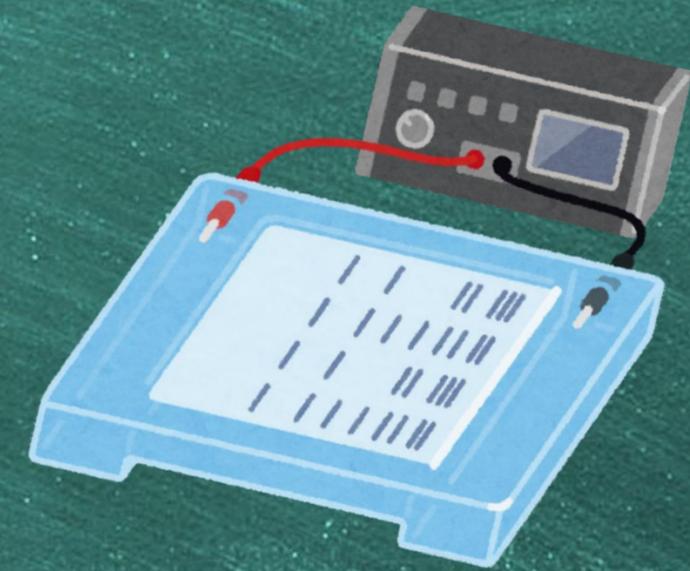
Trasferito su una membrana
di nitrocellulosa o nylon,
tramite capillarità o con
l'applicazione di corrente
elettrica.

Se avveniva l'ibridazione, il gene di
resistenza alla kanamicina era presente
nel DNA dei mutanti.

ELETTROFORESI



ELETTROFORESI



É una tecnica analitica che ci consente di separare e identificare le biomolecole dotate di una carica, contenute all'interno di una miscela elettroforetica.



É un fenomeno *elettrocinetico*, perchè sfrutta il fatto che le molecole dotate di una carica elettrica se poste all'interno di un campo elettrico esse si muoveranno in funzione della loro carica e massa, contro coefficiente frizionale.



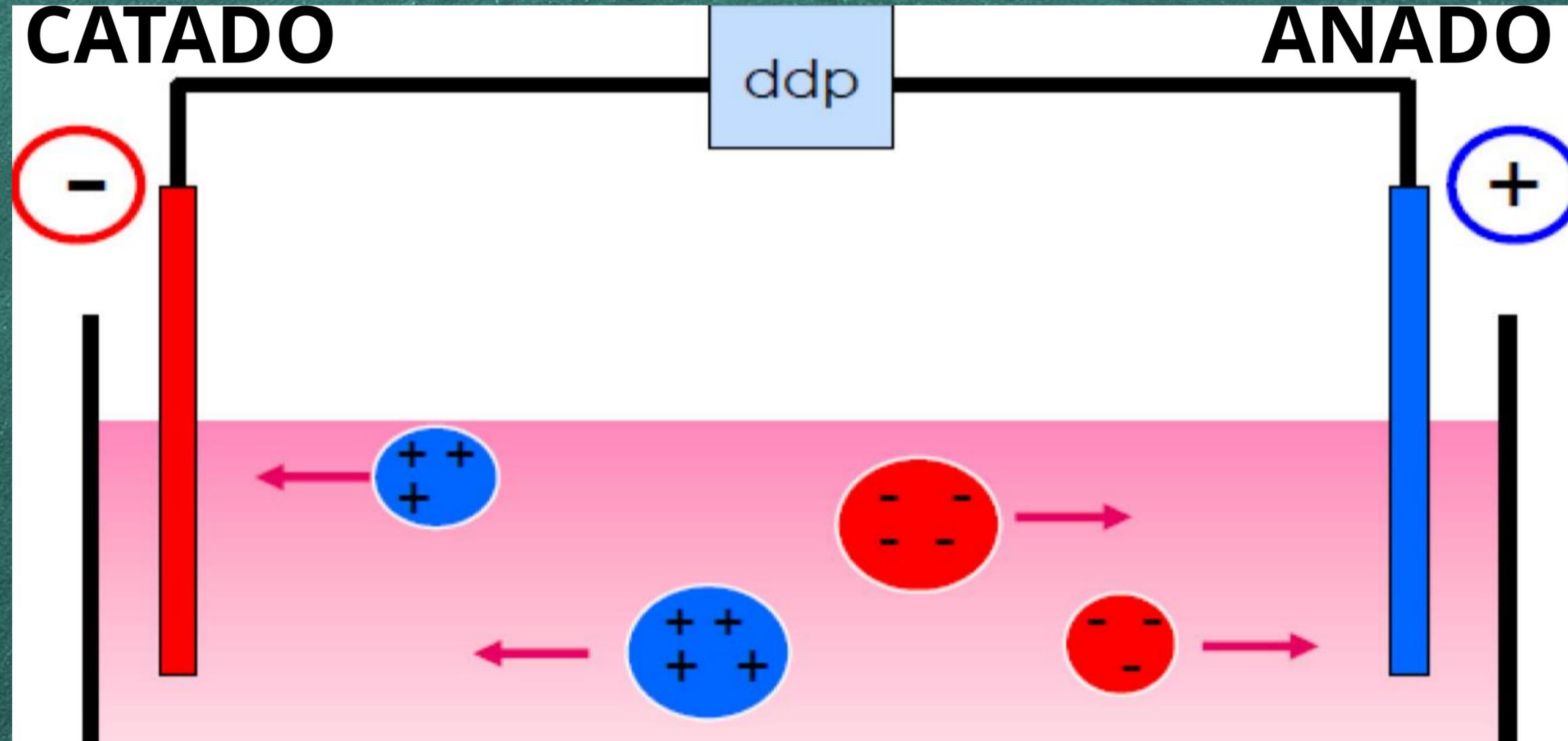
Velocità della corsa elettroforetica.

$$V = \frac{E * Q}{f}$$

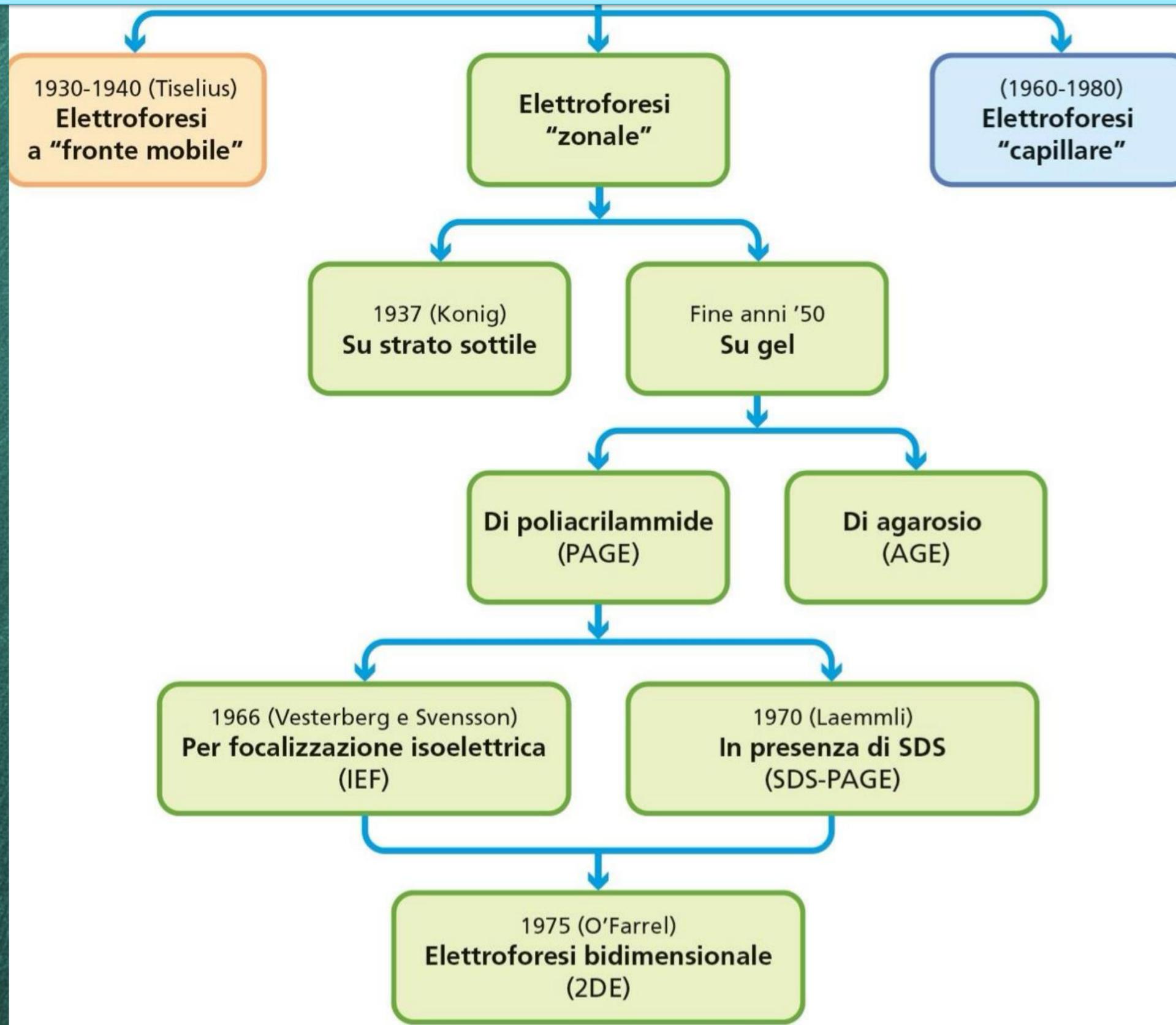
Dimensione

Voltaggio

Viscosità del mezzo elettroforetico

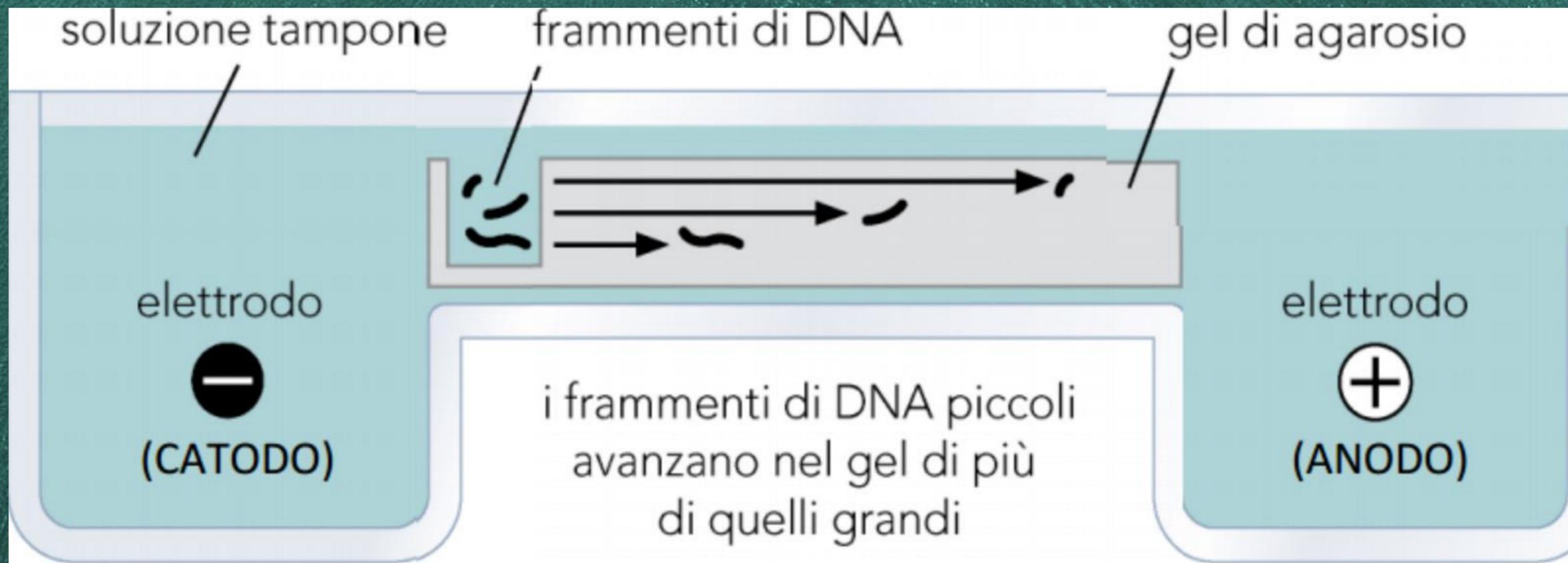


Tecniche Elettroforetiche



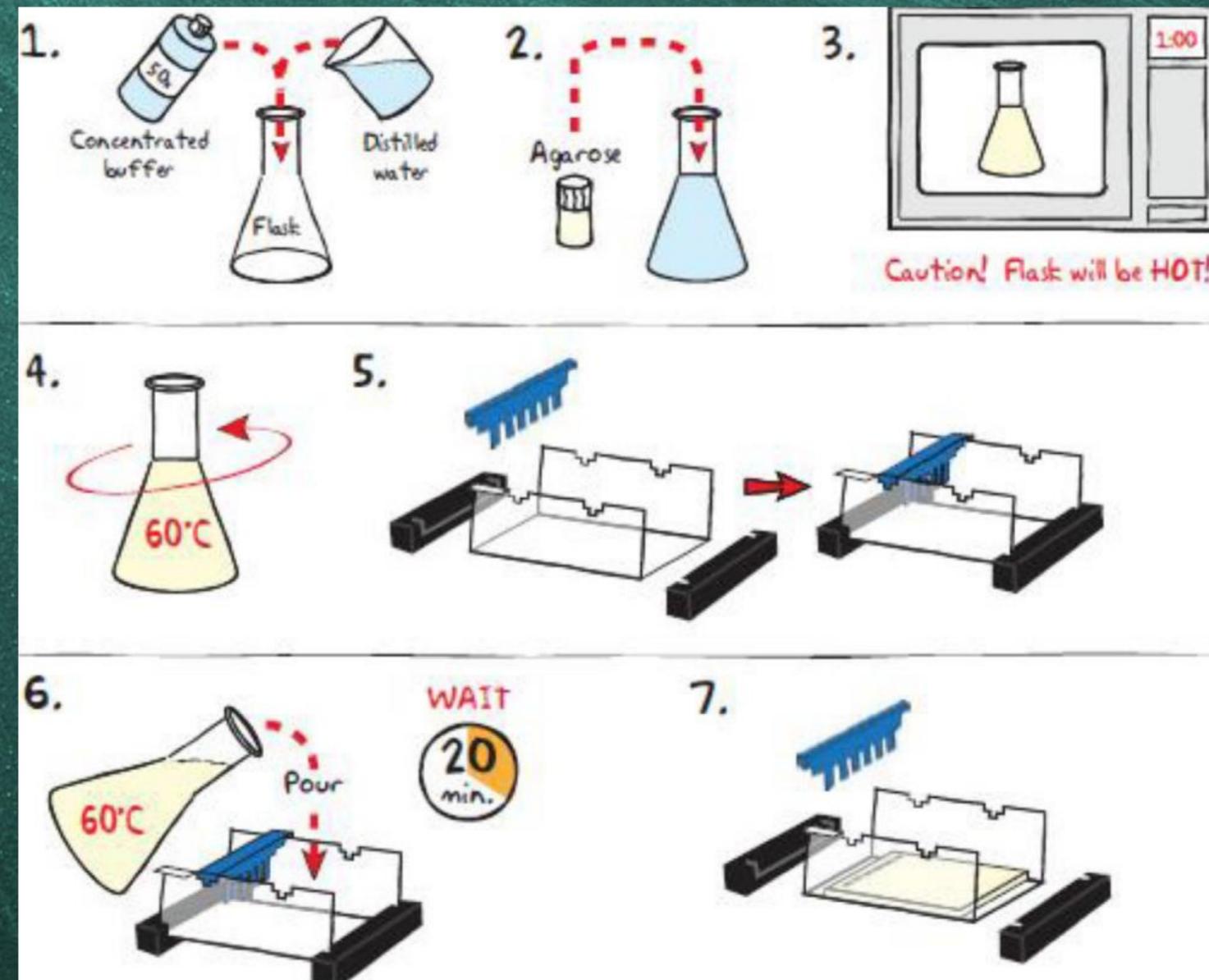
Elettroforesi su Gel di Agarosio

Avviene in orizzontale ed è la tecnica più usata per separare i frammenti di acidi nucleici con dimensione variabile, dalle 50bp alle 50.000 bp e proteine complesse.



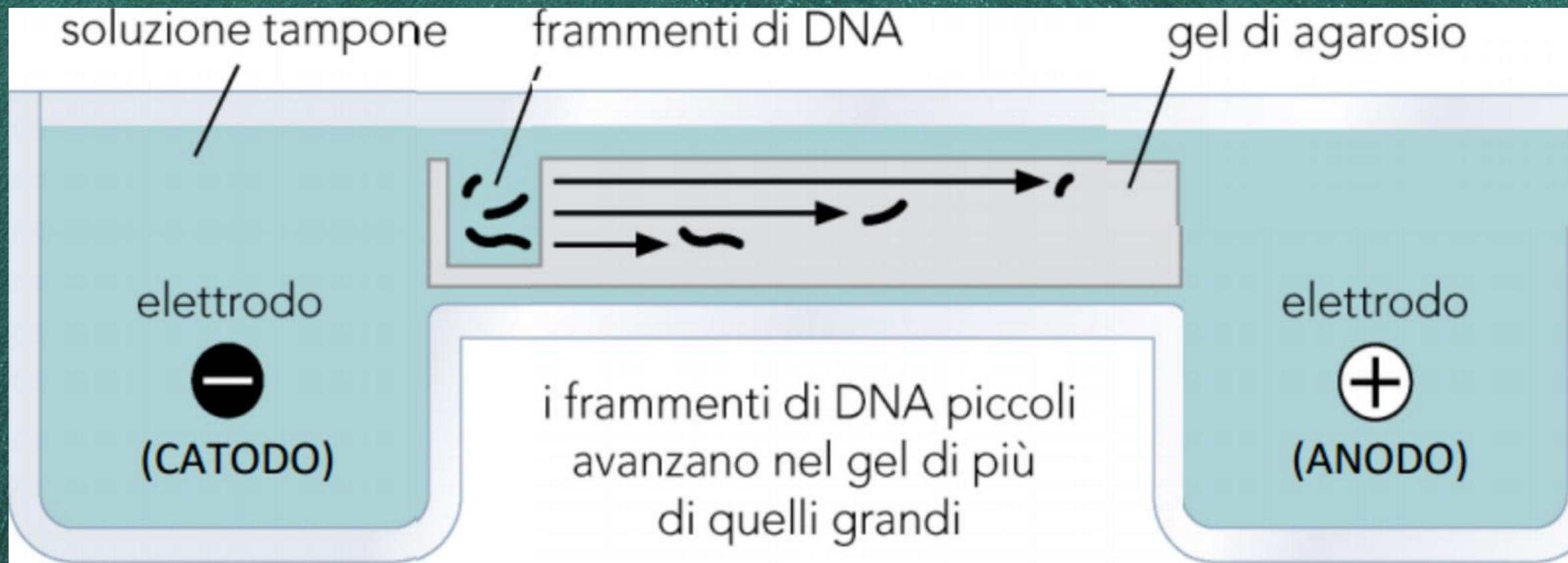
Preparazione del Gel di Agarosio

È semplice, si porta ad ebollizione l'agarosio, che lo si trova sotto forma di polvere, mescolato al tampone e in seguito la soluzione ottenuta si versa in uno stampo dove avviene la gelificazione, viene posto in superficie il pettine che servirà durante la fase di solidificazione nella creazione dei pozzetti ossia le cavità dove andranno inseriti i nostri campioni.



Elettroforesi su Gel di Agarosio

Una volta solidificato il gel, viene immerso nel tampone che consiste in una soluzione salina, importante perchè oltre a condurre l'elettricit  controlla anche il pH. Una volta inserito il campione nei pozzetti, la camera viene collegata a due elettrodi in modo tale da generare un campo elettrico e si osserva la corsa elettroforetica.



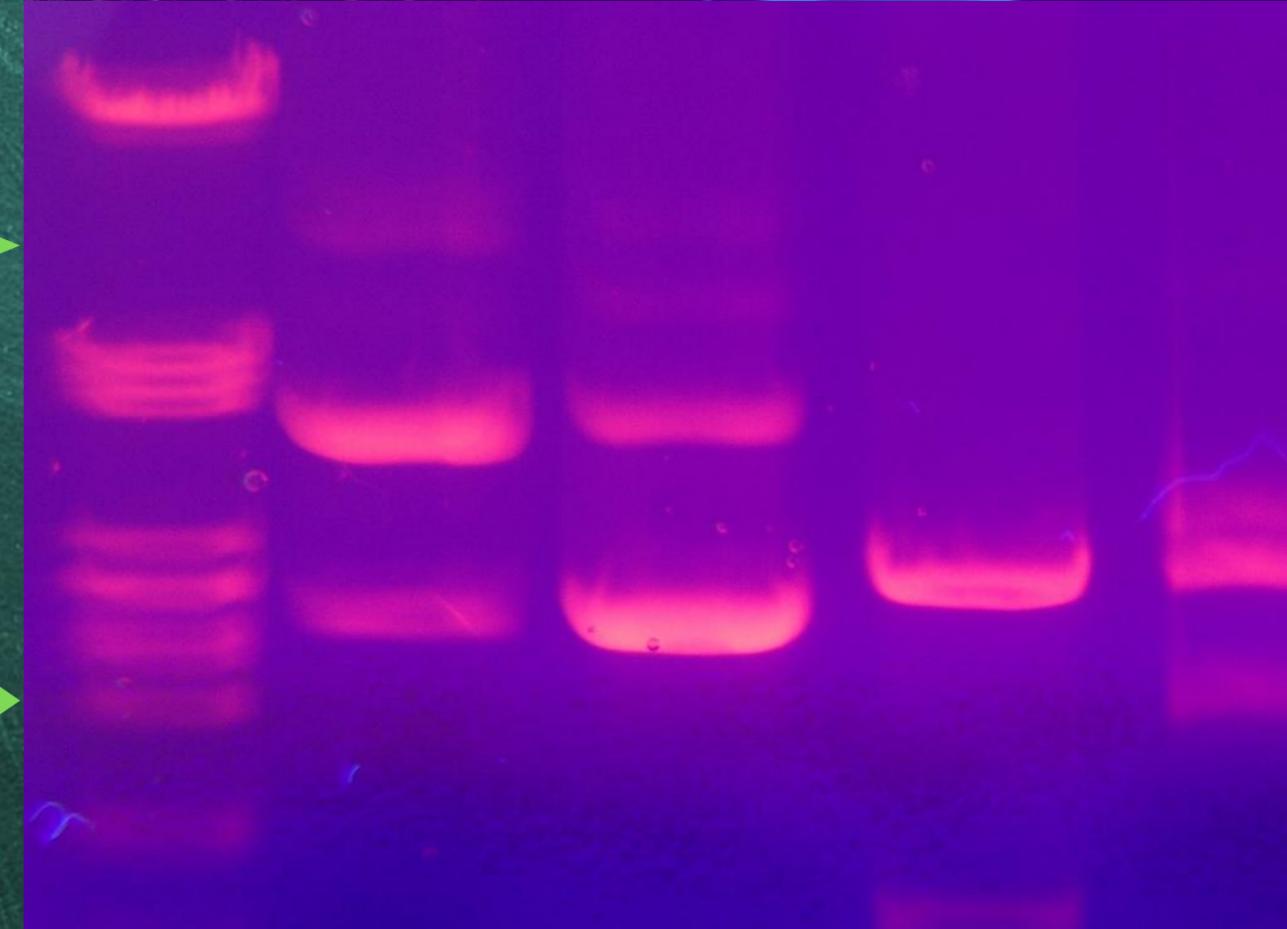
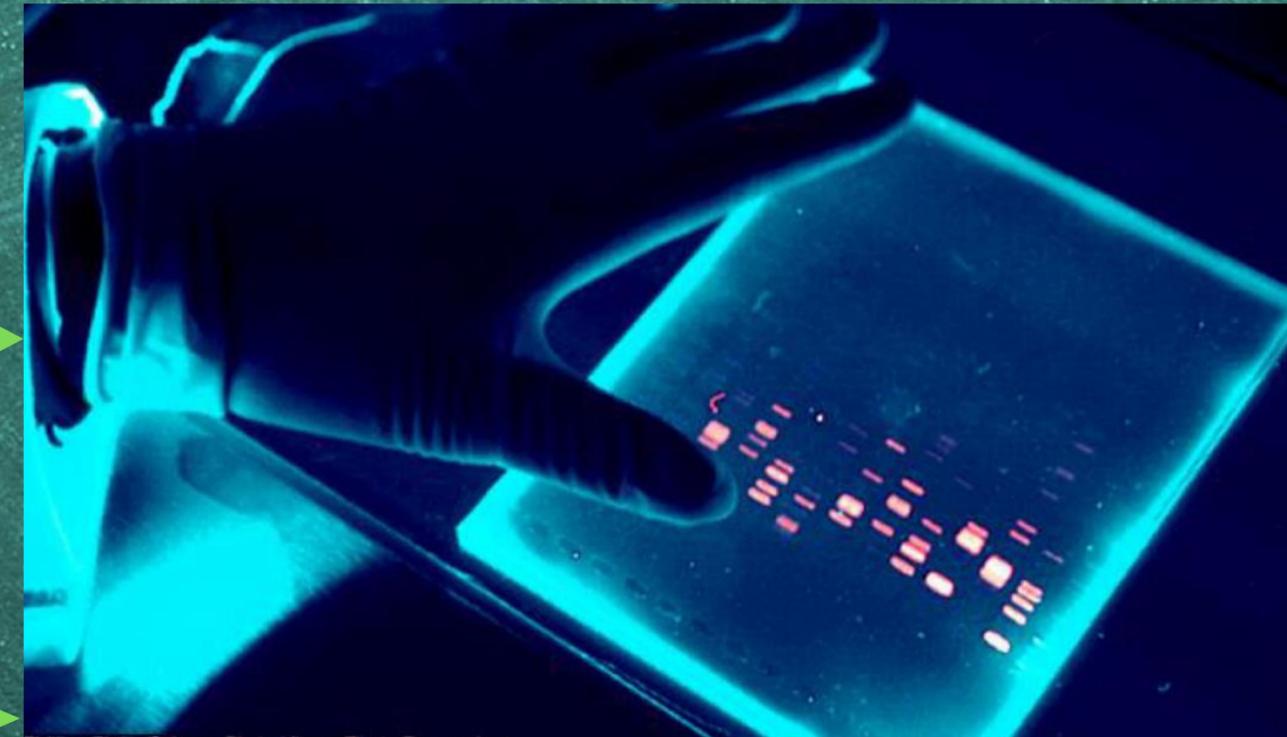
Colorazioni usate

Nei pozzetti oltre al campione, viene inserito il colorante che permette di essere un marker visivo della corsa elettroforetica.

Bromofenolo, una molecola piccola per cui migrerà insieme ai frammenti piccoli.

Xilene Cianolo, molecola grande per cui migrerà insieme ai frammenti grandi.

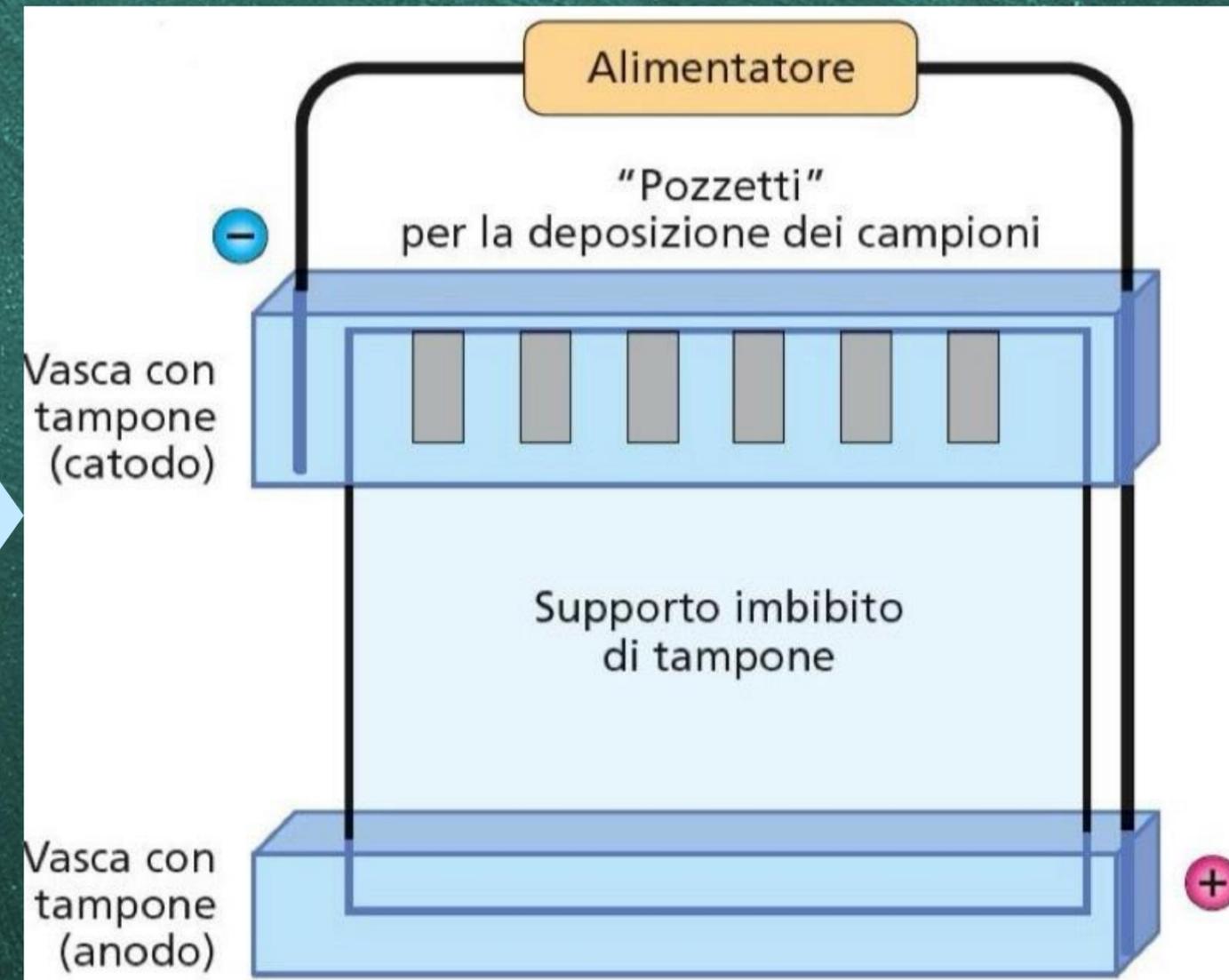
Al termine della corsa elettroforetica si possono visualizzare gli acidi nucleici con il Bromuro di Etidio, una molecola che emette fluorescenza una volta esposta ai raggi UV.



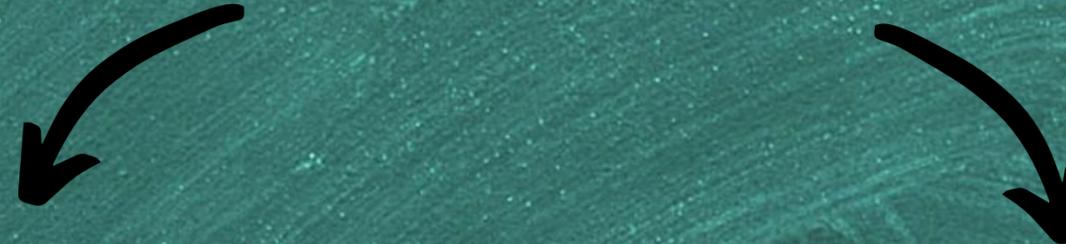
Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide

Nota con il nome di PAGE, avviene in verticale, è un gel difficile da preparare, è più costoso e si ottiene da sostanze tossiche.

Ci permette di studiare frammenti di acidi nucleici inferiori a 500bp e ci permette di separare la maggior parte delle proteine, questo perché il gel di Agarosio genera pori che sono più larghi rispetto al gel di Poliacrilammide.



Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide



PAGE - NATIVA: le proteine si separano in funzione della loro dimensione e della loro carica, si può utilizzare anche un gel a gradiente con pori più grandi in alto e pori più piccoli in basso per rendere la separazione più raffinata.

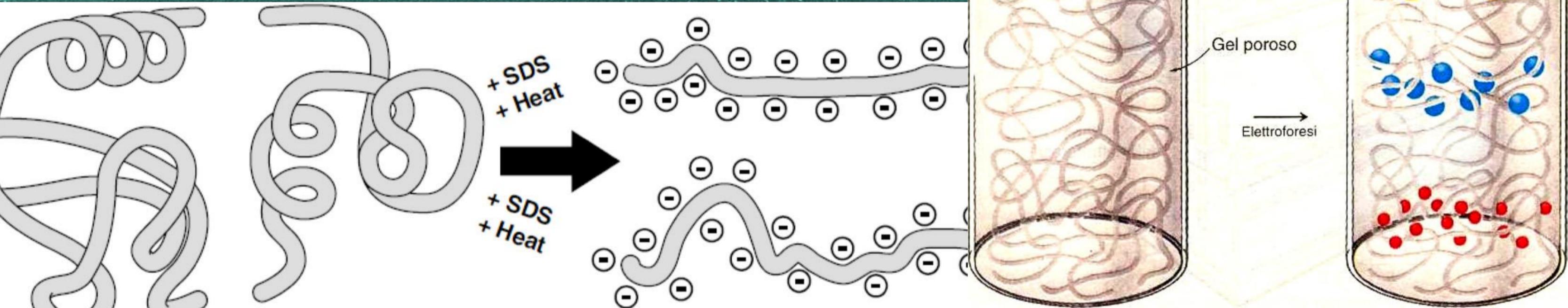
SDS - PAGE: le proteine si separano solo in funzione della loro dimensione.

Elettroforesi su SDS-PAGE



Il Sodio Docecil Solfato è un detergente che ci permette di rompere i legami non-covalenti per cui va a denaturare le proteine e conferisce loro carica negativa, in modo tale che la loro corsa elettroforetica dipenderà esclusivamente dalla loro dimensione.

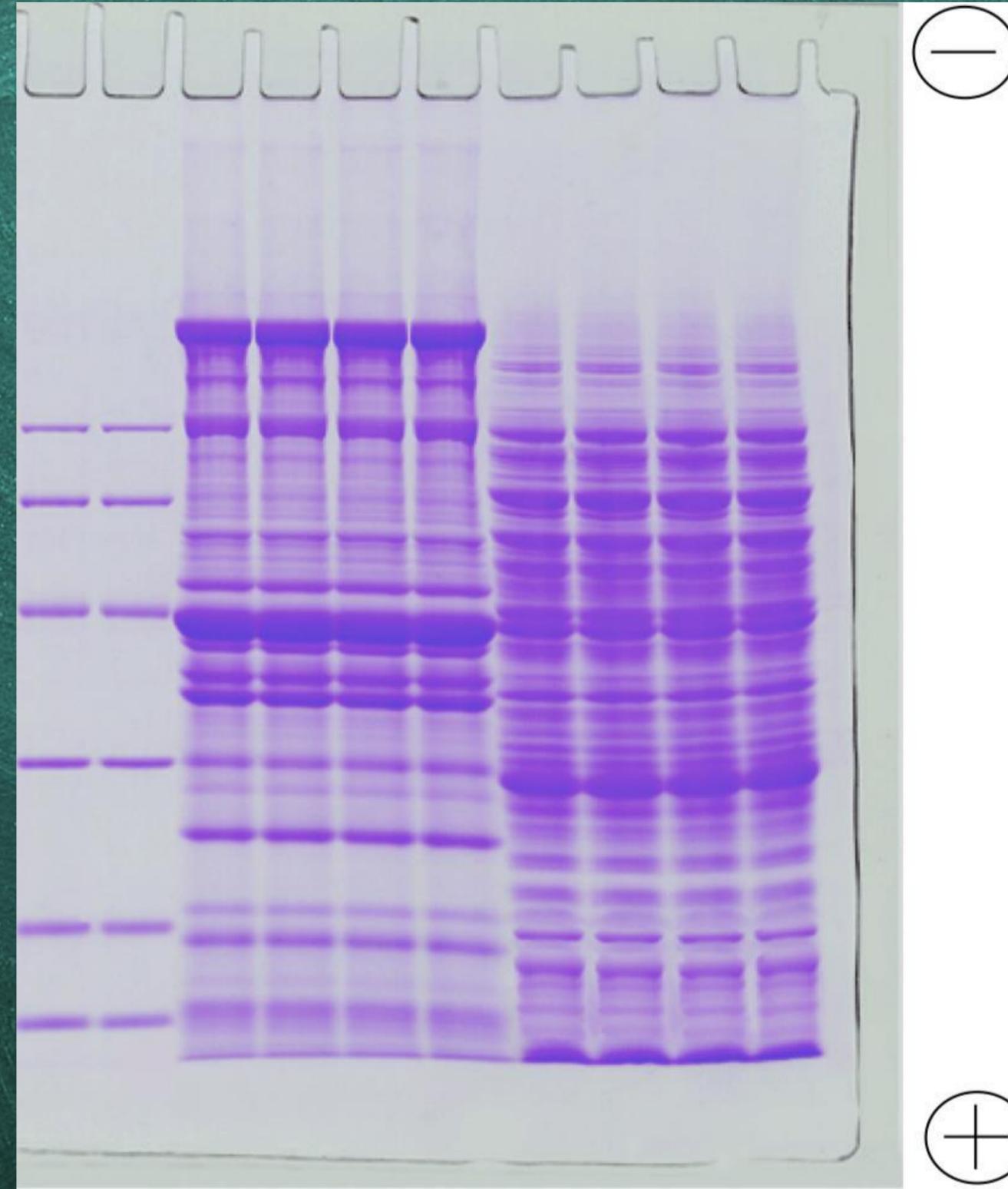
$$v = Eq/f$$



Colorazioni usate



Il più utilizzato è il *Blue Coomassie Brilliant*, capace di legarsi ai gruppi amminoacidici delle proteine, permettendoci così di visualizzare la corsa elettroforetica.



Applicazione Clinica



Take care
of your body



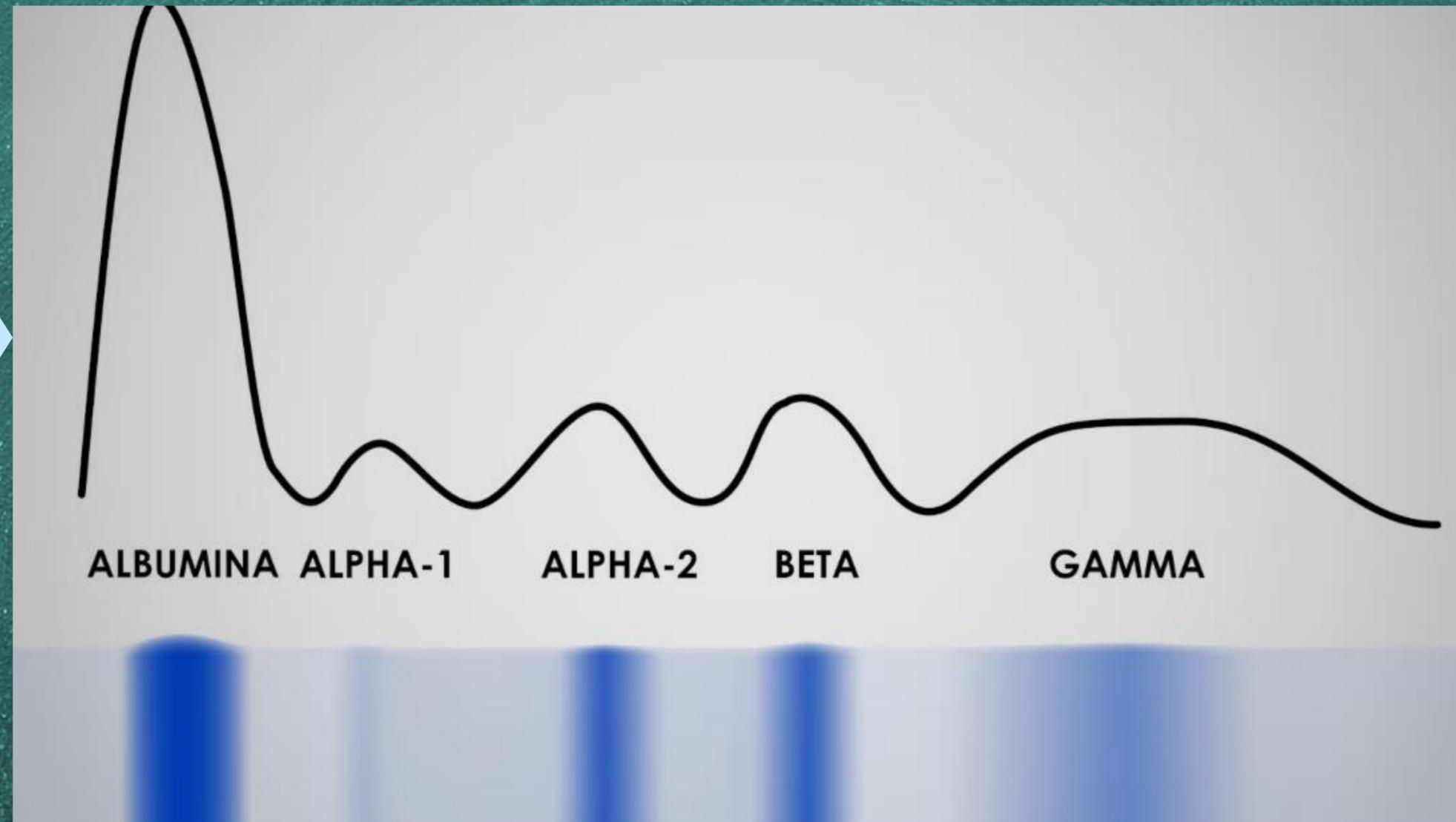
L'elettroforesi degli Acidi Nucleici serve come tecnica preliminare ad applicazioni successive come: clonaggio, PCR, Northern e Southern blotting ecc...

L'elettroforesi Proteica serve per diagnosticare o monitorare le malattie che come caratteristica hanno un'alterazione delle concentrazioni delle proteine nel plasma, urine o altri campioni biologici.



Applicazione Clinica

in questo grafico possiamo vedere un'elettroforesi delle proteine del siero; l'altezza della curva può essere immaginata come la quantità relativa di quello specifico tipo di proteine.



Valori normali:

Albumina: 3,6-5,3 g/dl

Alfa-1: 0,2-0,4 g/dl

Alfa-2: 0,4-0,8 g/dl

Beta: 0,6-1 g/dl

Gamma: 0,9-1,4 g/dl

Applicazione Clinica

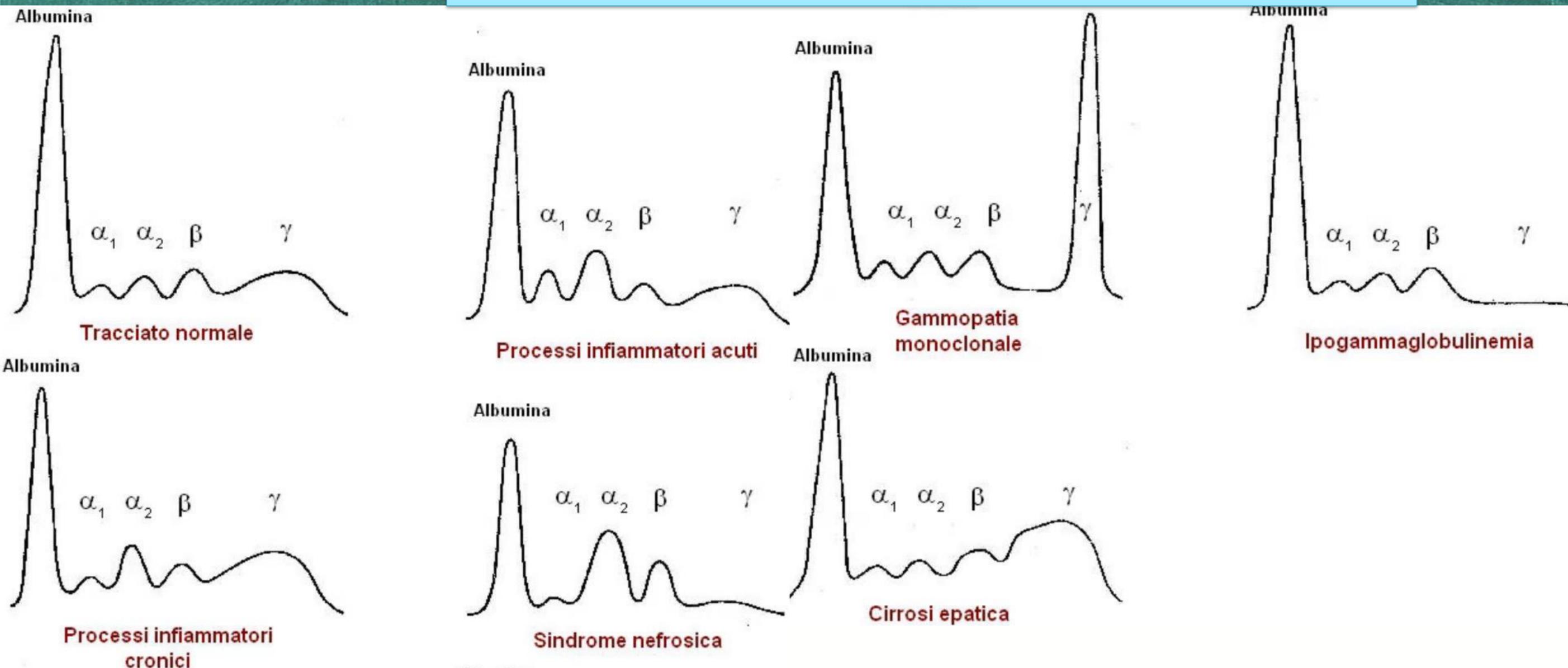
I risultati ottenuti mediante elettroforesi delle proteine possono variare ampiamente a seconda di fattori quali età, sesso, storia clinica e altri fattori (i valori di riferimento possono inoltre cambiare tra laboratori differenti).

ALBUMINA: Il livello di albumina è ridotto in caso di malnutrizione, una sofferenza del fegato, terapie ormonali e gravidanza; anche le ustioni gravi possono causare una riduzione della banda. I livelli di albumina sono invece aumentati nei pazienti con disidratazione.

Frazione Gamma: Il suo controllo é di grande interesse clinico, perché rappresenta la quantità di anticorpi in circolo (proteine del sistema immunitario).
Queste proteine possono aumentare in caso di:

- **Malattie infiammatorie**
- **Lupus**
- **Cirrosi**
- **Infezioni**
- **Tumori**
- **Mieloma multiplo**
- **Linfoma**

Applicazione Clinica



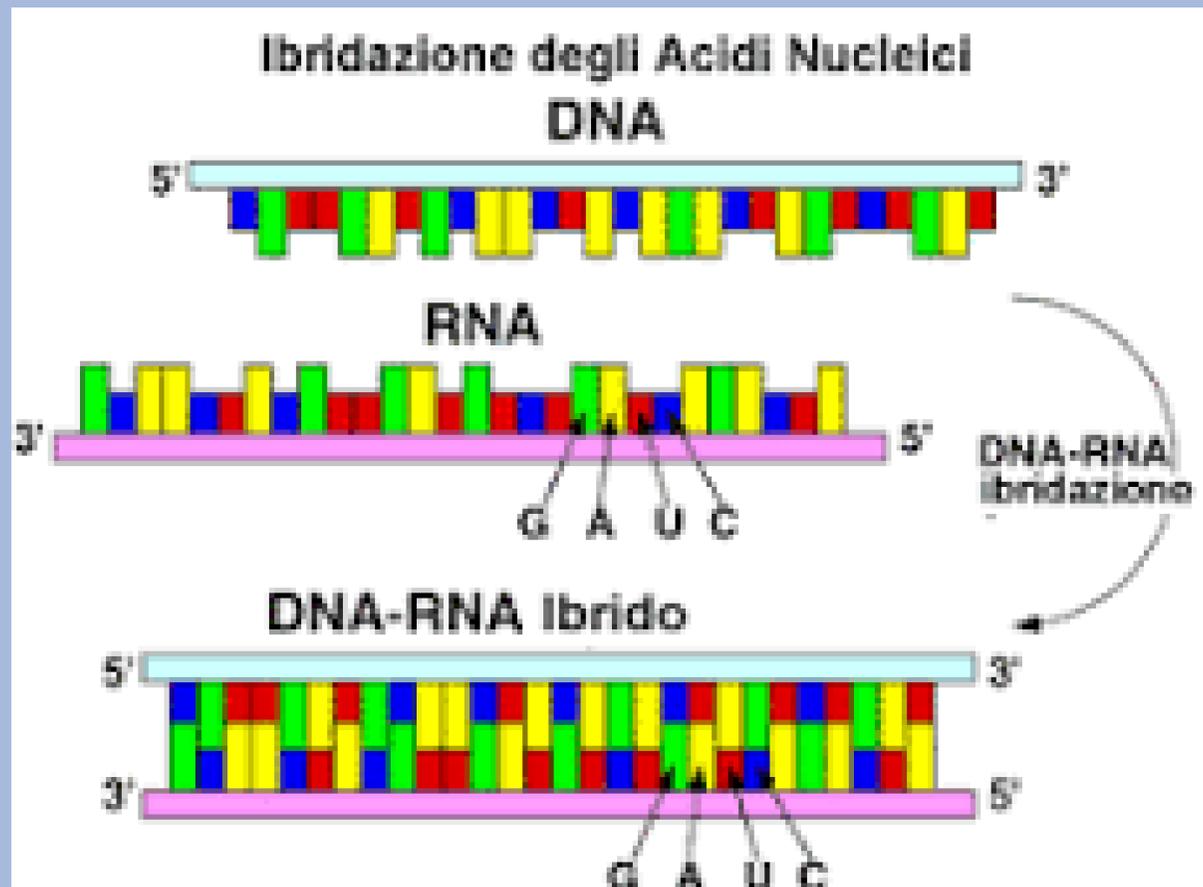
Per alcuni pazienti la prescrizione è semplicemente volta ad uno screening generale, ma tra i sintomi più specifici che potrebbero indurre il medico alla richiesta dell'esame figurano: perdita di peso inspiegabile, dolore osseo, stanchezza severa, nausea, debolezza, alti livello di calcio nel sangue ecc...



REAZIONI DI IBRIDAZIONE

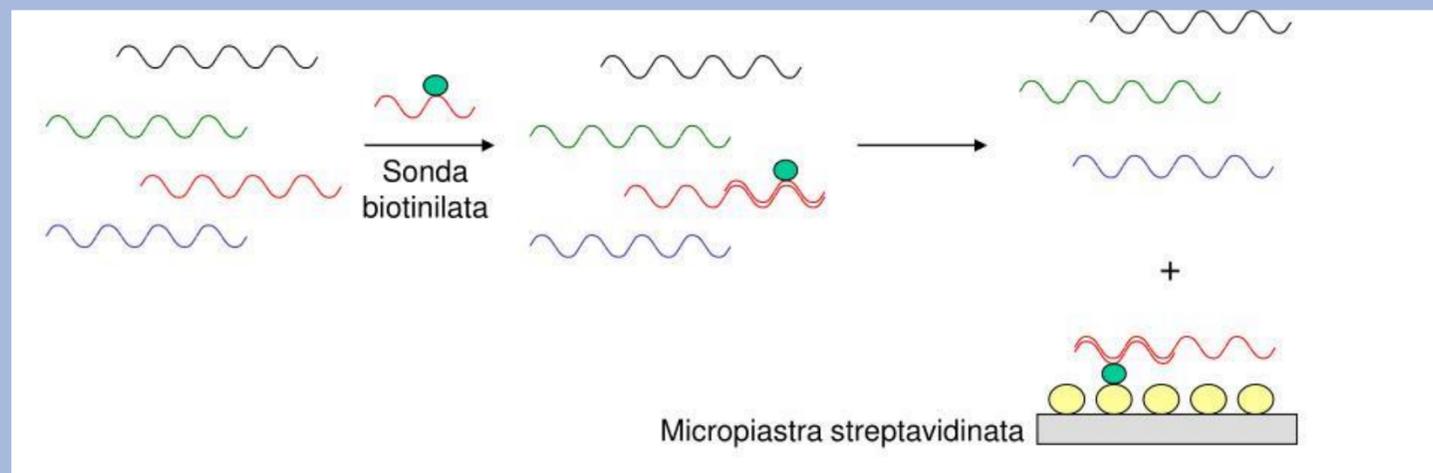
REAZIONI DI IBRIDAZIONE

La reazione di ibridazione è il processo grazie al quale si riassociano due filamenti di acido nucleico complementari di diversa origine per formare duplex stabili.

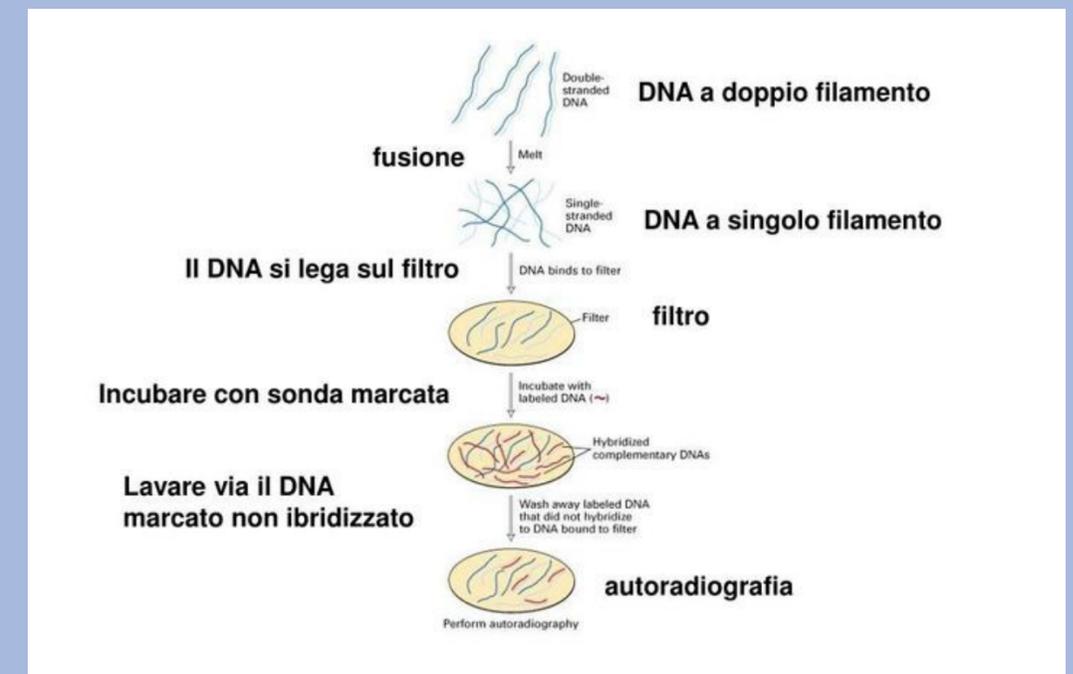


Queste reazioni vengono utilizzate in diagnostica molecolare per evidenziare una specifica sequenza genica tramite un legame specifico tra una sonda (o probe) e la sequenza complementare.

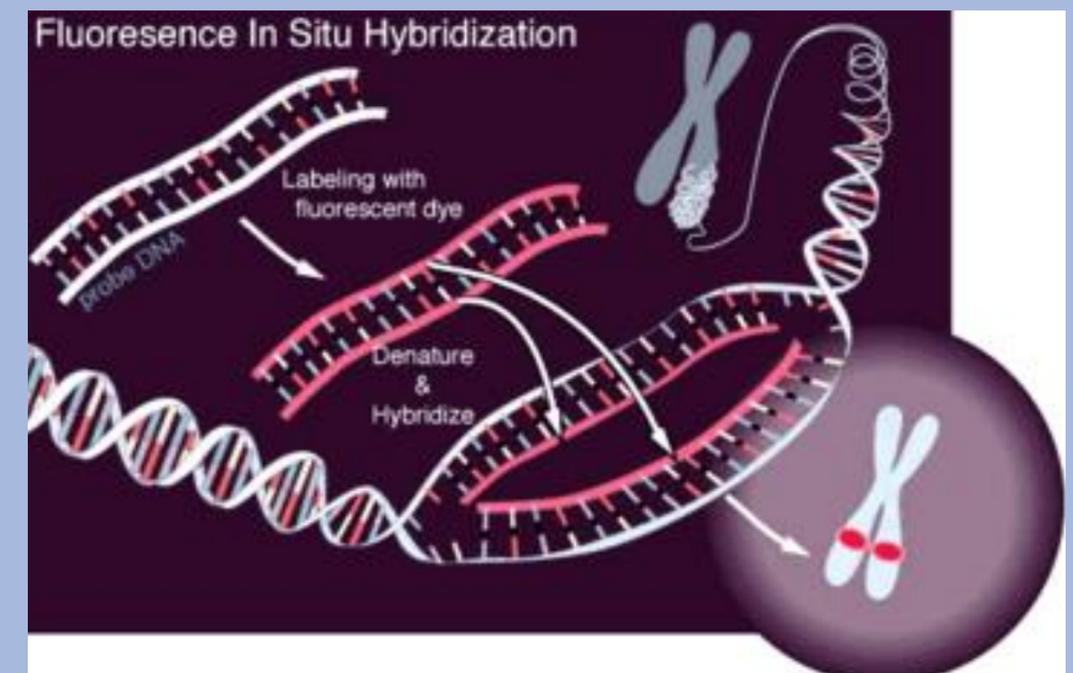
REAZIONI DI IBRIDAZIONE SU FILTRO O SU MEMBRANA



REAZIONI DI IBRIDAZIONE IN SITU



REAZIONI DI IBRIDAZIONE IN SOLUZIONE



PARAMETRI CHE INFLUENZANO L'IBRIDAZIONE



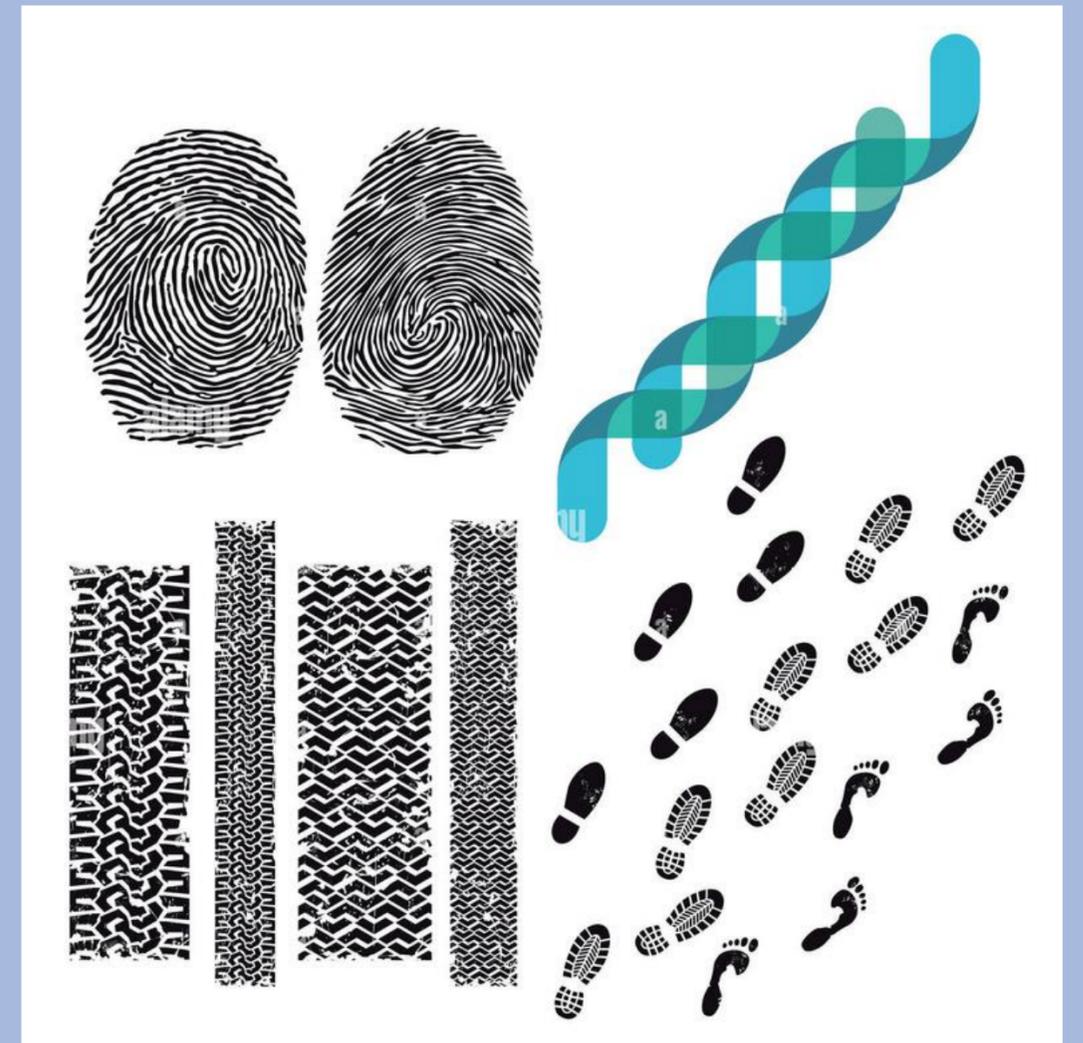
L'energia richiesta per separare due filamenti complementari di DNA dipende da numerosi fattori, i principali sono:

- TEMPERATURA
- LUNGHEZZA DEI FILAMENTI
- COMPOSIZIONE IN BASI
- PRESENZA DI DENATURANTI
- FORZA IONICA DELLA SOLUZIONE

Di solito l'ibridazione tra acidi nucleici avviene a temperature inferiori a quella della temperatura di melting (T_m) per favorire l'incontro tra le eliche complementari.

APPLICAZIONI

- Identificazione di mutazioni in sequenze nucleotidiche
- Identificazione dell'impronta genica

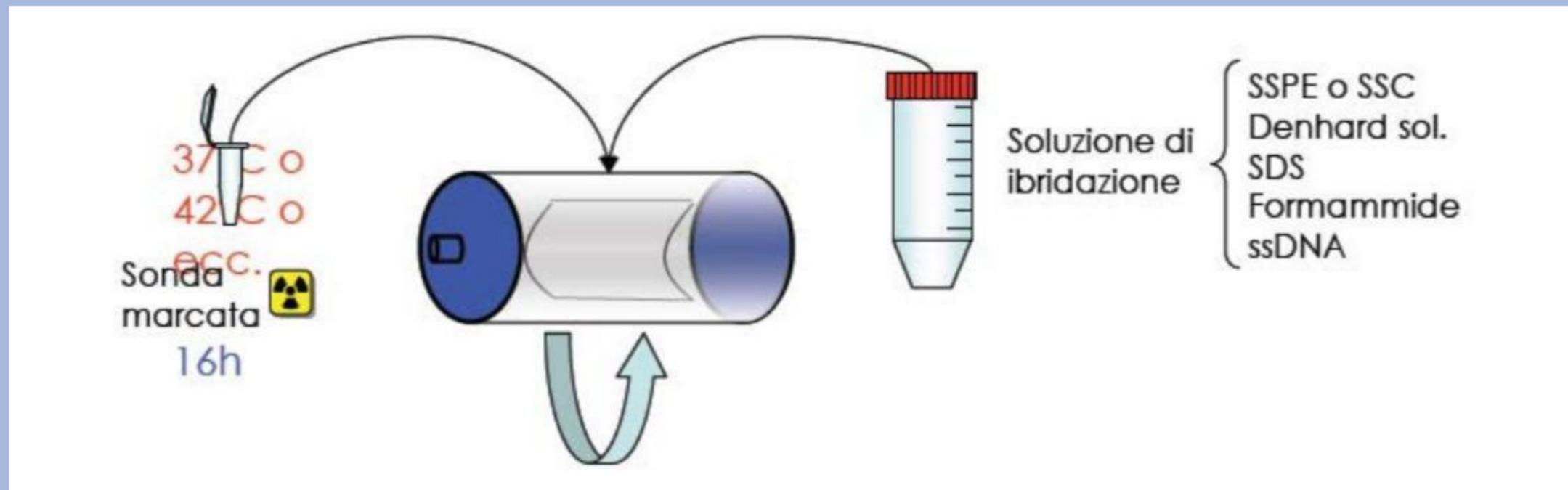


SONDE GENETICHE

Il filamento utilizzato per l'ibridazione di un DNA bersaglio può essere un oligonucleotide o un polinucleotide che prende il nome di sonda (o probe).

Una sonda genetica è un segmento di acido nucleico marcato, usato per identificare un determinato gene o una data sequenza nucleotidica entro una massa di DNA. La sonda identifica il gene tramite lo stabilirsi di legami a idrogeno tra sequenze complementari.

La sonda ed il bersaglio devono essere complementari e devono essere marcate altrimenti l'ibridazione non può essere rilevata.



MARCATURA ACIDI NUCLEICI

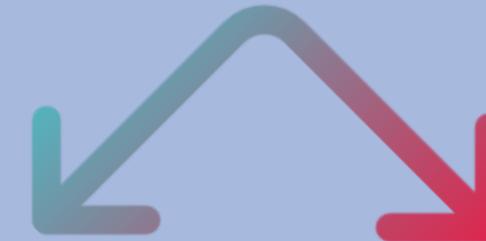
La marcatura degli acidi nucleici è una tecnica che ci permette di determinare e quantificare specifici frammenti di acidi nucleici (DNA o RNA), ma anche di studiarne l'organizzazione, la localizzazione intracellulare o l'espressione.



RADIOATTIVA

- terminale al 5'
- terminale al 3'
- interna

Può
essere:



NON RADIOATTIVA



DIRETTA

INDIRETTA

MARCATURA

(RADIOATTIVA)

Nella marcatura radioattiva la sonda incorpora nucleotidi radioattivi ed è rilevabile tramite
AUTORADIOGRAFIA

La sonda radioattiva viene fatta ibridare con il DNA bersaglio legato ad un filtro il quale è posto a contatto con una lastra sensibile ai raggi X. Le bande di DNA sul filtro che ibridano con la sonda radioattiva saranno rilevate con una macchia nera sulla lastra dopo lo sviluppo.

VANTAGGI

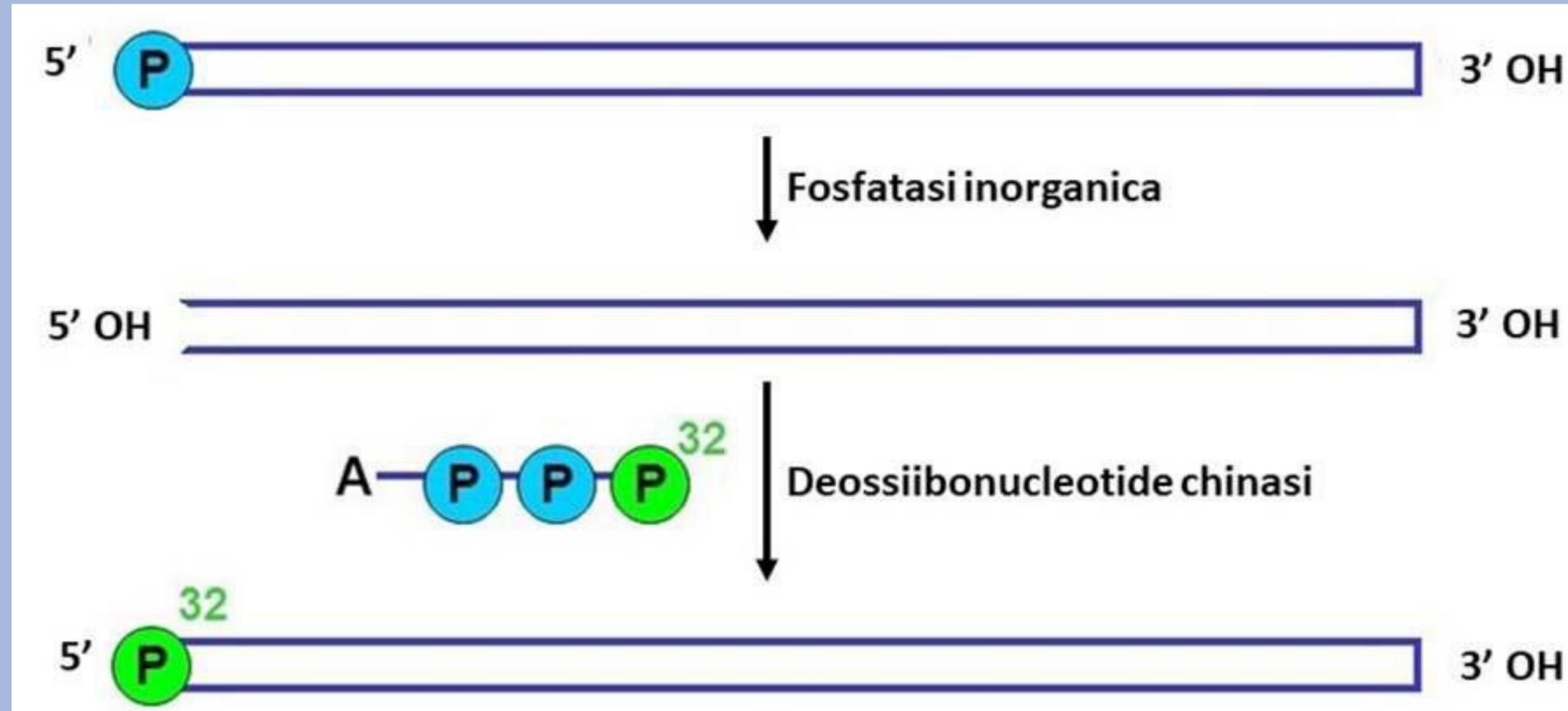
- Sono molto sensibili

SVANTAGGI

- Sono pericolosi perché mutageni;
- hanno vita breve quindi devono essere utilizzati subito.

MARCATURA

(TERMINALE AL 5')

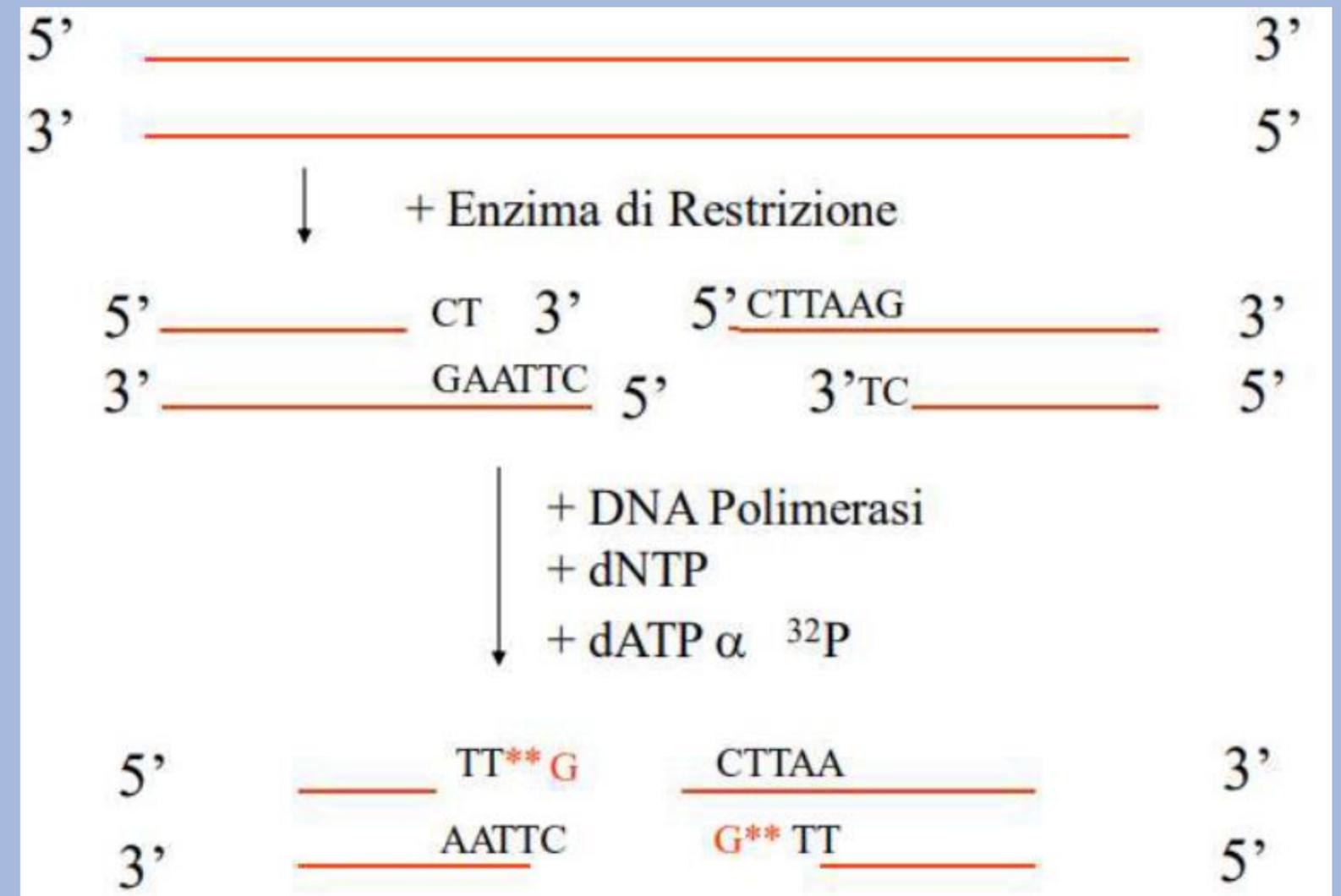


Innanzitutto, se il segmento ha un terminale 5'P bisogna rimuovere il fosfato freddo tramite una fosfatasi alcalina lasciando sull'estremità 5' il gruppo OH. Il fosfato eliminato deve essere sostituito con il ³²P in una reazione di fosforilazione catalizzata dalla deossiribonucleotide chinasi (polinucleotide chinasi). La reazione avviene in presenza di un precursore che ha il fosfato marcato in gamma (l'ultimo fosfato) che di solito è l'ATP.

MARCATURA

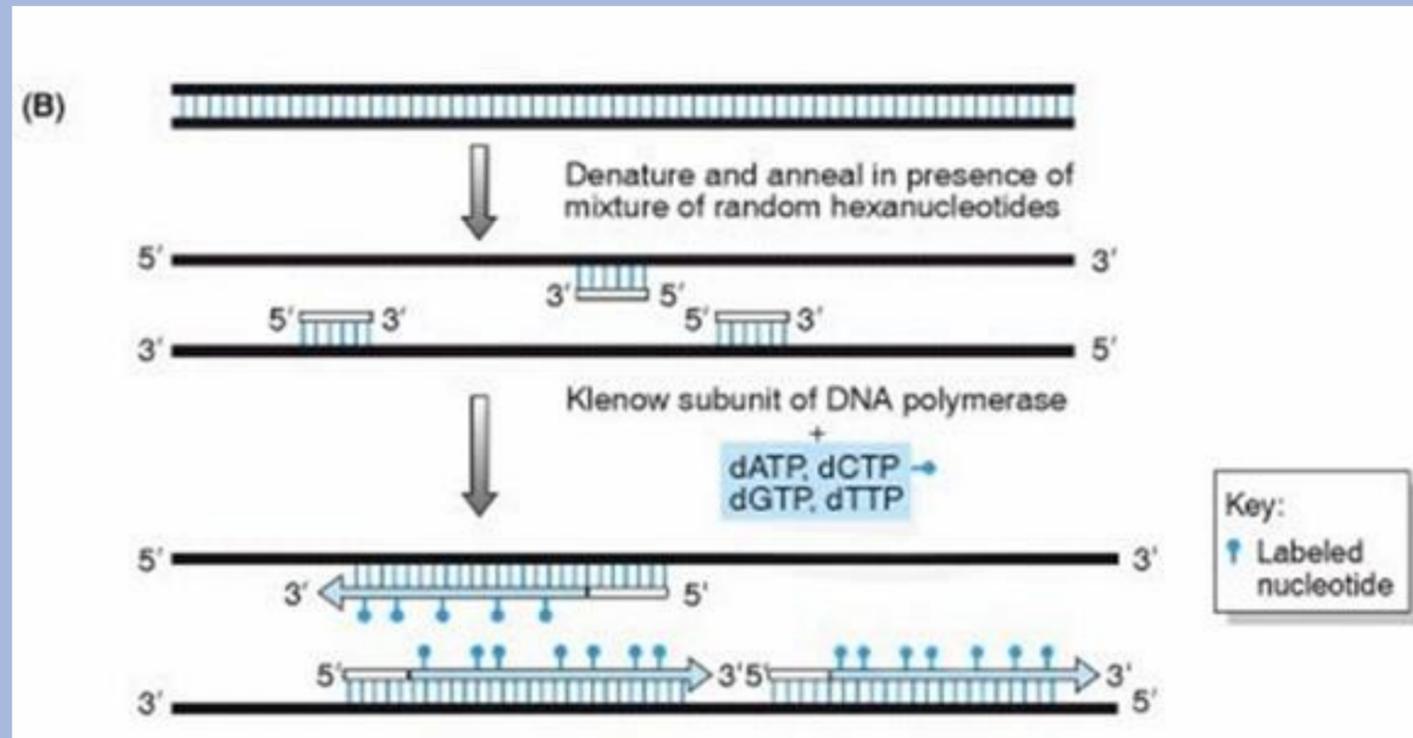
(TERMINALE AL 3')

- Bisogna creare delle estremità 3' recessive
- Si aggiunge alla miscela di reazione la DNA pol con i 4 precursori (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Almeno uno deve essere marcato con ^{32}P sul fosfato in alfa



MARCATURA

(INTERNA)



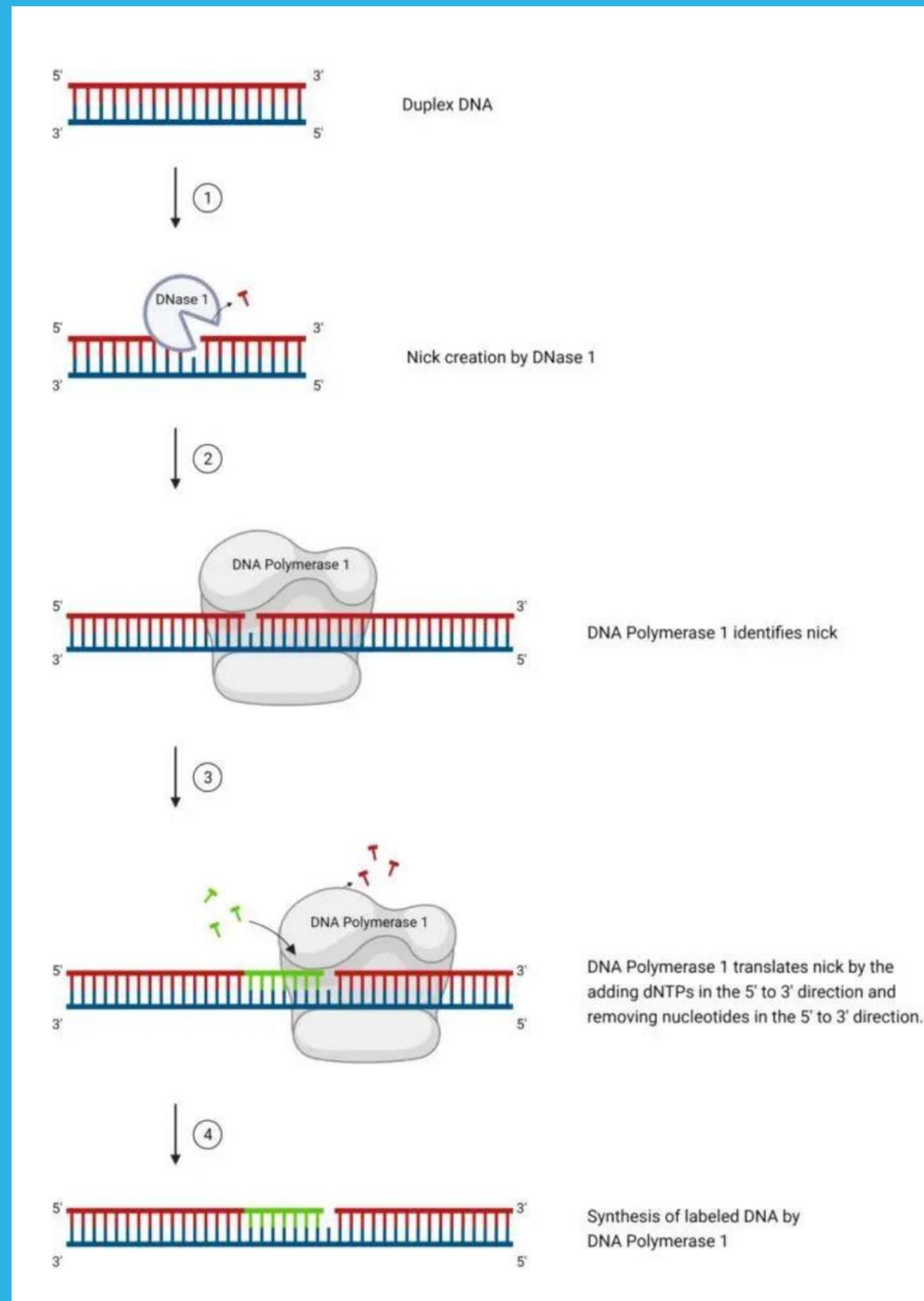
La marcatura radioattiva può essere eseguita con il metodo dei random primer. La sonda di DNA viene denaturata per bollitura e raffreddata rapidamente in ghiaccio. Primer di 6 bp vengono fatti associare al DNA e si forma il RANDOM PRIMER ESANUCLEOTIDICO. Questi primer vengono allungati dal frammento Klenow della DNA polimerasi I che usa dNTP.

NICK TRANSLATION

In una prima fase
l'endonucleasi DNase I produce
su entrambi i filamenti un nick.

La DNA polimerasi I identifica
il nick e si lega all'estremità
3'.

Il risultato della reazione sarà una
molecola a doppia elica marcata in
un'alta percentuale dei suoi nucleotidi.



Si aggiunge la DNA polimerasi I
con i 4 deossinucleotidi
trifosfati.

La DNA polimerasi I grazie
alla sua attività esonucleasica
elimina le basi non marcate e
con la sua attività
polimerasica le sostituisce
con quelle marcate.

MARCATURA

(NON RADIOATTIVA)

MARCATURA DIRETTA

La sonda complementare alla sequenza bersaglio ha il tracciante legato direttamente nella sua sequenza.

La marcatura può essere diretta attraverso fluoresceina.

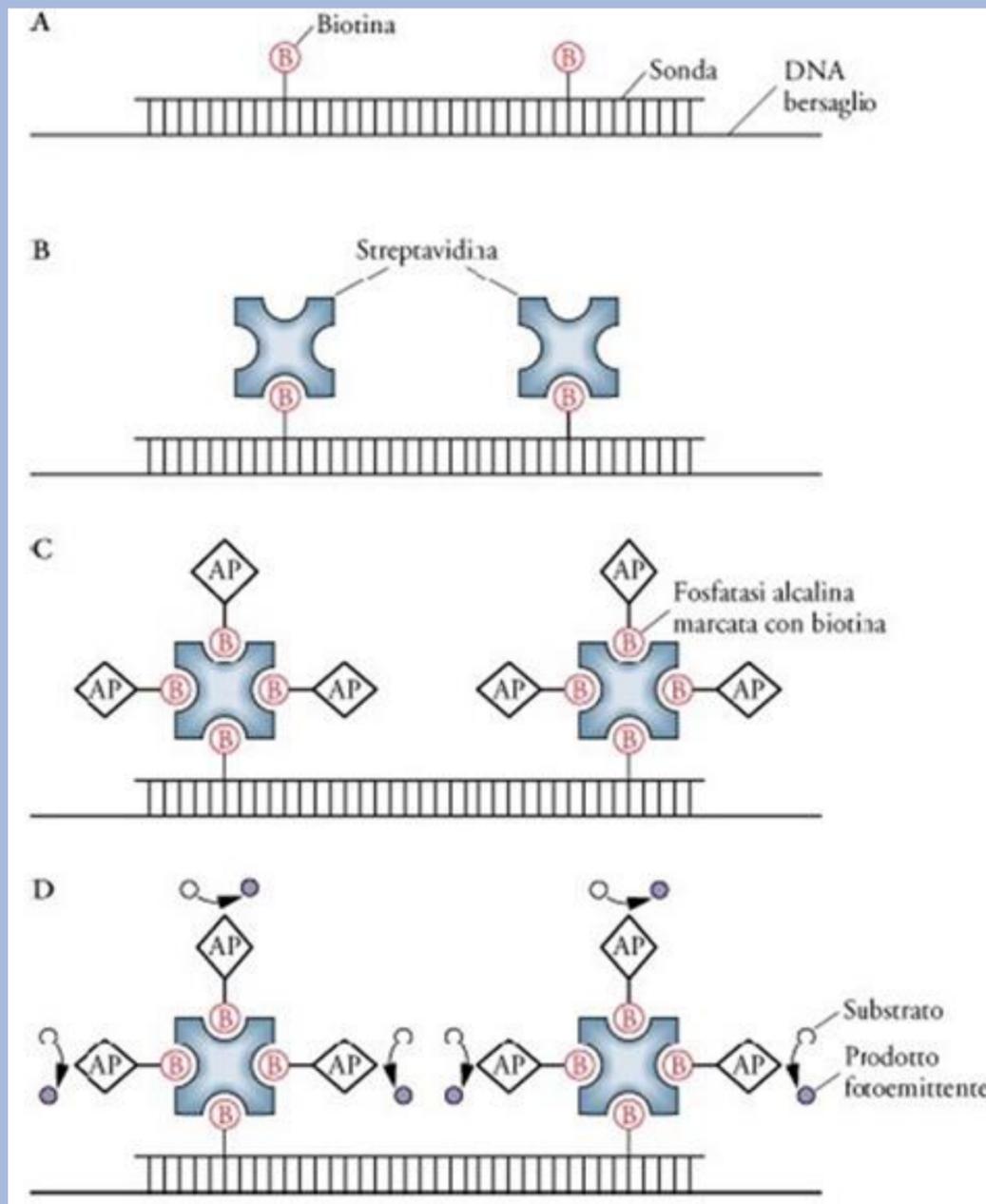
MARCATURA INDIRETTA

Un composto chimico specifico (aptene) viene legato covalentemente sulla sonda e verrà poi rivelato in modo selettivo attraverso una seconda molecola.

La marcatura può essere indiretta attraverso biotina o digossigenina.

SONDE NON RADIOATTIVE

Biotina, enzimi, chemiluminescenza, fluorescenza e anticorpi.



A.	Ibridazione della sonda marcata con biotina al DNA bersaglio.
B.	Si aggiunge avidina (o streptavidina) che va a legarsi alla biotina.
C.	Si aggiunge un enzima marcato con biotina come la fosfatasi alcalina o la perossidasi.
D.	Si aggiunge un substrato cromogeno o chemiluminescente dell'enzima. Si rileva il cambiamento di colore o emissione di luce per effetto della trasformazione del substrato in prodotto.

VANTAGGI

- Non sono pericolosi;
- il segnale ha lunga durata.

SVANTAGGI

- Sono meno sensibili dei traccianti radioattivi

GISH

OXFORD
ACADEMIC

ANNALS OF
BOTANY
Nonprofit since 1887

THE ANNALS OF BOTANY
Nonprofit
1887
since
COMPANY

Article Navigation

JOURNAL ARTICLE

Flow cytometry and GISH reveal mixed ploidy populations and *Spartina nonaploids* with genomes of *S. alterniflora* and *S. maritima* origin FREE

Simon Renny-Byfield, Malika Ainouche ✉, Ilija J. Leitch, K. Yoong Lim, Steven C. Le Comber, Andrew R. Leitch ✉ [Author Notes](#)

Annals of Botany, Volume 105, Issue 4, April 2010, Pages 527–533,
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq008>
Published: 11 February 2010

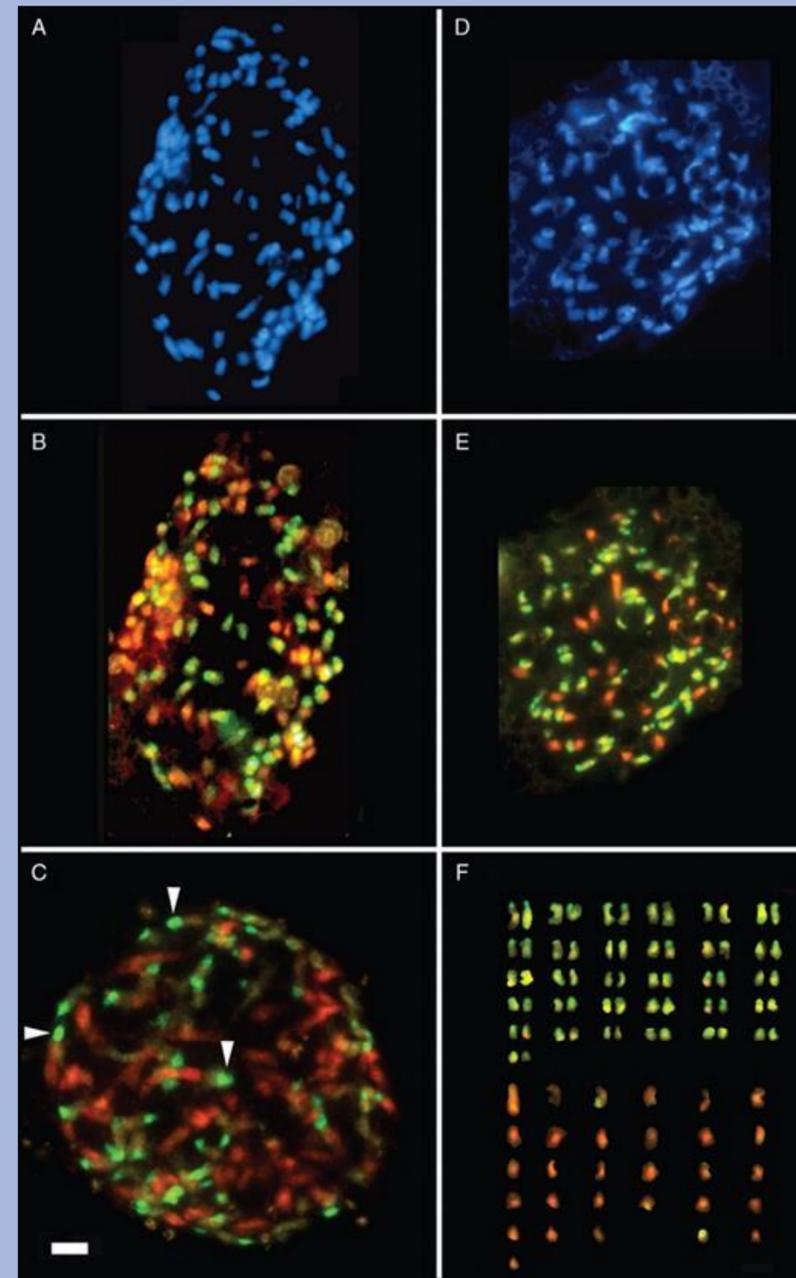
La GISH (ibridazione genomica in situ) è una modifica della FISH.

A differenza della FISH marca l'intero DNA e viene utilizzata la sonda di un altro organismo così da identificare l'origine delle diverse popolazioni.

La GISH è stata utilizzata per caratterizzare la composizione genomica e la distribuzione di una pianta, la *Spartina* a Eling Marchwood e Hythe, entrambi vicino a Southampton, nell'Inghilterra meridionale.

I preparati citologici sono stati realizzati da embrioni di semi o da apici di radici di piante cresciute in vaso. Le metafasi sono state accumulate mediante il gammaesano (stereoisomero dell'esaclorocicloesano, formato dall'aggiunta di cloro al benzene indotta dalla luce)

La Figura A e B mostra una metafase dell'apice della radice marcata con GISH di una pianta raccolta a Eling Marchwood



I dati GISH rivelano che la ricombinazione tra le serie di cromosomi parentali è probabilmente minima o assente, poiché tutti i cromosomi si sono colorati di un unico colore per tutta la loro lunghezza

REAZIONI DI IBRIDAZIONE

FISH

La Fish (Fluorescence In Situ Hybridization) è una tecnologia che utilizza sonde nucleotidiche marcate, note come DNA probes, per identificare specifiche regioni di un cromosoma, ovvero determinate sequenze di DNA

FISH

- La FISH è una tecnica utilizzata per la costruzione di mappe fisiche; ciò è possibile attraverso l'utilizzo di sonde marcate con fluorescenza e, infine, il risultato viene osservato al [microscopio a fluorescenza](#);
 - Negli ultimi anni si è cercato di migliorare sempre di più la tecnica, un importante esempio è la "*Multicolor-FISH*" (**M-FISH**). Si tratta di un'altra metodica di ibridizzazione fluorescente che fa uso di una serie di sonde in grado di "colorare" in maniera specifica ogni singolo cromosoma.

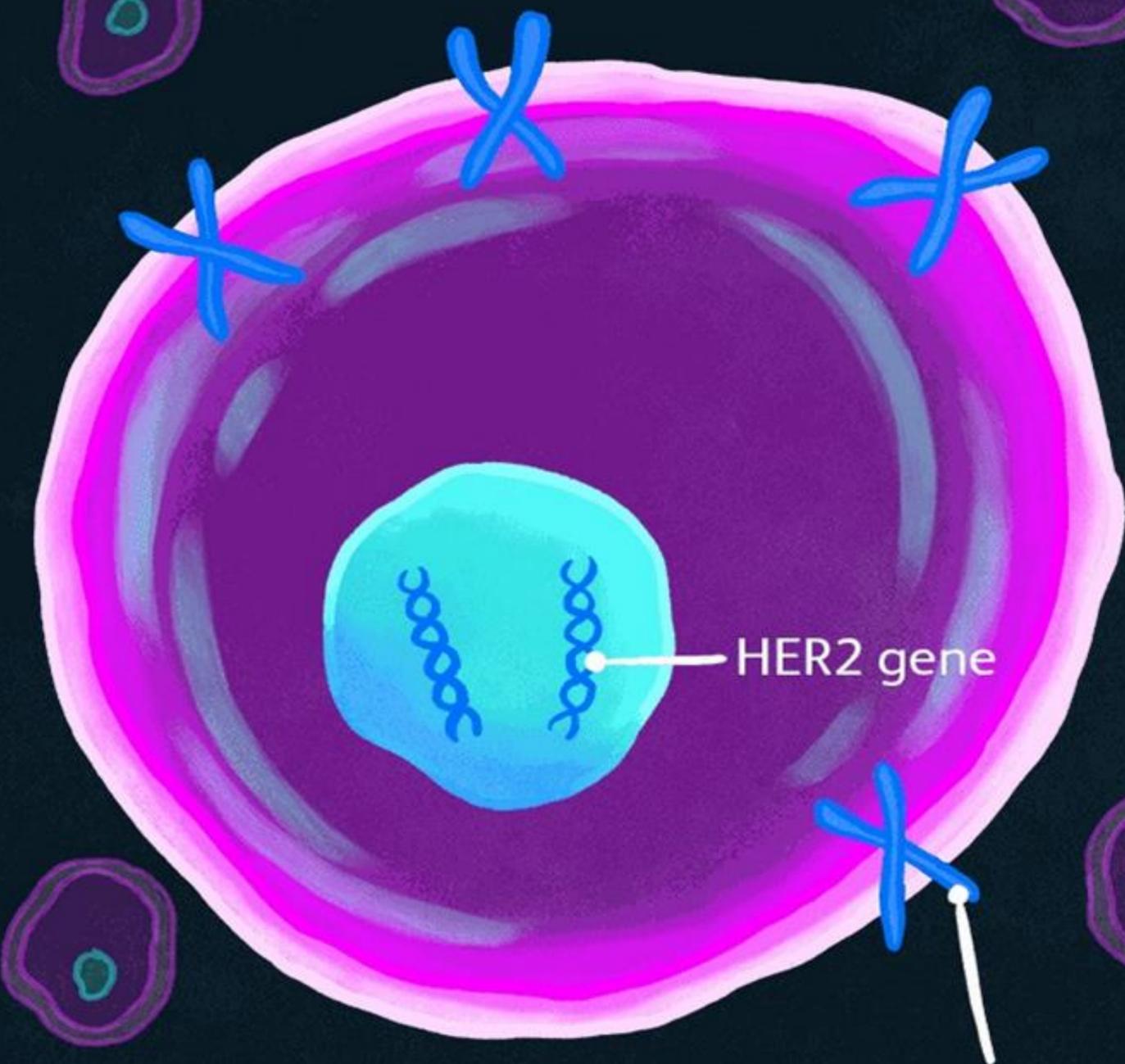
APPLICAZIONI DELLA FISH

Un possibile esempio di applicazione risiede nella diagnosi prenatale: di fatto la FISH su cellule di liquido amniotico non coltivato, permette l'utilizzo di sonde specifiche per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y.

La FISH, inoltre, rappresenta un indispensabile complemento della citogenetica molecolare che negli ultimi anni vede un'importante applicazione in campo oncologico. Un possibile esempio è rappresentato da quei pazienti che hanno una FISH positiva per l'amplificazione di un gene chiamato HER2; HER2 è amplificato o sovra espresso nel 25-30% dei tumori mammari.

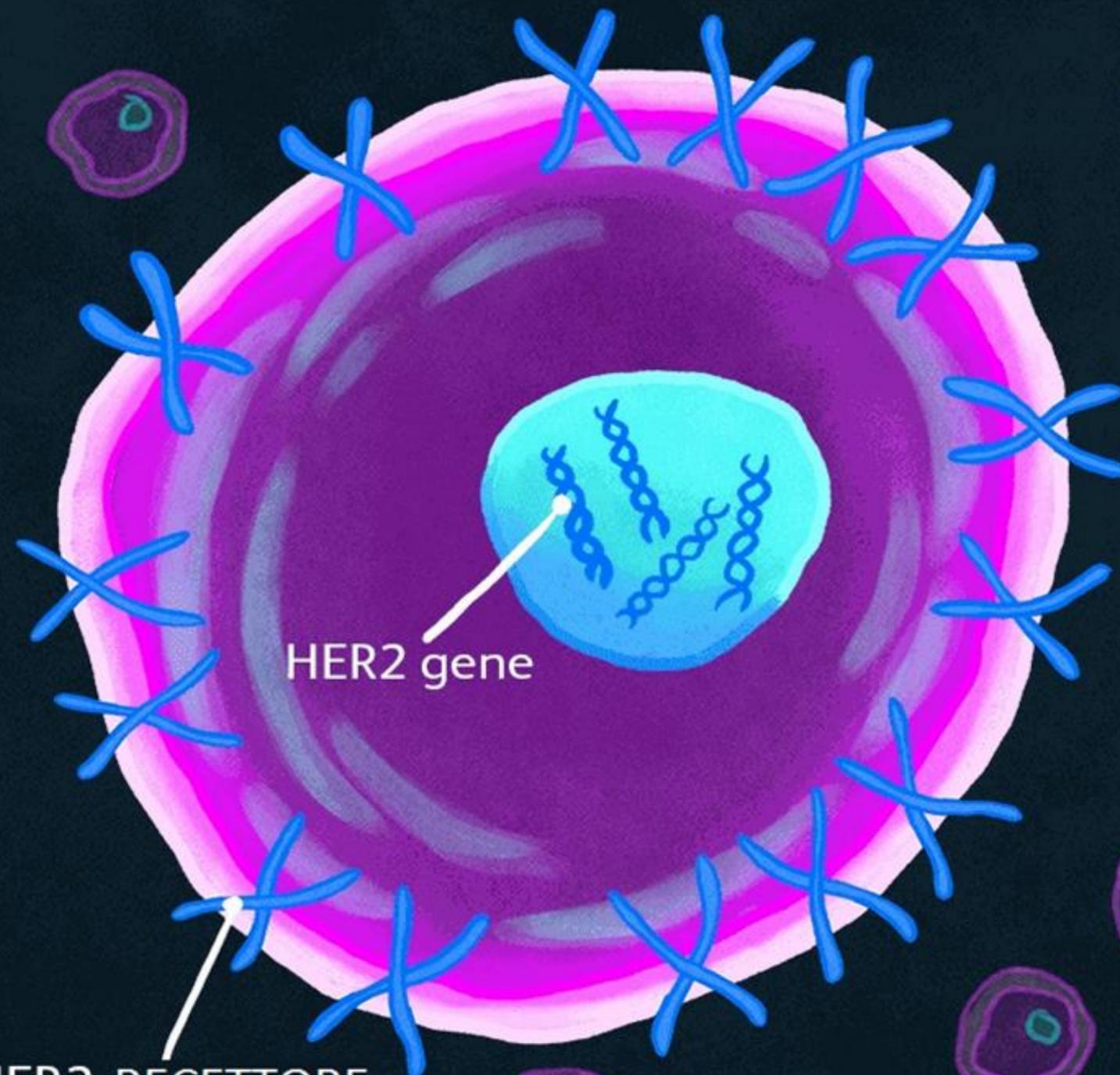
(link: [FISH: HER2 per tumore alla mammella - CDI Centro Diagnostico Italiano](#))

CELLULA NORMALE



HER2
RECETTORE

CELLULA HER2 POSITIVA



HER2 RECETTORE

FISH HER2 per tumore alla mammella.

articolo de CENTRO DIAGNOSTICO ITALIANO 20 agosto 2020

Il gene HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) si trova sul cromosoma 17 in posizione 17q11.2-q12. Tale gene codifica per un recettore cellulare di membrana ad attività tirosinchinasica la cui attivazione induce proliferazione e sopravvivenza cellulare.

L'aumentata espressione di HER-2 è stata associata a un incremento della tumorigenicità e del potenziale di formare angiogenesi e metastasi da parte delle cellule tumorali.

L'amplificazione di HER-2 è stata identificata nel 20-30% dei tumori della mammella.

A causa, quindi, del suo forte potere oncogeno, HER-2 è diventato target di numerose terapie di nuova generazione tra cui anticorpi monoclonali.

VANTAGGI

- Esamina un elevato numero di cellule in tempi brevi;
- Elevata di ibridazione;
- Elevata sensibilità e specificità;

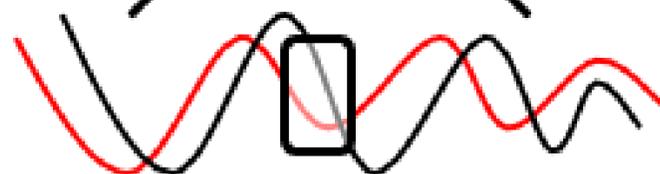
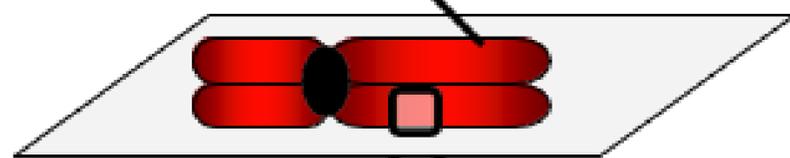
LIMITI

- Informazioni limitate al singolo gene/cromosoma (se si fa riferimento alla classica FISH);
- Esame simultaneo di pochi DNA bersaglio;
 - Le percentuali di errore dovute a falsi positivi e/o falsi negativi possono raggiungere valori relativamente elevati (~7%);

FISH

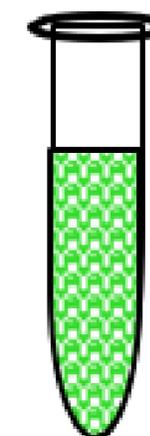
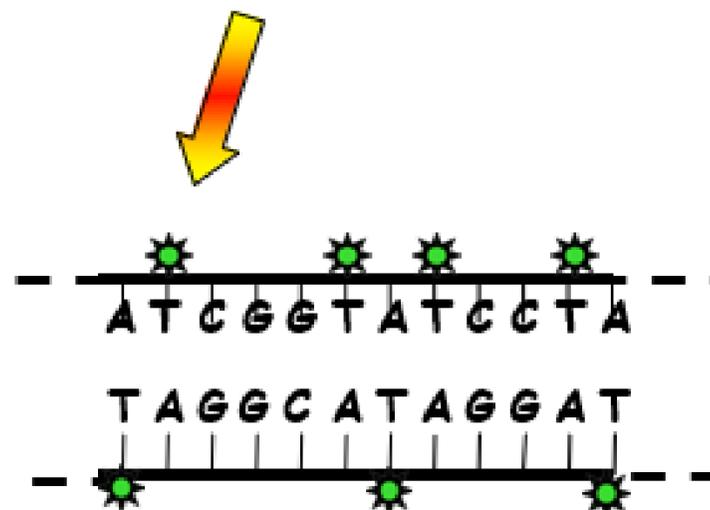
sintesi di una sonda complementare
marcata con un fluorocromo

cromosoma
sul vetrino

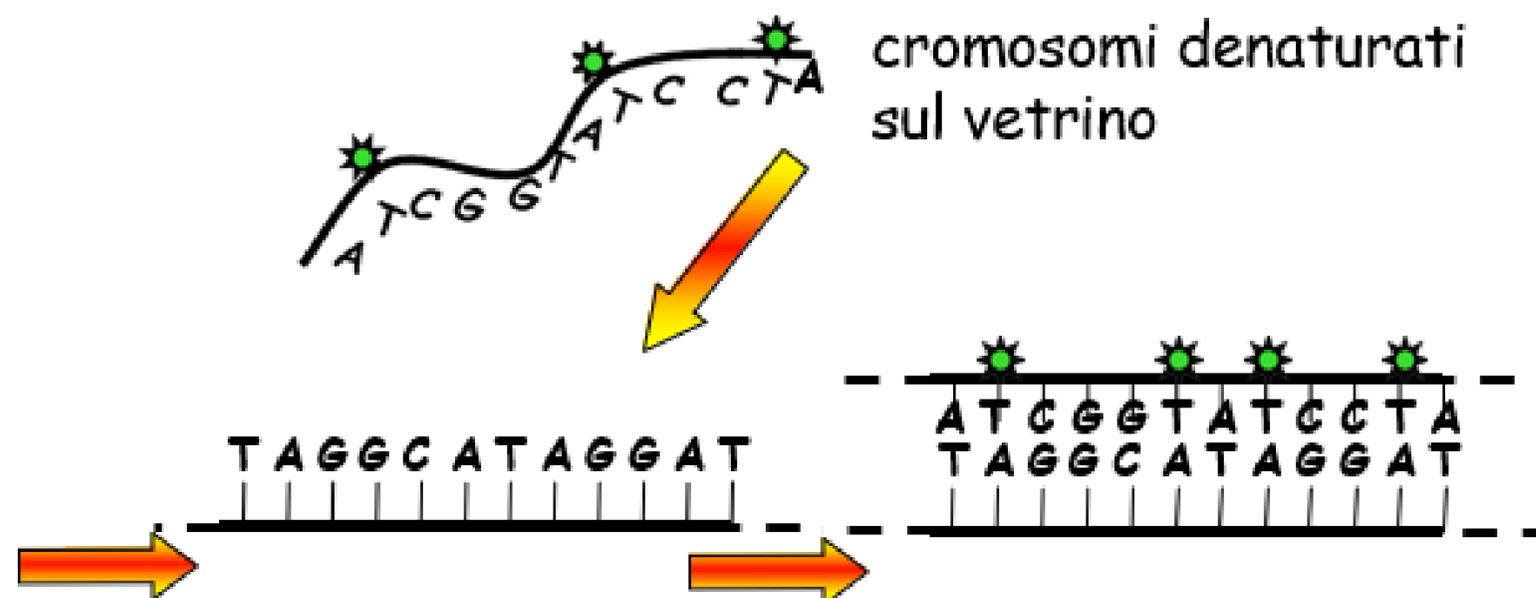


doppia elica
di DNA

denaturazione

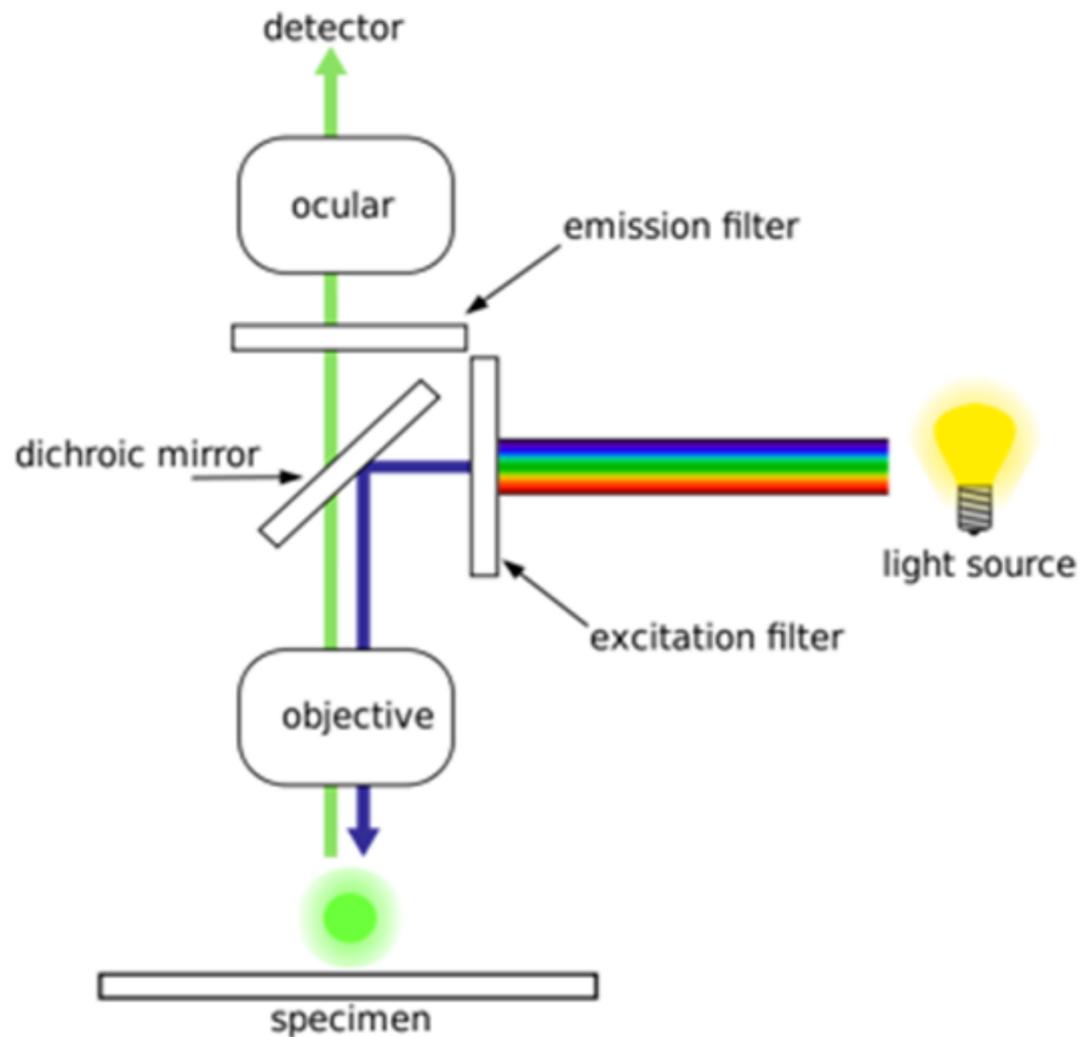


ibridazione della sonda sui
cromosomi denaturati
sul vetrino



- Nuclei metafasici
- Nuclei interfasici

Microscopio a Fluorescenza



La sequenza di DNA nel campione viene marcato in maniera specifica con una molecola fluorescente, detta **fluoroforo**. Il campione viene quindi illuminato con un fascio di luce ad una specifica lunghezza d'onda che viene assorbita dal fluoroforo, causandone l'emissione di luce a lunghezze d'onda maggiori (e quindi di colore diverso dalla luce assorbita). In questo modo si può osservare un singolo colore alla volta. Si possono comporre immagini a più colori combinando fra loro le immagini a singolo colore realizzate con differenti fluorofori.

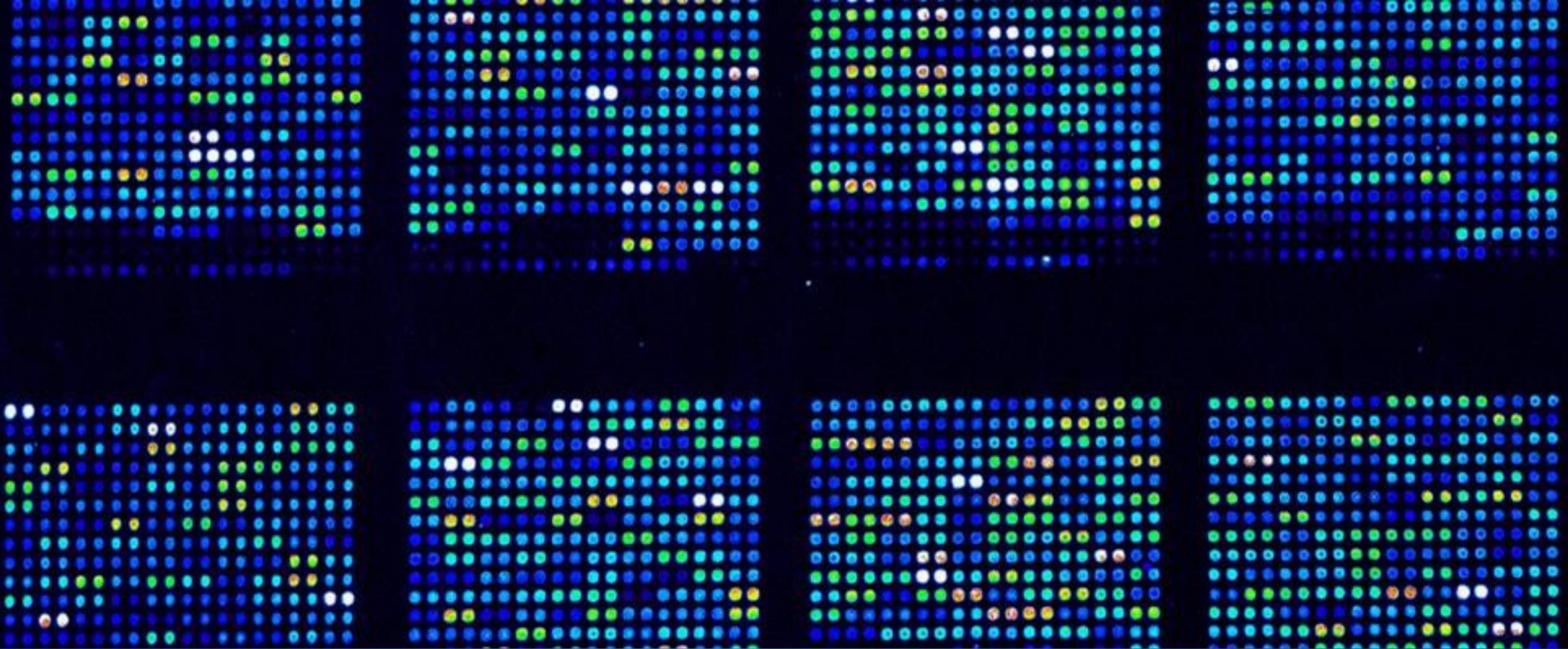
REAZIONI DI IBRIDAZIONE

IN SOLUZIONE:

viene effettuata ponendo una piccola quantità di soluzione ibridante, sul vetrino con la sezione del nostro campione. Si fanno una serie di lavaggi per rimuovere la sonda che non ha ibridato con il bersaglio che potrebbe dare un segnale di ibridazione aspecifico.

SU FILTRO O SU MEMBRANA:

una miscela di molecole di [DNA](#) a doppia elica o di [RNA](#) a singola elica, separate tramite [elettroforesi](#), viene trasferita su filtro di nitrocellulosa o nylon, che ha le caratteristiche della carta assorbente ed è caricato positivamente così da trattenere le molecole di acido nucleico cariche negativamente.



MICROARRAYS

Cosa sono i microarrays?

- ▶ È un dispositivo per l'analisi biologica in grado di legare in modo specifico acidi nucleici o proteine per ottenere attraverso un singolo passaggio analitico una enorme mole di informazioni dettagliate e tali da costituire una sorta di "fotografia" dello stato funzionale della cellula nel momento dell'analisi.
- ▶ Un DNA microarray (comunemente conosciuto come gene chip o DNA chip) è costituito da una collezione di microscopiche sonde di DNA definite **probe** attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip siliconici formanti un array (matrici).
- ▶ I microarrays sfruttano una tecnica di **ibridazione inversa**, consiste cioè nel fissare tutti i probe su un supporto e nel marcare l'acido nucleico definito **target**.

Tipologie di microarrays:

- ▶ Microarray a cDNA : Definiti anche **spotted arrays**, con sonde di lunghezza maggiore di 200 basi ottenute per retrotrascrizione da mRNA, frammentate, amplificate con PCR e depositate su un supporto di vetro o di nylon;
- ▶ Microarray a oligonucleotidi:
 - con sonde di lunghezza fra 25 e 80 basi ottenute da materiale biologico o per via artificiale e depositate su un supporto di vetro;
 - con sonde di lunghezza fra 25 e 30 basi sintetizzate in situ con tecniche fotolitografiche su wafer di silicio

- Microarray a proteine

Le proteine più comunemente usate sono gli anticorpi monoclonali, dove vengono stampati sul vetrino e usati come sonde per rilevare le proteine del lisato cellulare.



Preparazione dei GeneChip

Tecnologie per la costruzione dei GeneChip

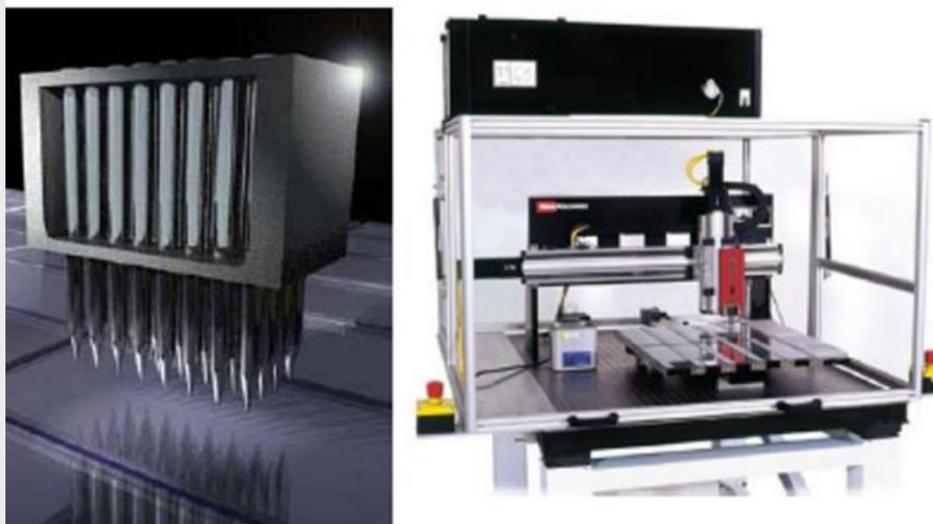
Fotolitografia

La sintesi delle sonde avviene sul supporto solido di silicio funzionalizzato con piccole sequenze nucleotidiche per l'avvio dell'allungamento.

Spotting

Le sonde da ancorare sono sintetizzate a parte e depositate sul supporto. Le sonde possono essere molecole di cDNA lunghe migliaia di basi.

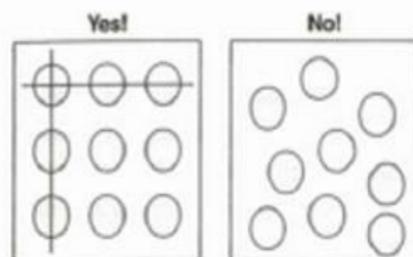
Spotting



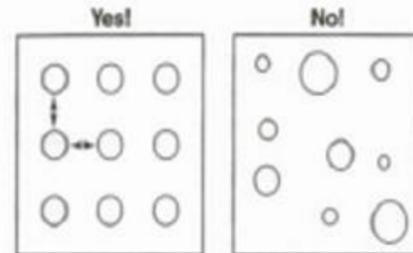
Preparazione di un microarray

1. Copertura del vetrino con poli-lisina; successivamente viene lasciato asciugare.
2. Preparazione delle sonde con piastra da microtitolazione
3. Preparazione supporto solido, come un vetrino o un chip di silicio, e per depositare le sonde viene usata la tecnica inkjet
4. Deposizione delle sonde in blocchi ordinati
5. Denaturazione delle sonde ad alta temperatura in modo che siano a singolo filamento.
6. Viene usato un robot per disporre goccioline microscopiche di ogni campione a singolo filamento in righe e colonne

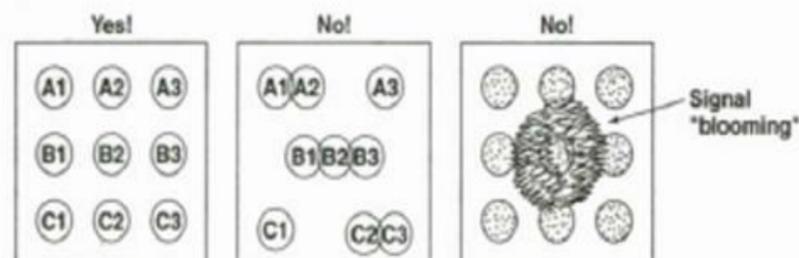
Rows & columns



Uniform size and spacing



Unique address



Preparazione dei campioni per microarray a cDNA

- Estrazione dell'RNA totale dalle cellule;
- Isolamento dell'mRNA grazie alla presenza delle code di poly-A;
- Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA ad opera della trascrittasi inversa
- Marcatura dei filamenti di cDNA con i fluorocromi Cy3 e Cy5
- Ibridizzazione del cDNA marcato con le sequenze presenti sul vetrino;
- Asportazione mediante lavaggi del materiale non ibridato;
- Acquisizione dell'immagine del vetrino con scanner laser;
- Analisi dell'immagine per l'estrapolazione dei dati.

Estrazione RNA dalle cellule

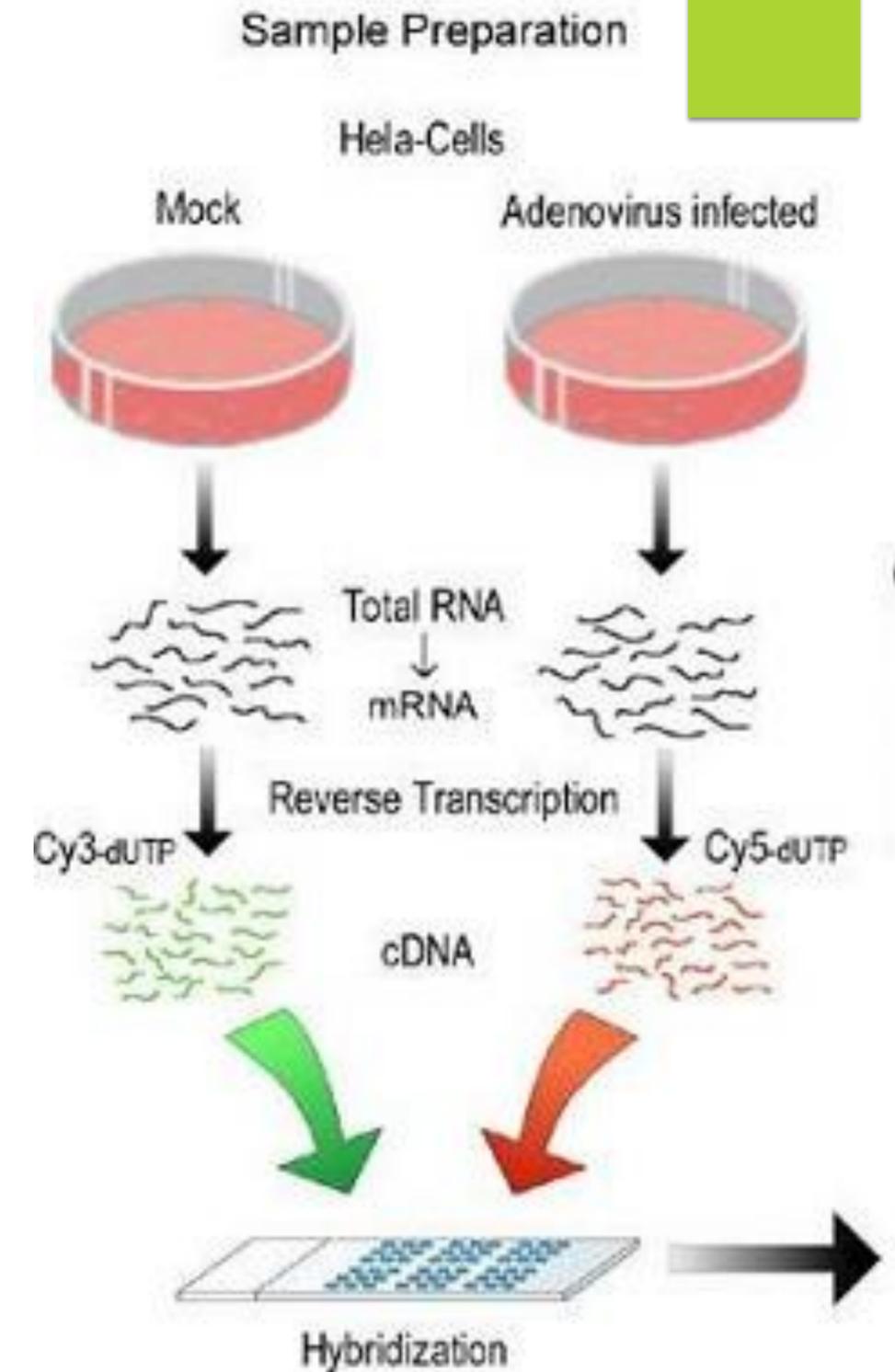
1 Vengono prelevati da un individuo cellule tumorali e sane. La marcatura dei campioni avviene per retrotrascrizione di mRNA, il cDNA derivante porterà un marcatore fluorescente differente.

2 **Cy3** che ha una lunghezza d'onda di emissione della fluorescenza di 570 nm (corrispondente alla parte verde dello spettro luminoso)

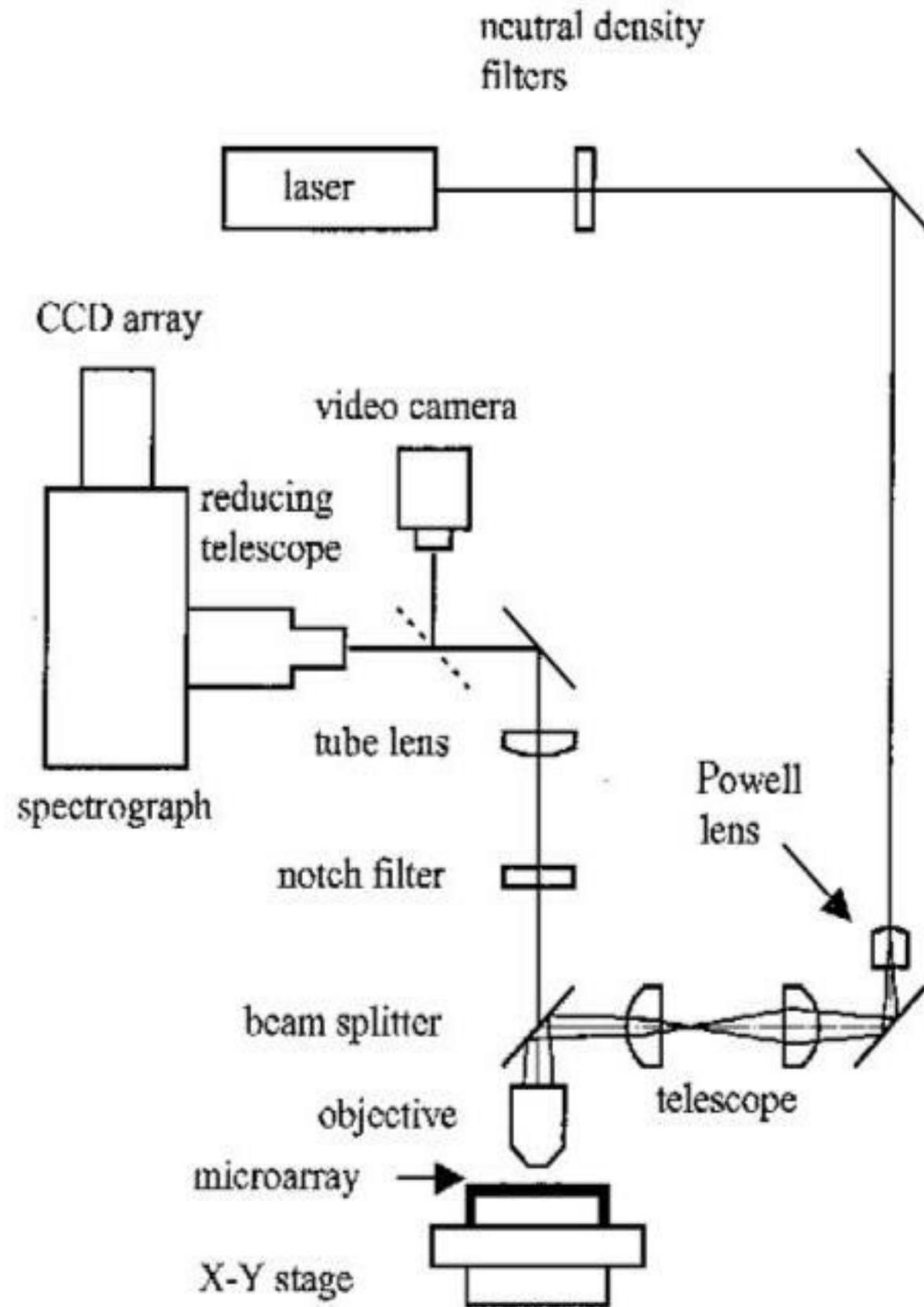
3 **Cy5** con una lunghezza d'onda di emissione della fluorescenza di 670 nm (corrispondente alla parte rossa dello spettro luminoso).

4 Durante l'ibridazione, i filamenti di DNA o RNA del campione si accoppiano con le sonde complementari sul microarray, formando legami a doppio filamento noti come ibridi.

Il microarray viene quindi scansionato in uno scanner per visualizzare la fluorescenza dei due fluorocromi dopo l'eccitazione con un raggio laser di una lunghezza d'onda definita.



Scannerizzazione



► Lo scanner di microarray svolge un ruolo fondamentale nella generazione dei dati da analizzare, consentendo di ottenere informazioni sull'intensità del segnale associata a ciascuna sonda del microarray e di condurre ulteriori analisi e interpretazioni.

► **Piattaforma di scansione:** dispongono di una piattaforma di scansione su cui è posizionato il microarray.

► **Sorgente luminosa :** sono dotati di una sorgente di illuminazione che emette luce o laser nella gamma di lunghezze d'onda appropriate per eccitare i marcatori fluorescenti presenti sul microarray.

► **Sistema ottico:** composto da lenti e specchi, è utilizzato per focalizzare la luce proveniente dal microarray e per creare un'immagine ad alta risoluzione del microarray sul sensore di imaging dello scanner.

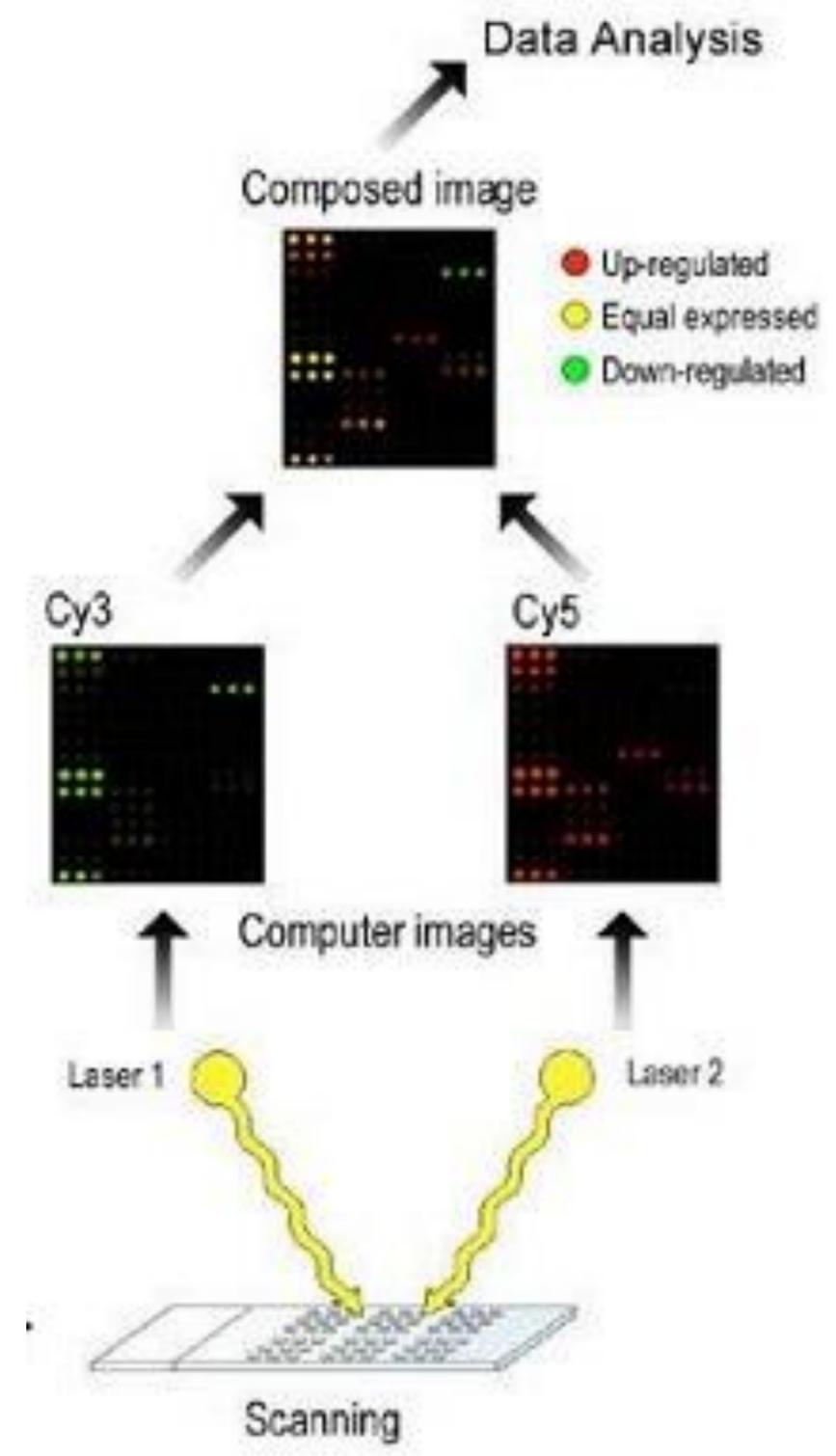
► **Sensore di imaging:** Lo scanner è dotato di un sensore di imaging ad alta risoluzione che cattura l'immagine del microarray. Questo sensore è responsabile della trasformazione della luce proveniente dal microarray in un segnale elettrico.

► **Software di acquisizione e analisi:** sono presenti software che consentono di controllare l'acquisizione dell'immagine e di eseguire analisi dei dati post-scansione, come la quantificazione dell'intensità del segnale.

Analisi dei dati

Completata la scannerizzazione, otterremo su un computer diversi risultati.

- ▶ I dati sono solitamente espressi come valori di intensità di fluorescenza.
- ▶ L'intensità del segnale per ciascuna sonda corrisponde all'abbondanza relativa del mRNA o del DNA genomico per quel gene nel campione.
- ▶ I dati possono essere utilizzati per identificare polimorfismi genetici, mutazioni o altre variazioni nel DNA analizzato.



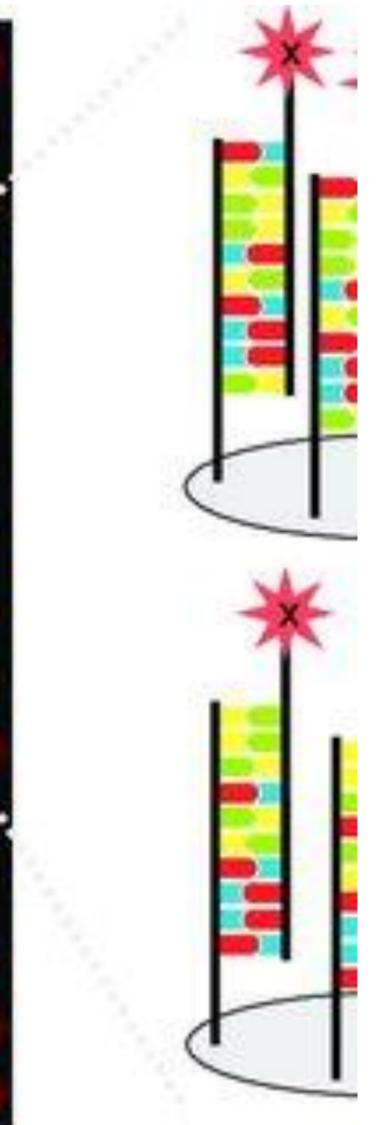
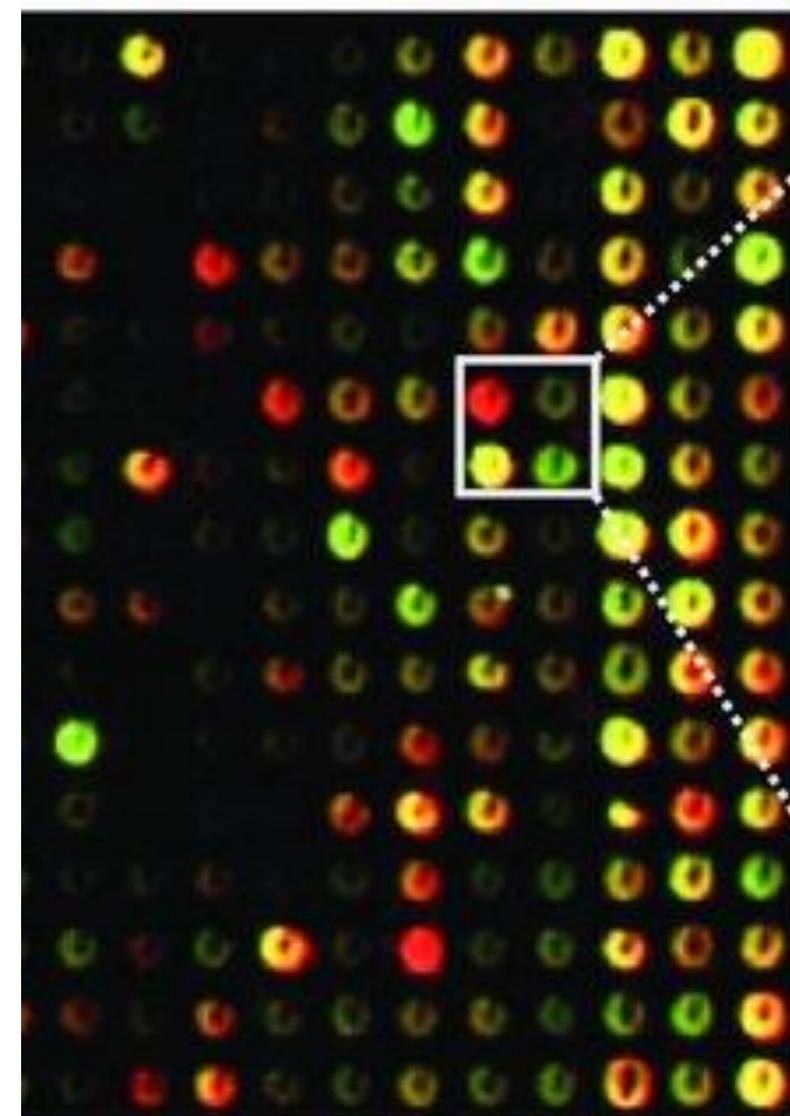
Analisi dei dati

Verde: mostra i geni la cui espressione è ridotta nelle cellule tumorali

Rosso: geni espressi prevalentemente nelle cellule tumorali

Giallo: geni espressi sia nelle cellule sane che nelle tumorali

Incolore: gene inattivo nei due tipi di cellule



Microarray a oligonucleotidi

Una tecnica utilizzata per produrre array di oligonucleotidi include la sintesi fotolitografica su un substrato di silice in cui vengono utilizzati agenti mascheranti sensibili alla luce per "costruire" una sequenza di nucleotidi. La realizzazione di un microarray Affymetrix coinvolge diverse fasi:

- ▶ **Design delle Sonde:** Affymetrix progetta sonde oligonucleotidiche brevi
- ▶ **Sintesi delle Sonde:** Le sonde vengono sintetizzate in modo massivo e accurato su un substrato di silicio utilizzando tecnologie di fotolitografia.
- ▶ **Stampa sul Chip:** Le sonde sintetizzate vengono quindi stampate su una lastra di vetro o silicio per creare il microarray. Ogni microarray può contenere migliaia di sonde disposte in un design predeterminato.
- ▶ **PM (Perfect Match):** Le sonde PM sono progettate per essere complementari a specifiche sequenze di mRNA o cDNA bersaglio presenti nel campione. Durante l'ibridazione, si legano in modo perfetto alle loro sequenze bersaglio nel campione.
- ▶ **MM (Mismatch) :** Le sonde MM sono simili alle sonde PM, ma presentano una singola mutazione rispetto alla sequenza bersaglio. Durante l'ibridazione, le sonde MM possono ibridarsi in modo non specifico con sequenze di mRNA o cDNA simili nel campione.

I probe set PM/MM permettono di determinare con alta confidenza se il segnale registrato deriva da una ibridazione specifica con il campione.

Sequenza di riferimento

... TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAAGGACTCCTATGTGGGTGACGAGG

Perfect match PM AATGGGTCAGAAAGGACTCCTATGTGGGTG

Mismatch MM AATGGGTCAGAAACGACTCCTATGTGGGTG

Fotolitografia

- ▶ **Preparazione del substrato:** si usa un substrato solido, come una lastra di vetro o silicio, che fungerà da base per il microarray.
- ▶ **Strato Fotosensibile:** viene applicato uno strato sottile di un materiale fotosensibile sul substrato. Questo materiale è sensibile alla luce ultravioletta.
- ▶ **Maschera Fotografica:** una maschera fotografica, che ha una struttura precisa che corrisponde al design desiderato delle sonde sul microarray, viene posizionata sopra lo strato fotosensibile.
- ▶ **Esposizione alla Luce UV:** la maschera fotografica funge da stencil, consentendo alla luce ultravioletta di passare solo attraverso le aree desiderate dello strato fotosensibile.
- ▶ **Sviluppo:** dopo l'esposizione alla luce UV, lo strato fotosensibile viene trattato con un agente chimico chiamato sviluppatore. Questo agente chimico rimuove le parti dello strato fotosensibile esposte alla luce UV, rivelando il motivo desiderato.
- ▶ **Incisione:** le parti non protette dello strato fotosensibile vengono incise o rimosse, lasciando esposto il substrato sottostante.
- ▶ **Deposizione delle Sonde:** le sonde oligonucleotidiche, progettate per essere complementari alle sequenze bersaglio, vengono quindi depositate sul substrato esposto.
- ▶ **Controllo di Qualità:** Il microarray viene quindi sottoposto a controlli di qualità per garantire l'integrità del design e la presenza corretta delle sonde.
- ▶ **Stampa e Distribuzione:** Il microarray viene quindi stampato in serie e distribuito per l'uso in studi di espressione genica.

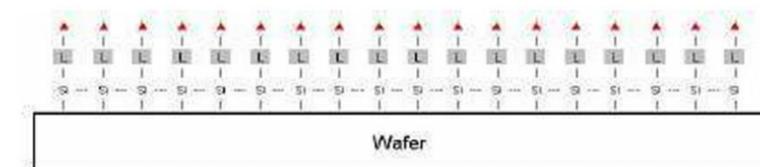


Figura 1.2 Wafer di silicio con aggiunta dei linker.

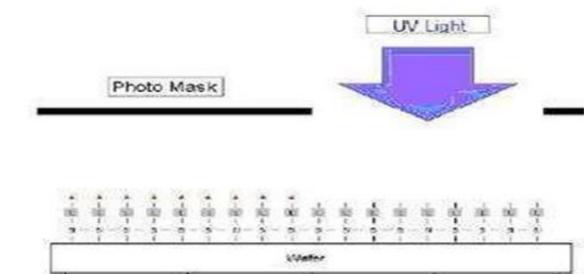


Figura 1.3: Wafer esposto a luce UV.

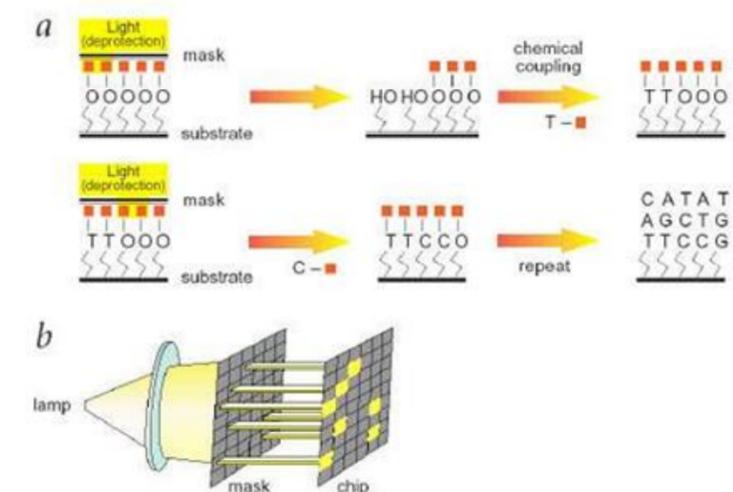


Figura 1.7a: Riassunto del processo di costruzione delle *probe* di oligonucleotidi; Figura 1.7b: Esposizione a luce UV con ausilio della maschera.

Differenze tra metodo Affymetrix e Spotting

Campioni

AFFYMETRIX

I campioni sono cRNA marcati con biotina

SPOTTING

I campioni sono cDNA marcati con Cy3 e Cy5

Ibridazione

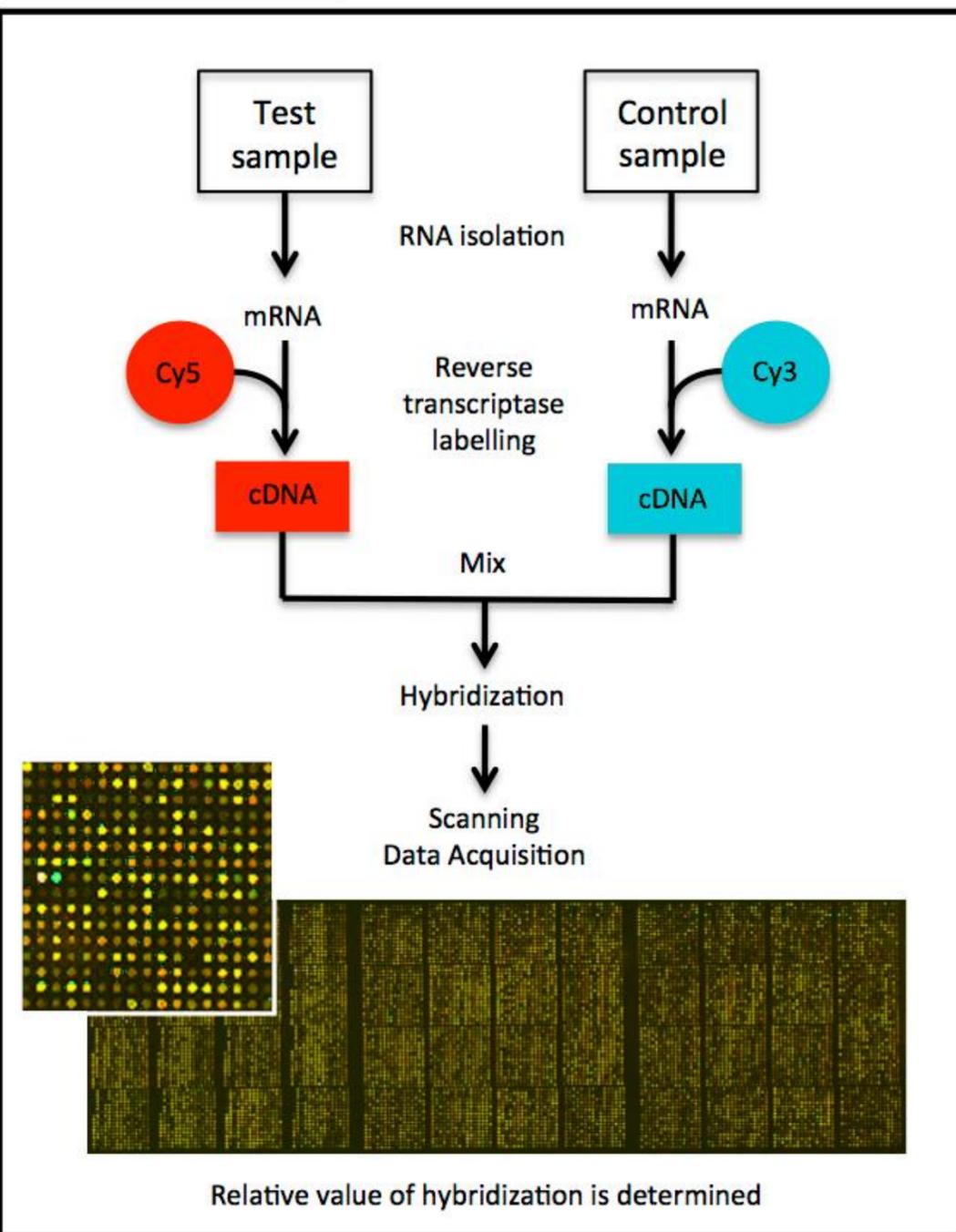
AFFYMETRIX

Ogni campione è ibridizzato su un singolo chip

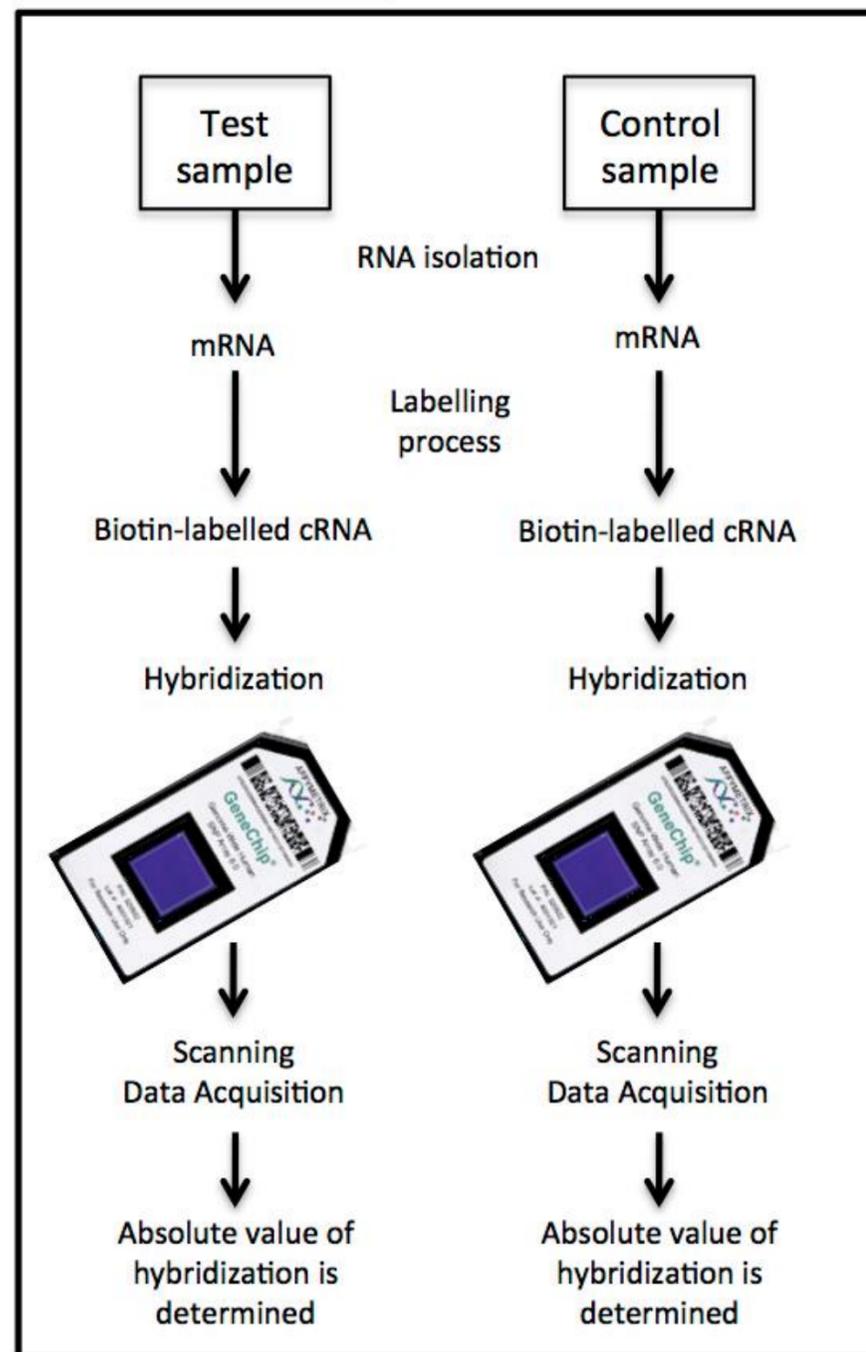
SPOTTING

I campioni sono miscelati e ibridizzati sullo stesso chip

Two color array



One color array



Distinguiamo i microarray in:

- **one channel:** ogni campione viene marcato con biotina e successivamente ibridato in un microarray separato e otteniamo un valore assoluto di fluorescenza per ciascuna sonda.

- **two channel:** vengono usati due campioni da confrontare, ad esempio tessuto malato e sano e sono marcati con diversi coloranti fluorescenti

Applicazioni dei microarrays

I microarrays si stanno rivelando degli strumenti efficaci in differenti campi di indagine. Ultimamente vengono utilizzati come dispositivi di indagine primaria, capaci di fornire risposte robuste, ma anche di porre nuovi quesiti al ricercatore.

- Biologia molecolare e cellulare
- Valutare gli effetti dell'inquinamento ambientale su organismi viventi come piante, animali e batteri.
- Oncologia
- Microbiologia
- Tassonomia di tessuti
- Identificazione delle basi molecolari delle malattie
- Analisi del meccanismo di azione dei farmaci
- Neuroscienze

Vantaggi

Analisi ad alta throughput: consentono l'analisi simultanea di migliaia di geni, consentendo agli scienziati di studiare l'espressione genica su larga scala in un unico esperimento.

Sensibilità elevata: possono rilevare anche piccole variazioni nell'espressione genica, consentendo agli scienziati di identificare geni che sono regolati in risposta a diversi trattamenti o condizioni.

Costi relativamente bassi: possono essere più economici per analizzare l'espressione genica su larga scala.

Ampia disponibilità di dati: Esistono molti dati di espressione genica pubblicamente disponibili da esperimenti precedenti che utilizzano microarray

Svantaggi:

Limitazioni nella copertura genomica: hanno una copertura limitata del genoma, il che significa che possono non rilevare nuove varianti o trascritti non annotati.

Rischio di falsi positivi e falsi negativi: possono produrre risultati inaccurati

Rischi legati alla standardizzazione: La standardizzazione delle procedure sperimentali e dei protocolli di analisi è cruciale per ottenere risultati affidabili e riproducibili con i microarray.

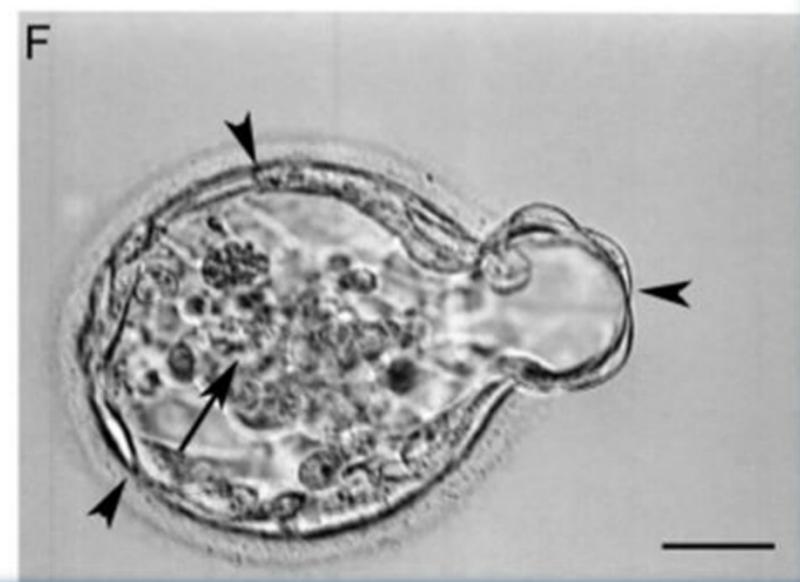
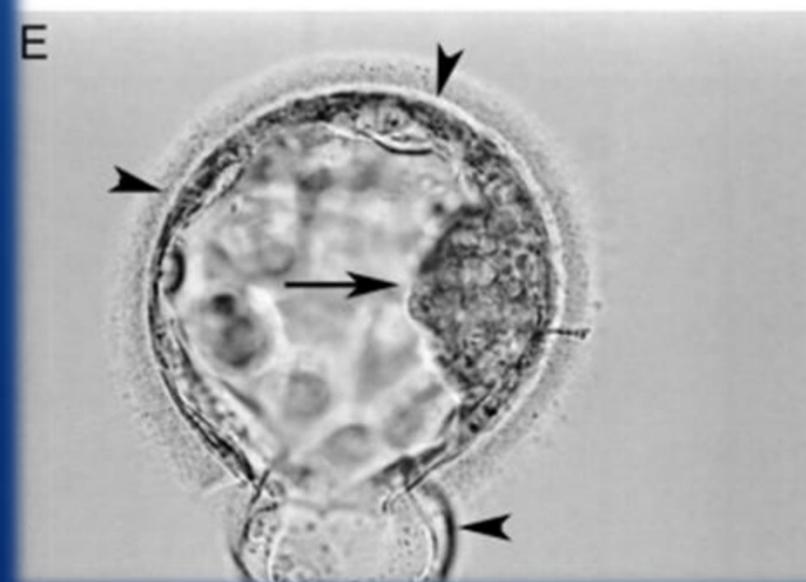
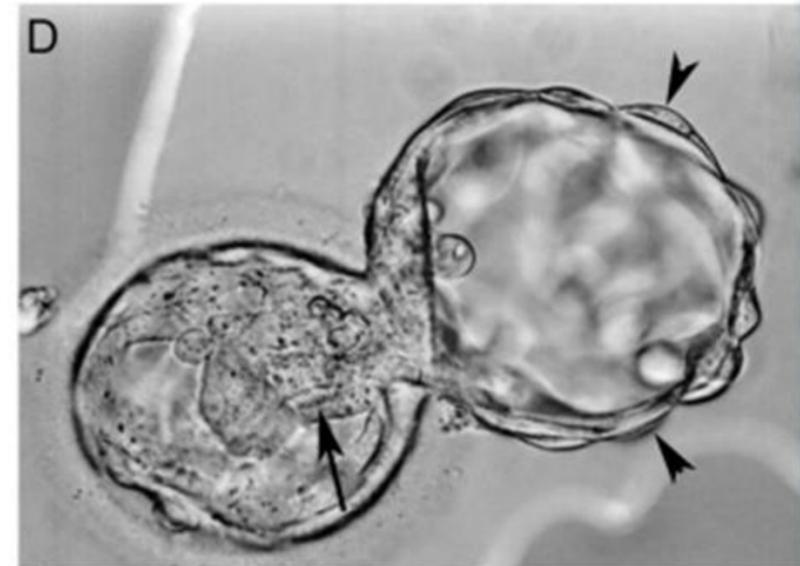
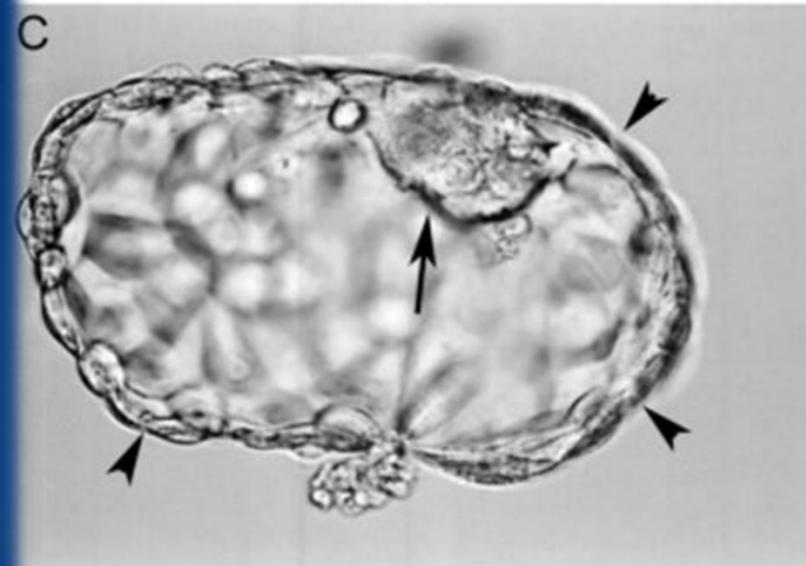
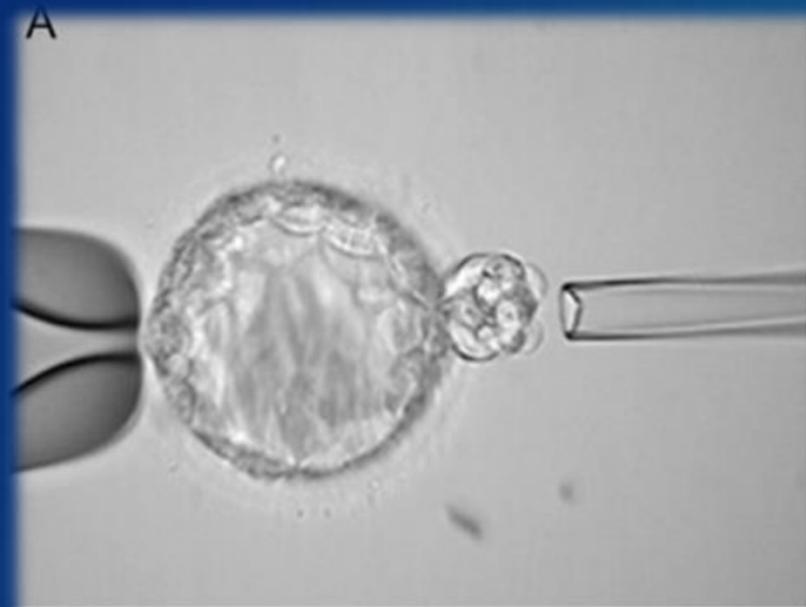
Identificazione di errori cromosomici in embrioni umani preimpianto con microarray di DNA oligonucleotidico

Lifeng Liang,^{1,2} Cassie T. Wang,¹ Xiaofang Sun,² Lian Liu,³ Man Li,³ Craig Witz,¹ Daniel Williams,¹ Jason Griffith,¹ Josh Skorupski,¹ Ghassan Haddad,¹ Jimmy Gill,¹ e Wei-Hua Wang^{1,*}

Haibin Wang, Editore

L'aneuploidia è una condizione genetica in cui un individuo presenta un numero anomalo di cromosomi nelle proprie cellule.

- Il testo discute come l'aneuploidia è uno dei fattori più cruciali che influenzano l'impianto dell'embrione ed è anche una delle principali cause di difetti alla nascita. Lo screening genetico preimpianto (PGS) mediante microarray è un importante metodo diagnostico per identificare aneuploidie e altre anomalie cromosomiche.
- È stato riportato che il tasso di aneuploidia è estremamente elevato nelle pazienti con ripetuti fallimenti di impianto, aborti spontanei ricorrenti, precedenti concepimenti aneuploidi ed età materna avanzata.
- Le piattaforme di microarray utilizzate per la PGS prevede anche quella basata sui polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) tra cui **Affymetrix**.



► **STEP 1:** Le pazienti vengono sottoposte a iperstimolazione ovarica controllata, trattate con gonadotropina umana. Gli ovuli vengono prelevati tra le 35 e le 37 ore dopo la somministrazione di Hcg.

► **STEP 2: Coltura embrionale e biopsia embrionale**

► Gli ovociti maturi sono stati coltivati per 4-5 ore

► Gli ovociti maturi vengono inseminati

► Al giorno 3, è stato eseguito un foro nella zona pellucida degli embrioni utilizzando un sistema laser.

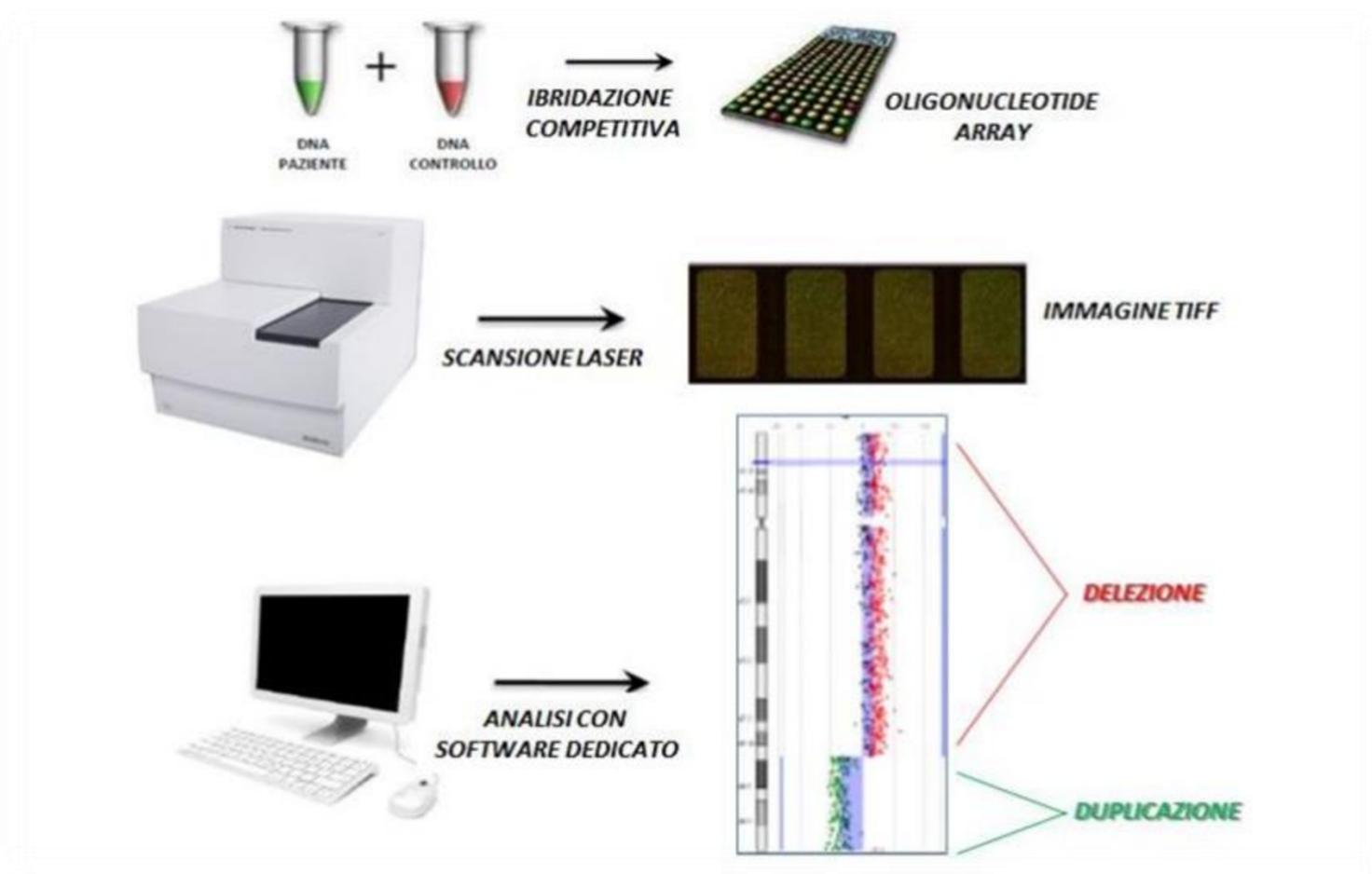
► gli embrioni sono stati esaminati e le cellule del trofoectoderma sono sottoposte a biopsia.

► Dopo la biopsia, le cellule sono state lavate, poste in provette con tampone di lisi cellulare e congelate a -20°C prima di essere processate per il microarray.

► **STEP 3: Le blastocisti vengono vetrificate**, immersi all'interno di azoto liquido per la crioconservazione.

ANALISI DNA ESTRATTO DALLE CELLULE EMBIONALI MEDIANTE UN MICROARRAY

- ▶ I campioni amplificati vengono purificati
- ▶ I campioni etichettati (Cy3) sono stati miscelati con campioni di controllo etichettati con Cy5 e caricati su un microarray.
- ▶ Dopo un'ibridazione notturna, gli array sono stati lavati e scansionati con uno scanner
- ▶ Attraverso la misurazione delle intensità dei segnali fluorescenti, è possibile determinare la presenza di anomalie cromosomiche.
- ▶ consente di verificare se vi siano perdite o acquisizioni di materiale genetico nel presunto DNA "danneggiato".



RISULTATI

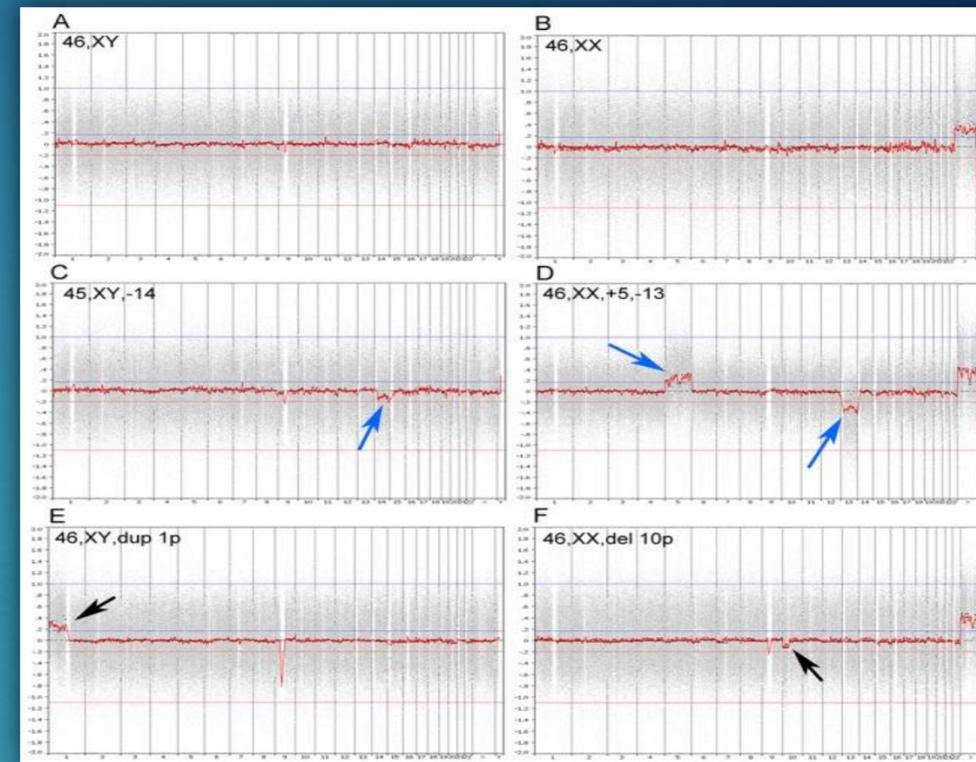
Un totale di 383 blastocisti di 72 pazienti con infertilità, età materna avanzata o con precedente aborto spontaneo sono state analizzate dopo biopsia e microarray.

Di questi campioni, il 41,9% erano blastocisti euploidi normali e il 58,1% erano blastocisti anormali.

Abbiamo scoperto che le pazienti con età materna avanzata avevano più embrioni anormali (64,0%) rispetto alle pazienti con aborto spontaneo ricorrente (47,4%).

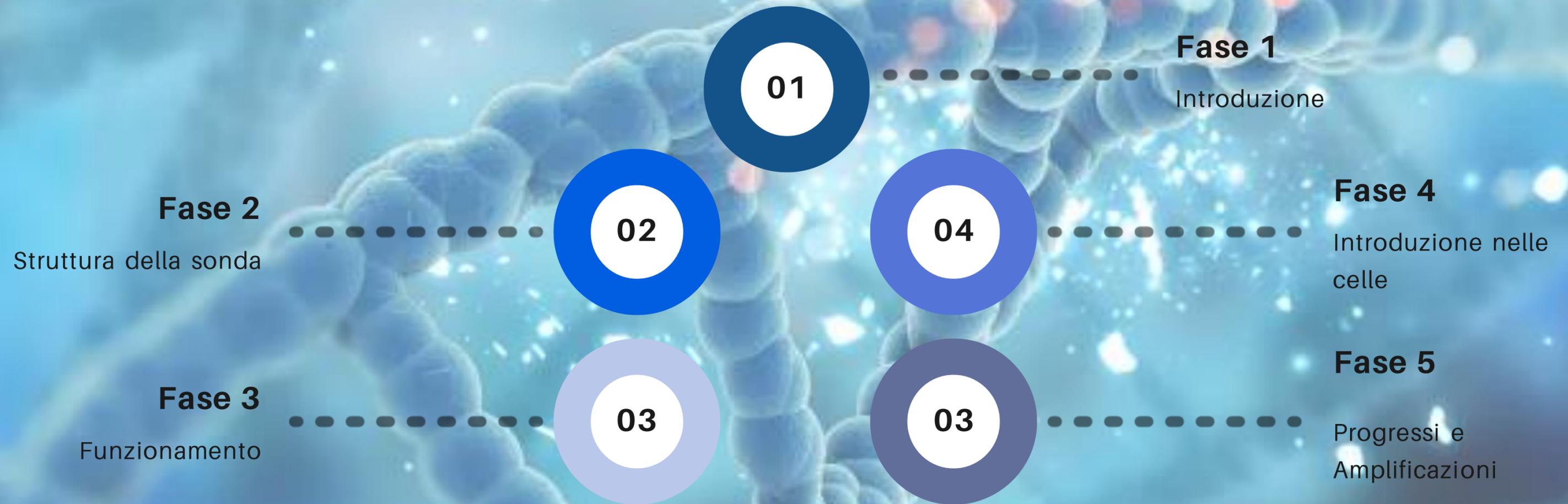
Anche se abbiamo ottenuto un alto tasso di impianto embrionale (54,4%), alcuni embrioni buoni non si sono ancora impiantati dopo il trasferimento.

Nonostante questi dati si evince però che non c'è grande differenza tra le due categorie, poiché ad oggi è stato rilevato un aumento di aneuploidia anche nelle pazienti più giovani aumentando così le cause di fallimento dell'impianto.



Il trasferimento di blastocisti sottoposte a screening microarray può aumentare significativamente la gravidanza clinica e i tassi di impianto embrionale.

MOLECULAR BEACON

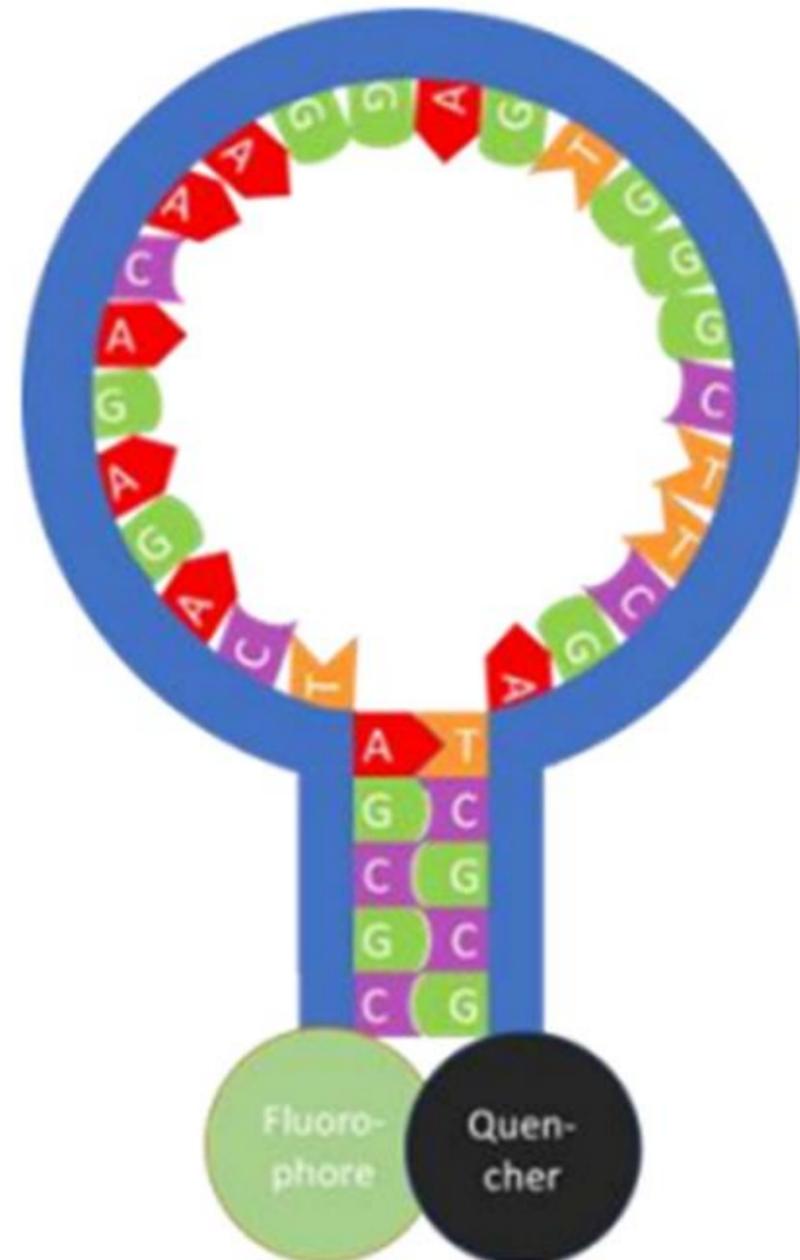




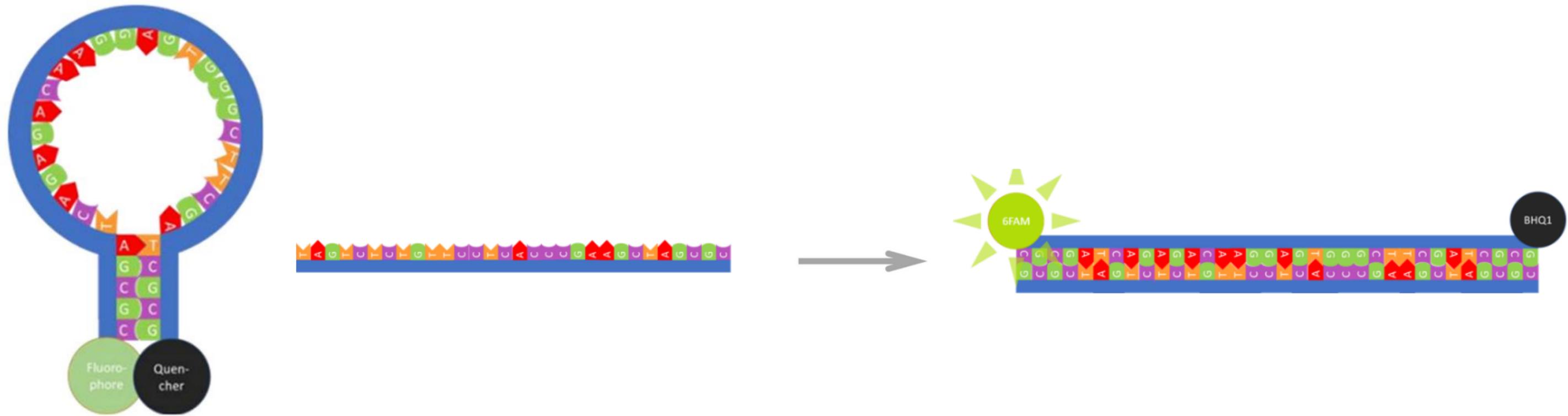
Cosa sono i Molecular Beacon ?

I Molecular beacon (MB) sono sonde di ibridazione oligonucleotidiche progettate per rilevare specifiche sequenza nucleotidiche di DNA e RNA.

Struttura



- LOOP, cioè l'anello generalmente costituito da 15-30 nucleotidi e si lega specificamente alle molecole bersaglio.
- STEM è lo stelo il quale inizia a partire da entrambe le estremità dell'anello e le sequenze ad entrambe le estremità sono complementari tra loro.
- QUENCHER, è attaccato covalentemente all'estremità 3' del MB e quando questo è a stretto contatto con il fluoroforo, impedisce a quest'ultimo di emettere luce
- FLUOROFORO, è posizionato all'estremità 5' del MB, segnala la presenza di specifiche sequenze di molecole bersaglio. è posizionato all'estremità 5'.



Funzionamento

Nella posizione iniziale il quencher è vicino al gruppo fluoroforo, e inibisce la fluorescenza. Nel momento in cui il molecular beacon rileva la sequenza bersaglio si lega ad essa.

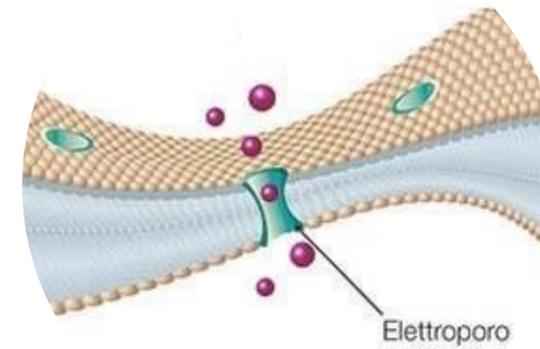
L'ibridazione con l'acido nucleico target apre la forcina e separa fisicamente il fluoroforo dal quencher, consentendo l'emissione di un segnale fluorescente.

METODI PER L'INTRODUZIONE

di molecular beacon nelle cellule viventi

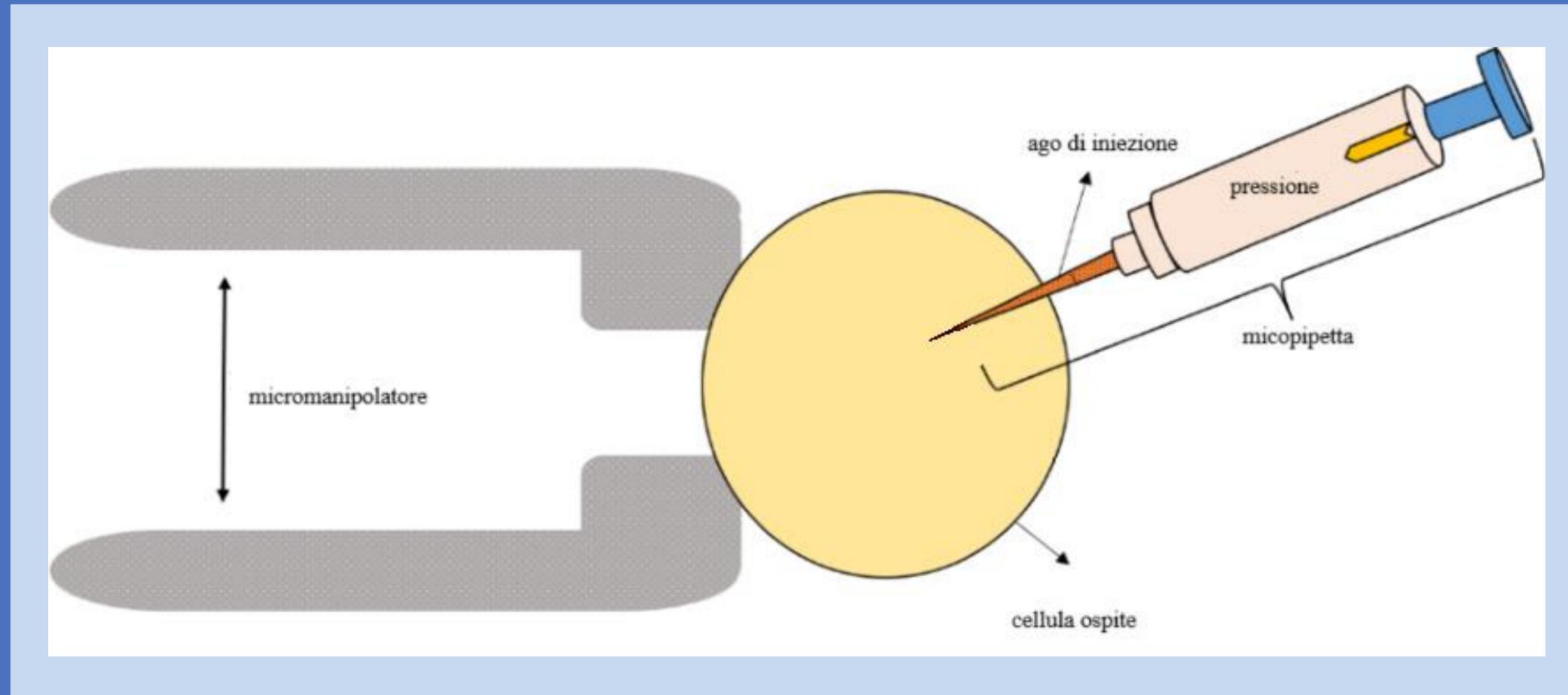


Microiniezione



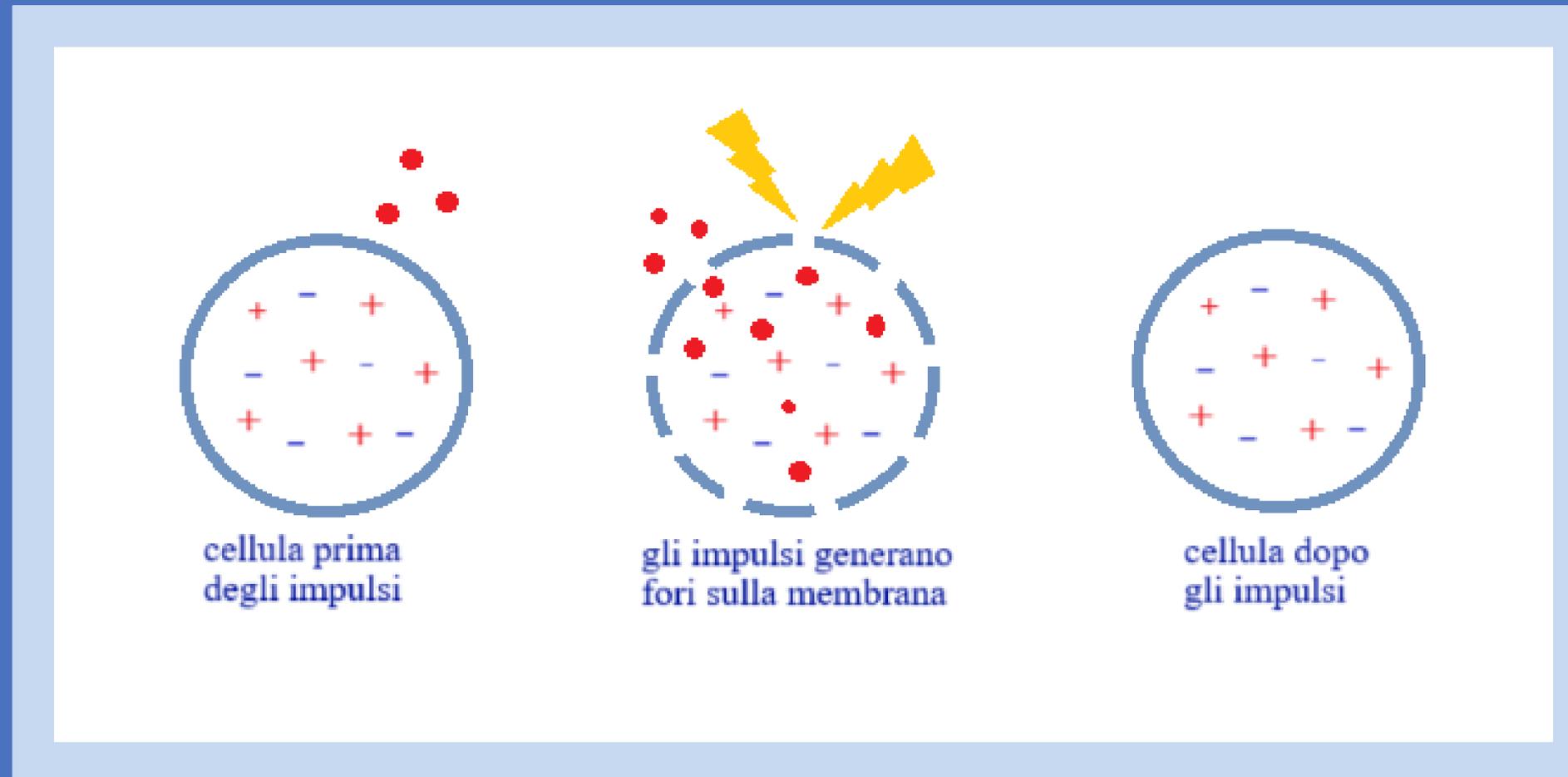
Elettroporazione

Microiniezione



Questo metodo coinvolge una micropipetta di vetro con una punta fine che di solito ha un diametro di 1 micron. Un micromanipolatore è installato su una fase del microscopio ed è usato portare la punta della micropipetta vicino alla cella di interesse con alta precisione sotto il microscopio. Una volta che la punta di vetro tocca la cella, una piccola pressione viene applicata sulla membrana inserendo la MB nella cella.

Elettroporazione



Questa tecnica fa sì che sulla membrana cellulare aumenti la permeabilità a causa di un campo elettrico esterno, in seguito a questi impulsi si generano dei pori di piccolissime dimensioni (nm) sulla membrana plasmatica, questi pori permettono la diffusione delle molecole esterne alle cellule. A seconda dei diversi tipi di cellule, la tensione ottimale e la durata dell'impulso devono essere determinati sperimentalmente per ottenere la migliore efficienza di consegna.

Microiniezioni

vantaggi:

- Massima precisione
- Rilevamento in tempo reale
- Scarsa invasione
- Applicazioni diagnostiche

svantaggi

- Costi
- Iniezione ridotta
- Risultati alterati o non riproducibili.
- Diversa percentuale di successo
- Danni cellulari e/o morte cellulare.
- Interferire con le normali funzioni cellulari

Elettroporazione

vantaggi:

- Monitoraggio temporale
- Elevata efficienza
- Vitalità cellulare

svantaggi

- Fortemente influenzata
- Irreversibilità del riarrangiamento dei lipidi di membrana, con possibile perdita di organelli



Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses

J Z Jordens¹, S Lanham, M A Pickett, S Amarasekara, I Abeywickrema, P J Watt

Per l'identificazione del gran numero di diversi tipi di papilloma virus umano (HPV) riscontrati nelle lesioni (pre)maligne, è stato sviluppato un nuovo metodo basato sull'uso di primer specifici per l'HPV contenenti una struttura ad anello a forcina (MB) in cui i gruppi fluorescenti sono mantenuti in stretta prossimità in modo tale da attenuare la fluorescenza. Durante l'amplificazione della sequenza target, l'apertura del loop avviene e la fluorescenza risultante può essere rilevata utilizzando un sistema di rilevamento. La sequenza fluorescente risultante viene poi tipizzata mediante una singola ibridazione con sonde specifiche immobilizzate su membrane di nylon e rilevate su uno scanner fluorescente.

Table 1. Molecular Beacon Sequences

Type	Sequence*	Labels [†]	AC Nr [‡]	Position [§]
HPV6	CGCCTC ATACAGGGCTGCAACACCA GAGGCG	FAM-DABSYL	AF092932	1795-1777
HPV11p	CGCCTC TGAAATGCCTGTCCTAAAC GAGGCG	HEX-DABSYL	M14119	1815-1797
HPV16	CGCCTC AATGCTGCTGCTGACTAC GAGGCG	FAM-DABSYL	U89348	1820-1802
HPV18	CGCCTC TATTAGTGAAGTAATGGGAGAC GAGGCG	TET-DABSYL	X05015	1918-1939
HPV31	CGCCTC AATGCTGCAGCTGTGCTAC GAGGCG	FAM-DABSYL	J04353	1757-1739
HPV33	CGCCTC AATGCACATGTTTGGCTCC GAGGCG	FAM-DABSYL	M12732	1813-1795
HPV45	CGCCTC TATTAGTGAAGTTAAGTGGAGAC GAGGCG	FAM-DABSYL	X74479	1876-1897
β -globin	CGCCTC CTGTCCACTCCTGATGCTGTTAT GAGGCG	FAM-DABSYL	M34058	1886-1908

*Sequences are given from 5'→3'.

[†]Fluorochromes are at 5', the universal quencher (DABSYL) is at the 3' position.

[‡]AC Nr, Genome Bank Accession Number.

[§]Nucleotide position of the probe sequences on corresponding AC Nr sequence.

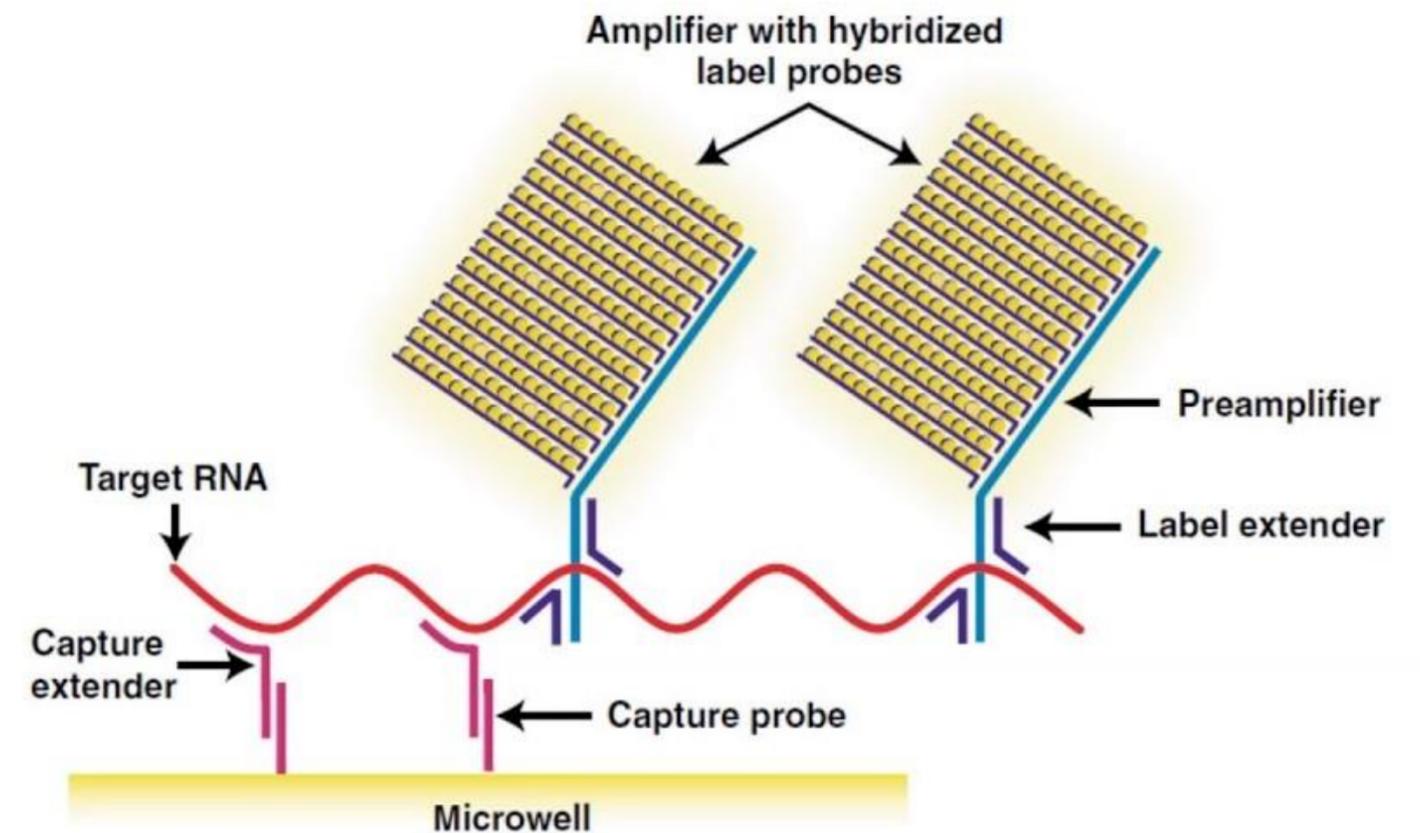
Per garantire che le sequenze selezionate della sonda beacon molecolare fornissero la massima discriminazione delle sequenze alla temperatura di annealing della PCR, sono state generate curve di fusione per ciascuna sonda beacon molecolare.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1099663/>

Branched DNA (bDNA) Signal Amplification

Il bDNA, misura direttamente le molecole di acidi nucleici aumentando il segnale del reporter, piuttosto che replicare le sequenze bersaglio come mezzo di rilevazione. In questo modo si evitano i falsi positivi dovuti alla contaminazione.

Ciascuna molecola amplificatrice del bDNA è stata progettata per contenere 15 bracci, ciascuno dei quali contiene tre siti di legame coniugati con fosfatasi alcalina. Un segnale chemiluminescente viene generato dopo l'introduzione di un substrato diossietano che viene attivato dalla fosfatasi alcalina. Questo segnale può essere facilmente quantificato contando il numero di fotoni emessi in un luminometro. Il dosaggio del bDNA è intrinsecamente quantitativo poiché il numero di fotoni emessi è direttamente correlato alla quantità di acido nucleico target nel campione.

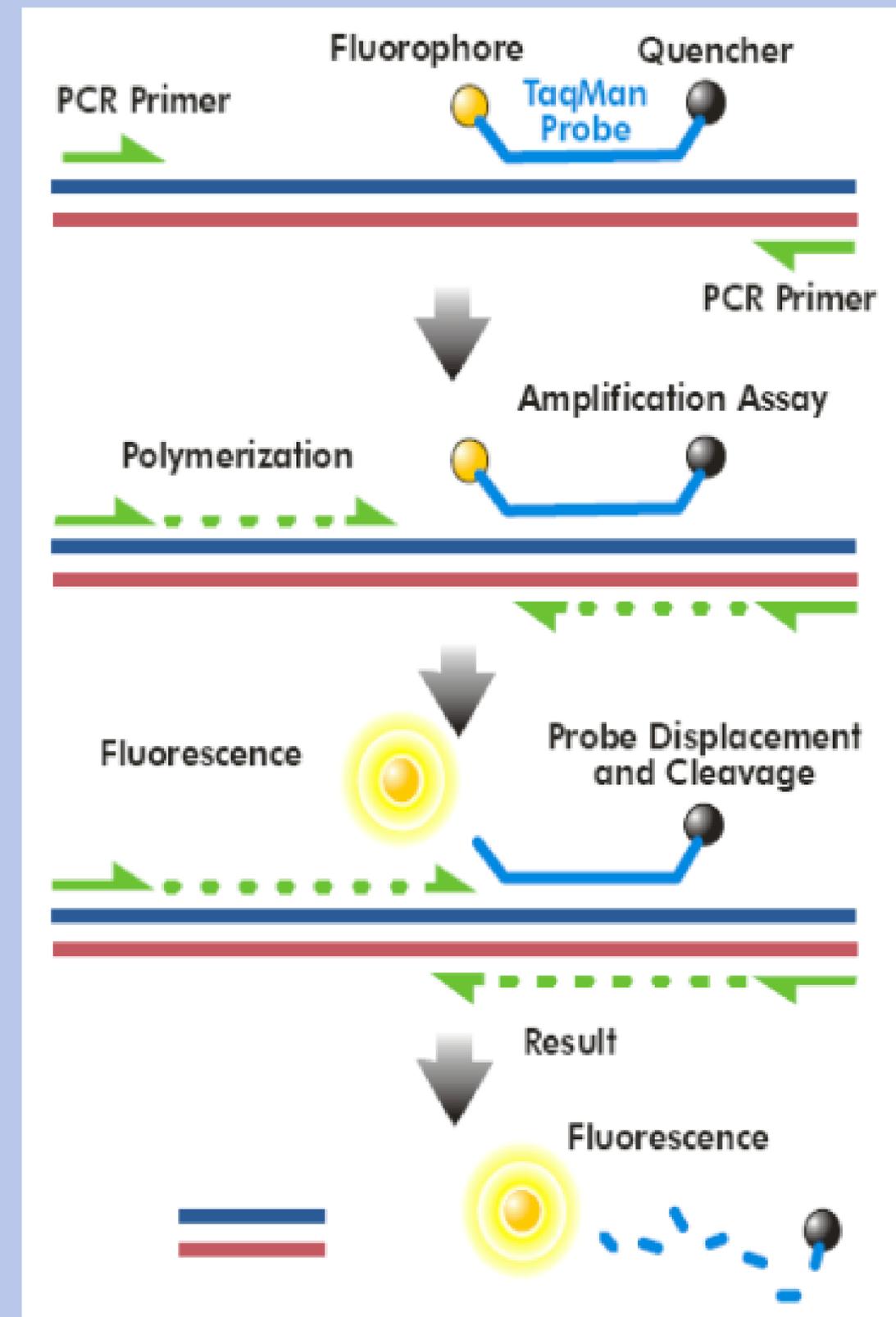


Sonda TaqMan

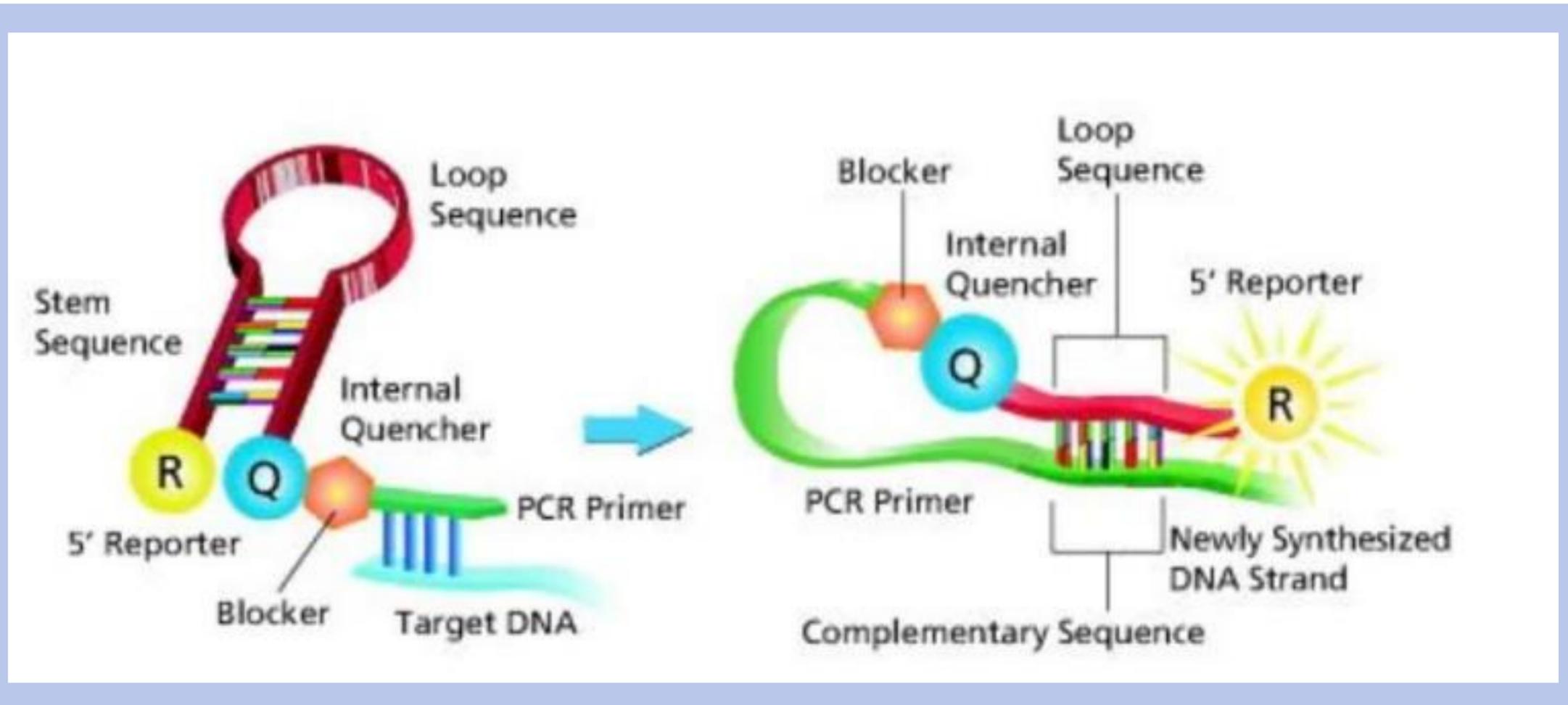
La sonda di tipo TaqMan è una sonda di idrolisi disegnata in maniera da ibridarsi all'interno della regione amplificata nella reazione di PCR.

Il principio della sonda si basa sull'attività esonucleasica 5' - 3' della Taq polimerasi che scinde una sonda marcata durante la sua ibridazione alla sequenza complementare consentendo l'emissione di fluorescenza.

La sonda TaqMan è costituita da un fluoroforo (reporter) fissato in modo covalente all'estremità 5' di un oligonucleotide e un disattivatore (quencher) all'estremità 3'



Sonde Scorpions



Le Sonde Scorpions sono sonde simili alle molecular beacons ma con al 3' terminale una sequenza PCR primer specifica per l'estensione del target. A legare la sonda al primer c'è un "blocker" una modificazione chimica che impedisce alla Taq DNA polimerasi di copiare la sequenza dello Scorpion, impedendo così l'apertura non specifica del loop.

CONFRONTO

TaqMan

Costi ridotti

Semplice
progettazione

Limitata sensibilità

Dimensioni minori

Scorpion

Costi elevati

Complessa
progettazione

Elevata sensibilità

Dimensioni maggiori



MANIPOLAZIONE DEL DNA

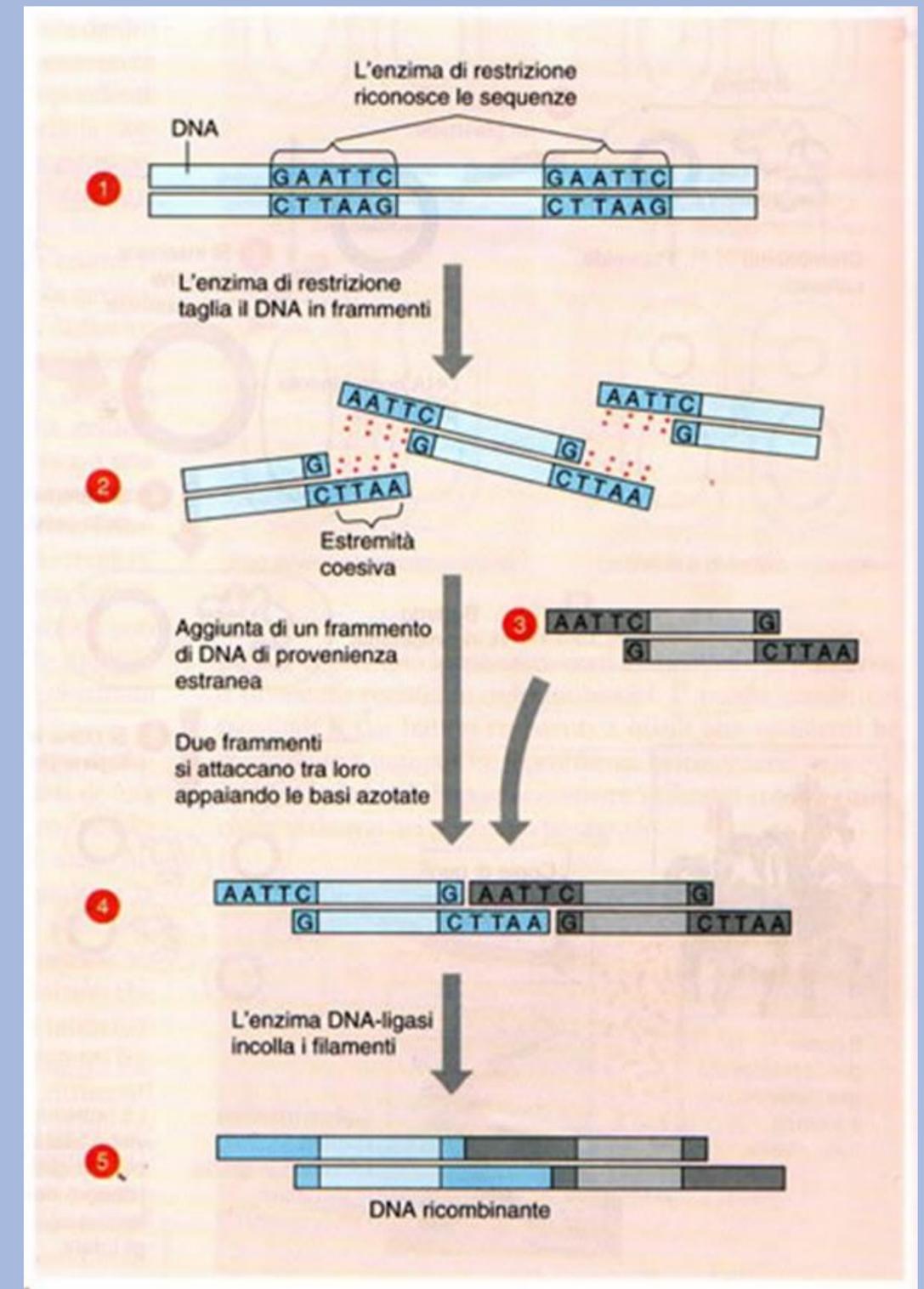
ENZIMI DI RESTRIZIONE

-Riconoscono sequenze specifiche di nucleotidi presenti su un filamento di DNA.

- Vengono divisi in tre classi in base a:
 - organizzazione in subunità dell'enzima;
 - richieste di cofattori;
 - sito di riconoscimento e sito di taglio;

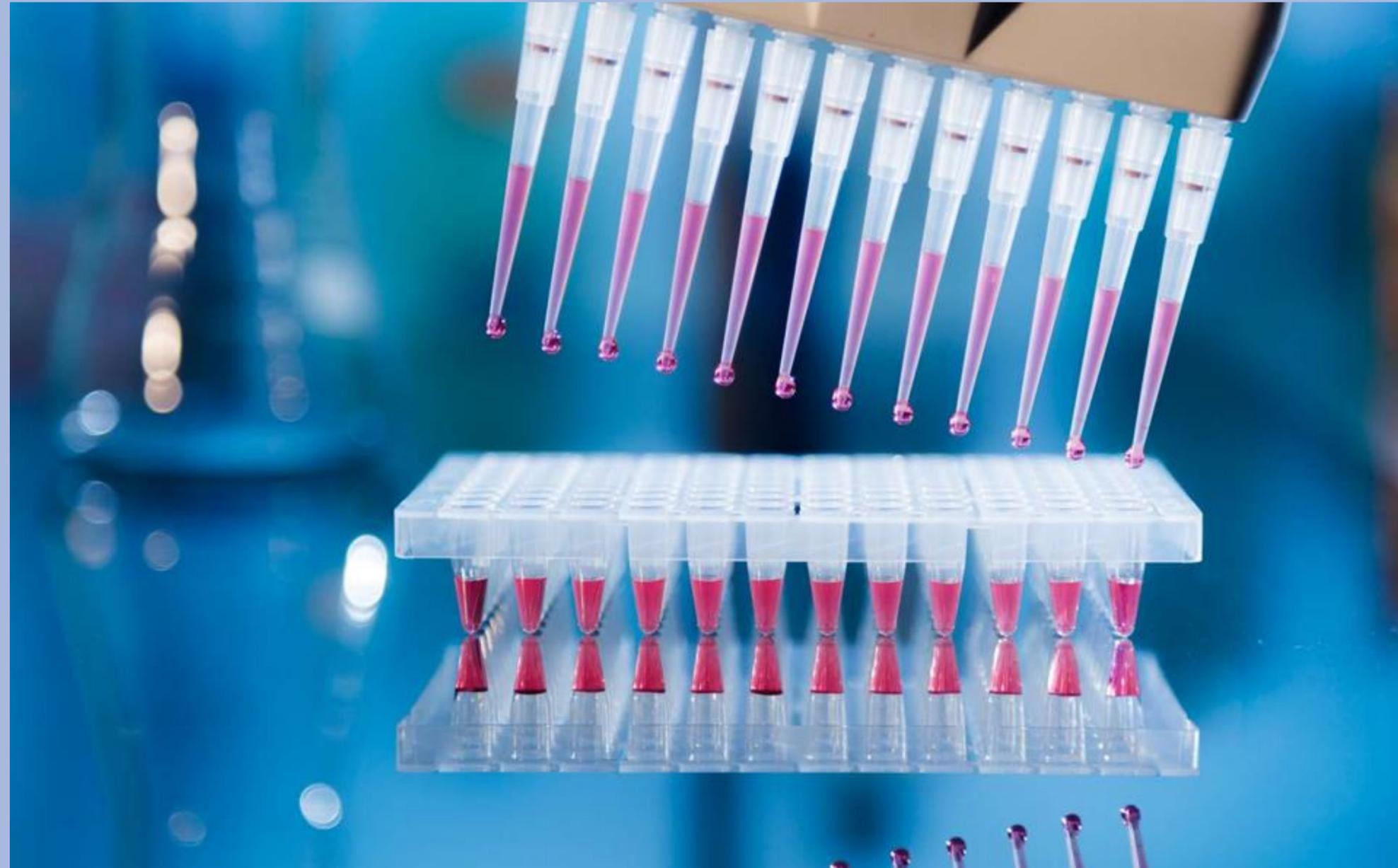
-Vengono utilizzati:

- per clonare frammenti di DNA;
- nella PCR per preparare il DNA all'amplificazione.



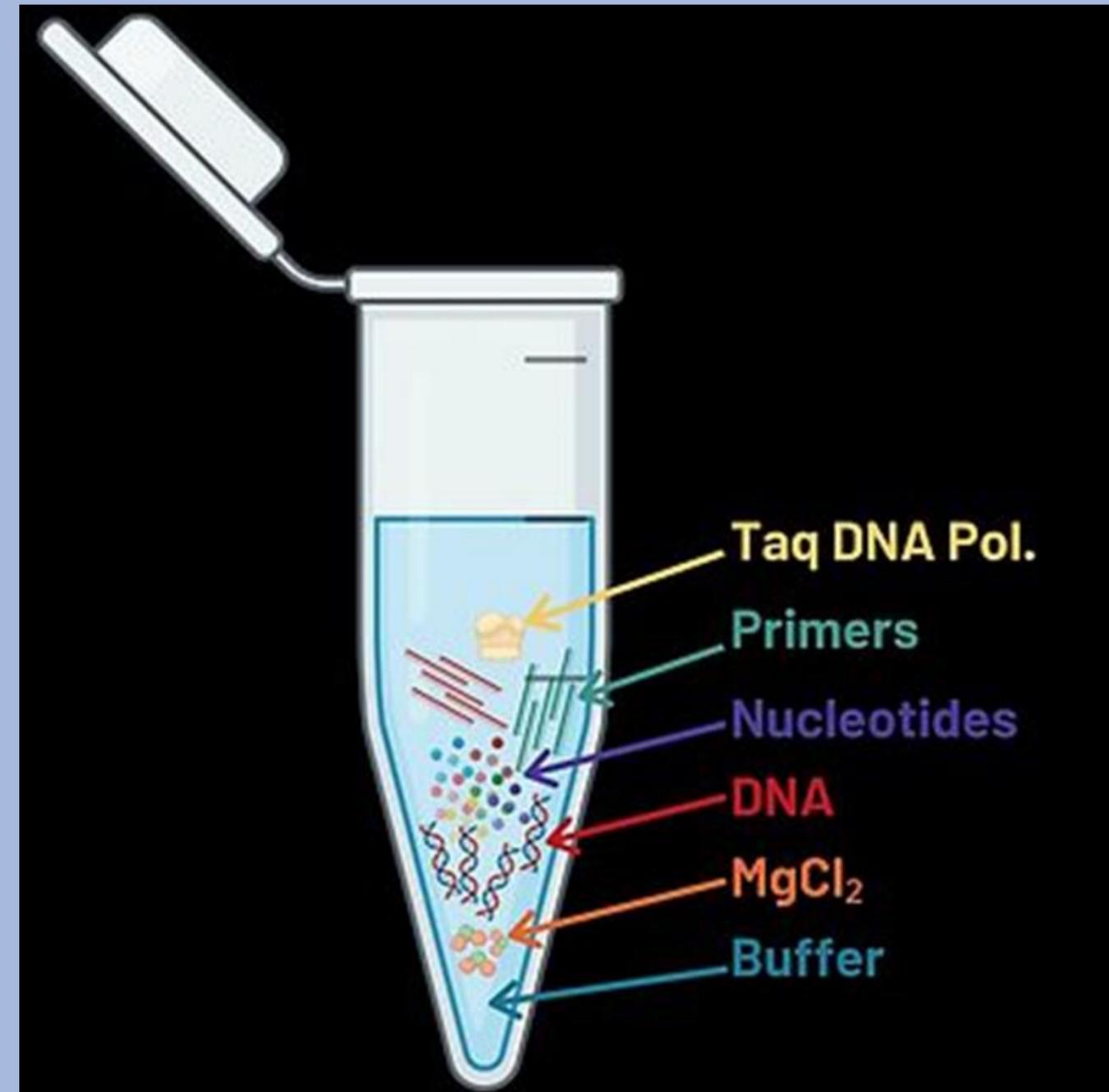
REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

La PCR è una tecnica che fu ideata da Kary Mullis, la quale consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico.



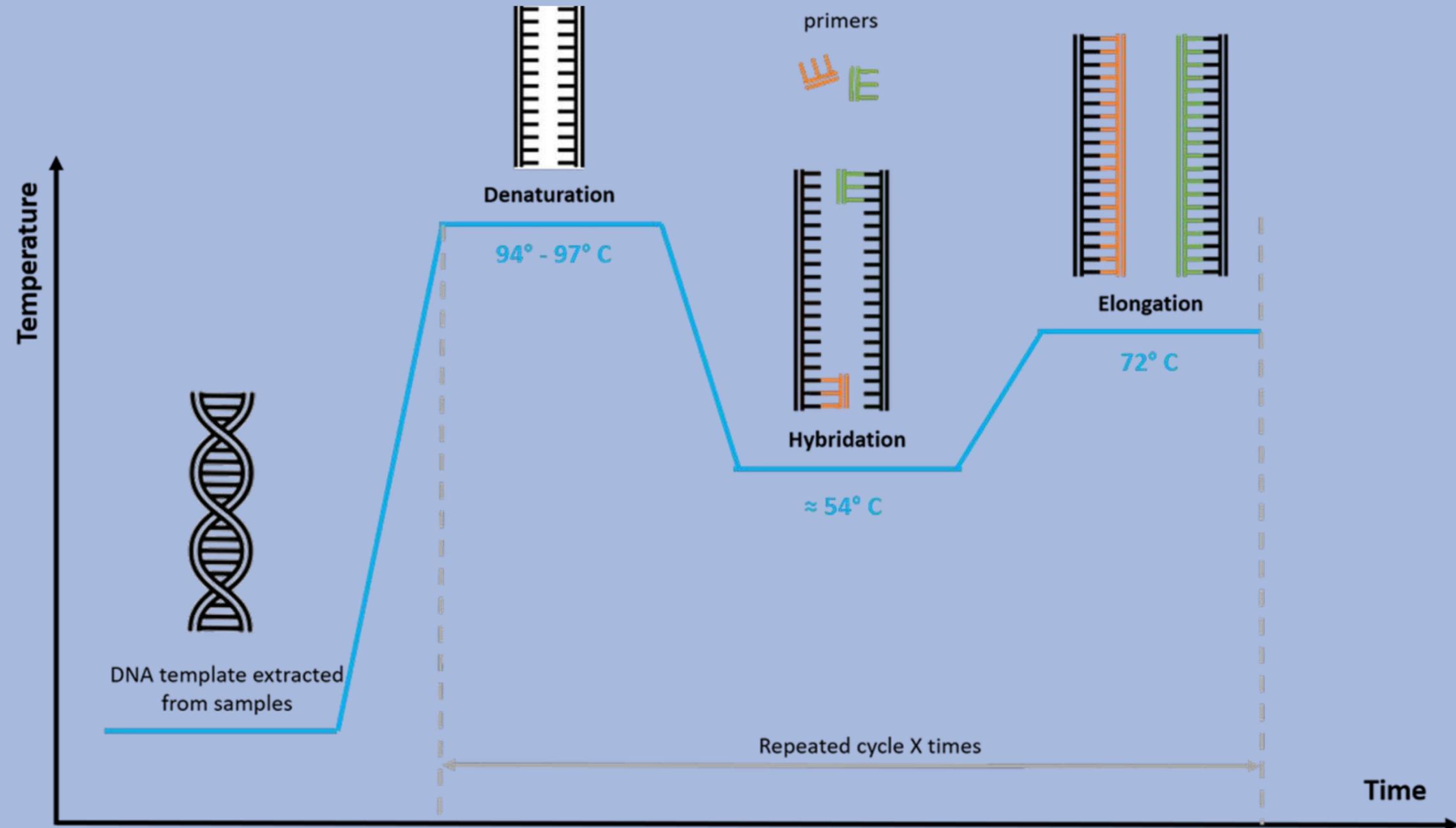
REAGENTI DELLA PCR

- DNA stampo
- Oligonucleotidi
- Taq-polimerasi
 - dNTP
 - Buffer
- Cloruro di magnesio
 - Acqua



FASI DELLA PCR

- Denaturazione
- Annealing
- Estensione



TERMOCICLATORE

Apparecchio che permette di ottenere con grande precisione e omogeneità le variazioni di temperatura necessarie al compimento della reazione ciclica di PCR.

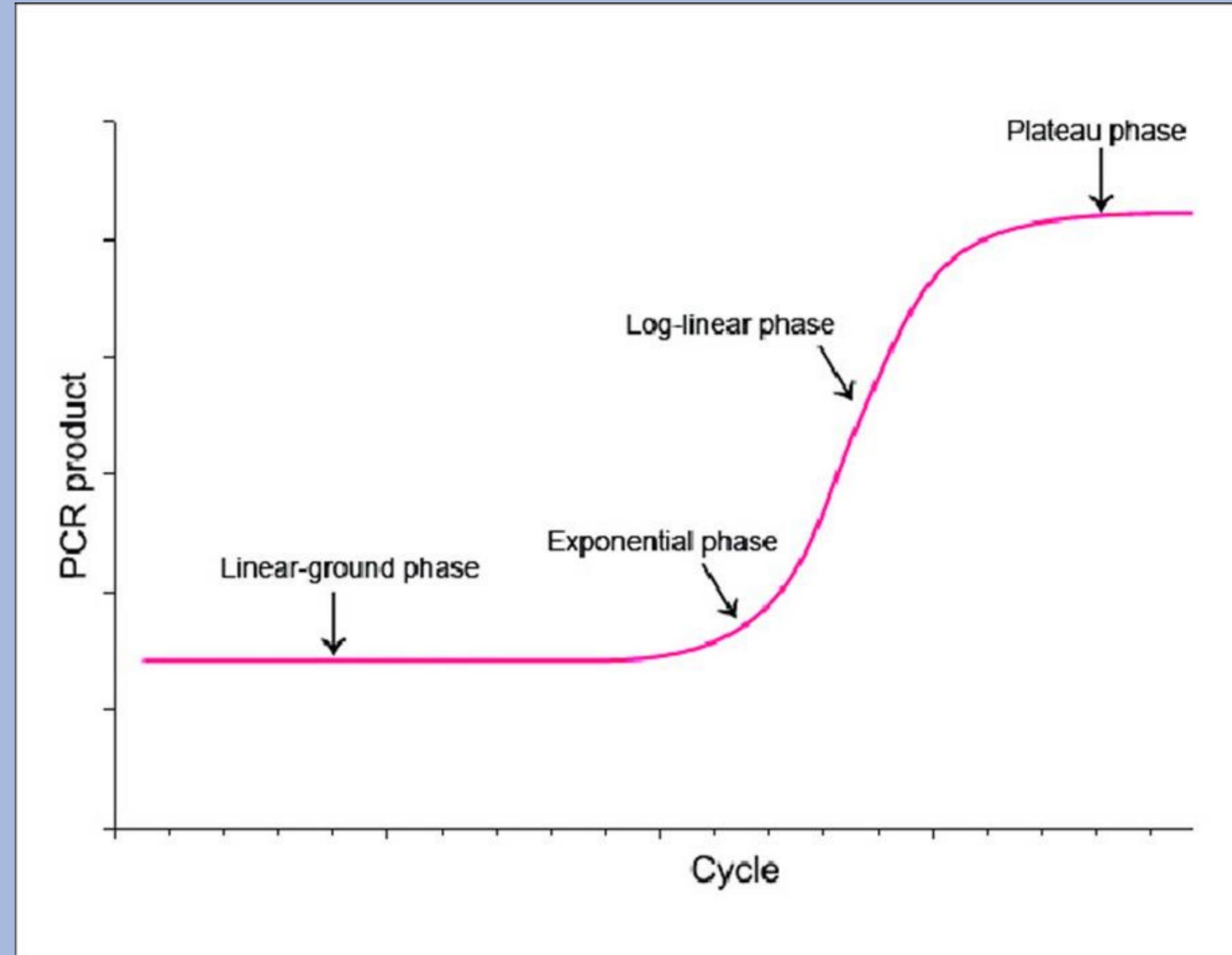
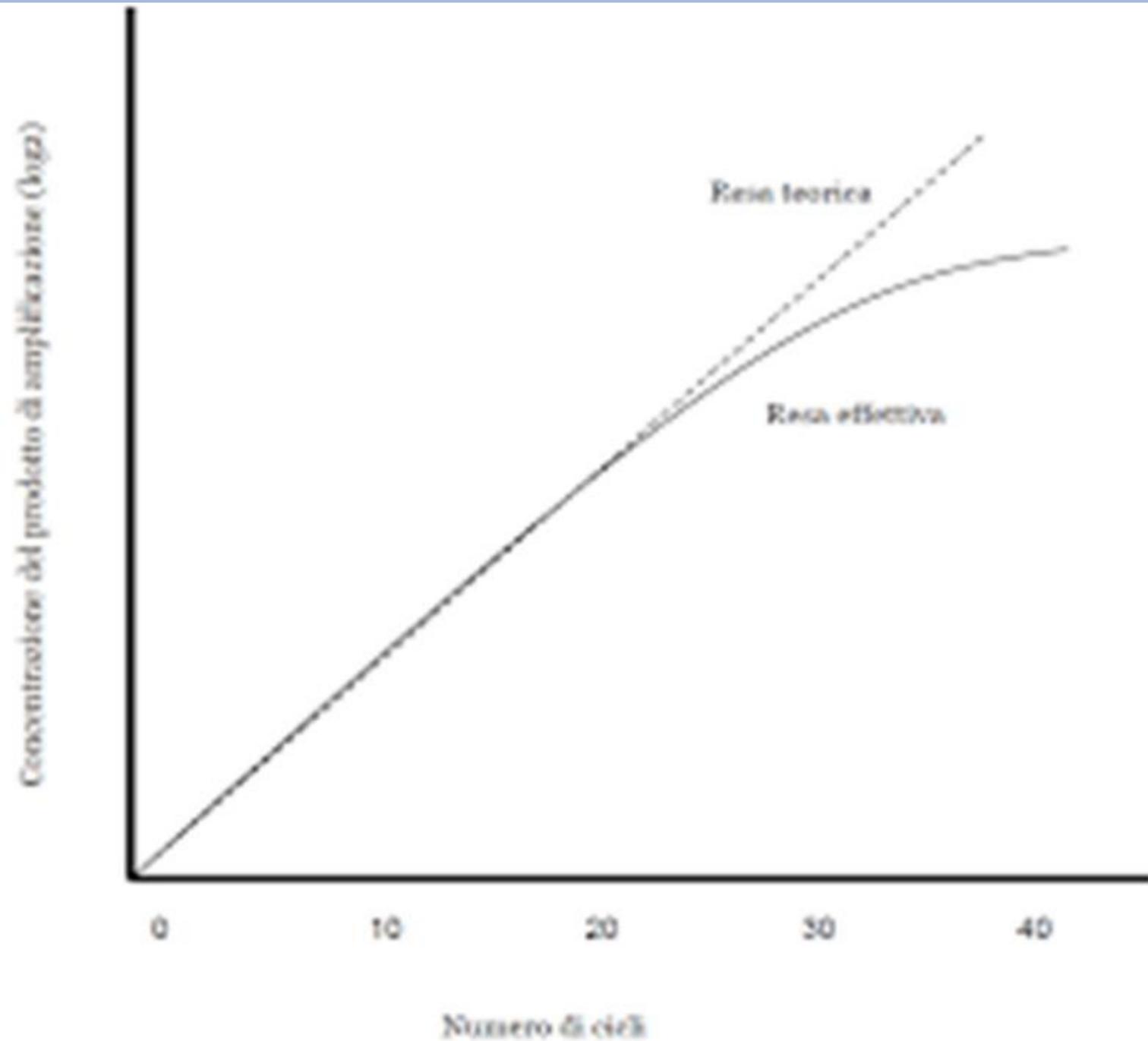


CINETICA ED EFFICIENZA

$$Y=2^n$$



$$Y=(1+X)^n$$



PCR QUANTITATIVA

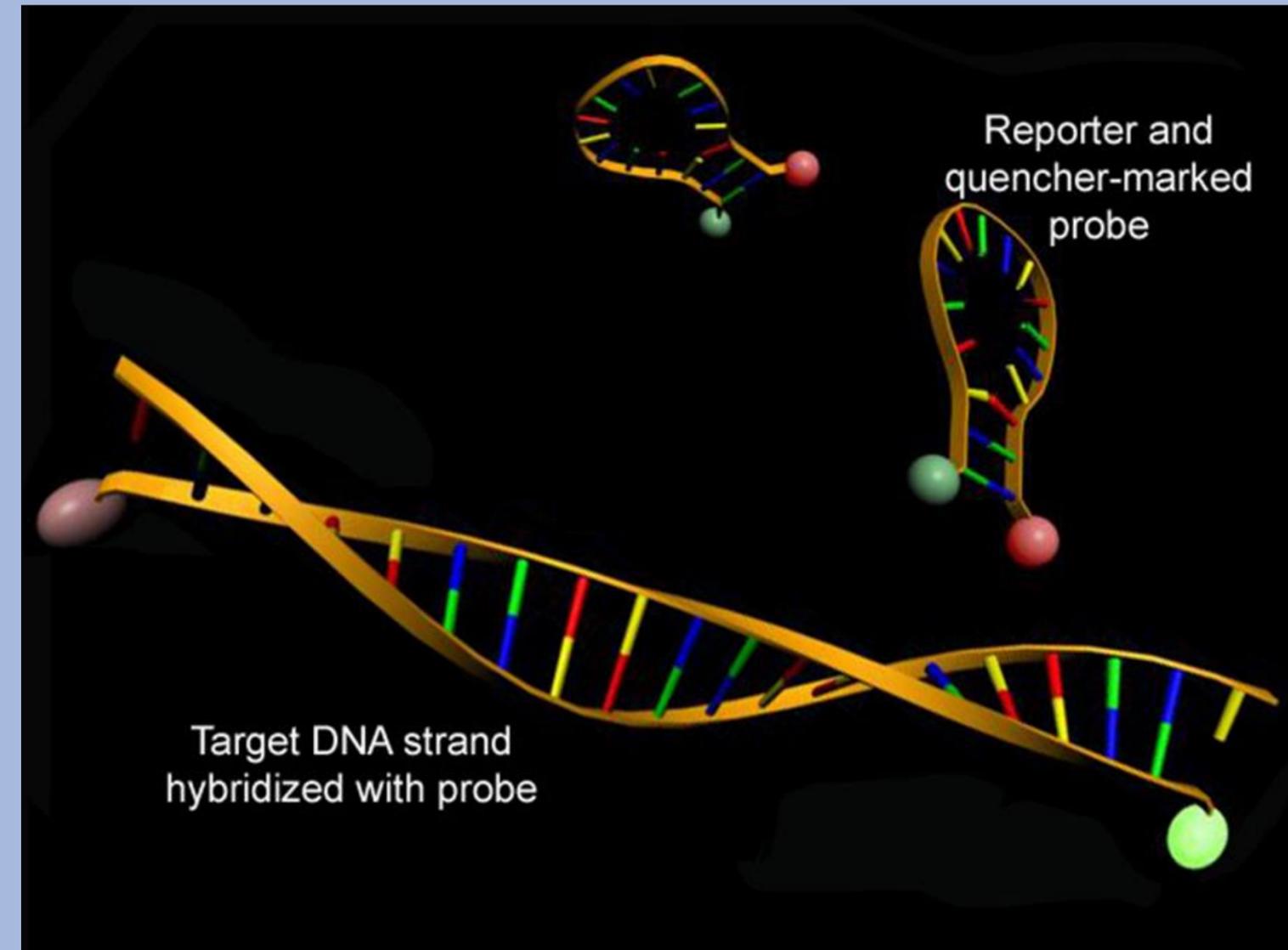
- PCR quantitativa mediante riduzione scalare;
- PCR quantitativa con metodo dello standard esterno;
- PCR quantitativa non competitiva mediante standard interno;
- PCR quantitativa competitiva mediante standard interno;
- PCR quantitativa competitiva dinamica o PCR real time.

PCR REAL-TIME

Le tecnologie Real-Time comprendono sistemi di amplificazione PCR in grado di ottenere simultaneamente nella stessa provetta sia il processo di amplificazione sia quello di rivelazione dell'amplificato.

Si avvalgono di particolari strumenti che uniscono un termociclatore ad un fluorimetro e che permettono di monitorare in tempo reale la quantità di prodotto che si sta formando nella fase esponenziale di amplificazione e di ottenere così stime della concentrazione del DNA bersaglio di partenza.

La rivelazione del DNA amplificato avviene tramite l'utilizzo di particolari sonde specifiche per i frammenti da amplificare che generano segnali fluorescenti.



TRATTAMENTO DEL CAMPIONE E PREVENZIONE DA CONTAMINAZIONE

Abbiamo 3 tipi di contaminazioni:?

- carry-over;
- contaminazione crociata;
- contaminazione nella fase di rivelazione.



Separare l'area di preparazione della PCR e l'area dove vengono analizzati i risultati.

- Estrazione preliminare per via chimica o estrazione in fase solida.
- Conservazione a -20°C o -80°C .
- Inattivazione delle ribonucleasi.



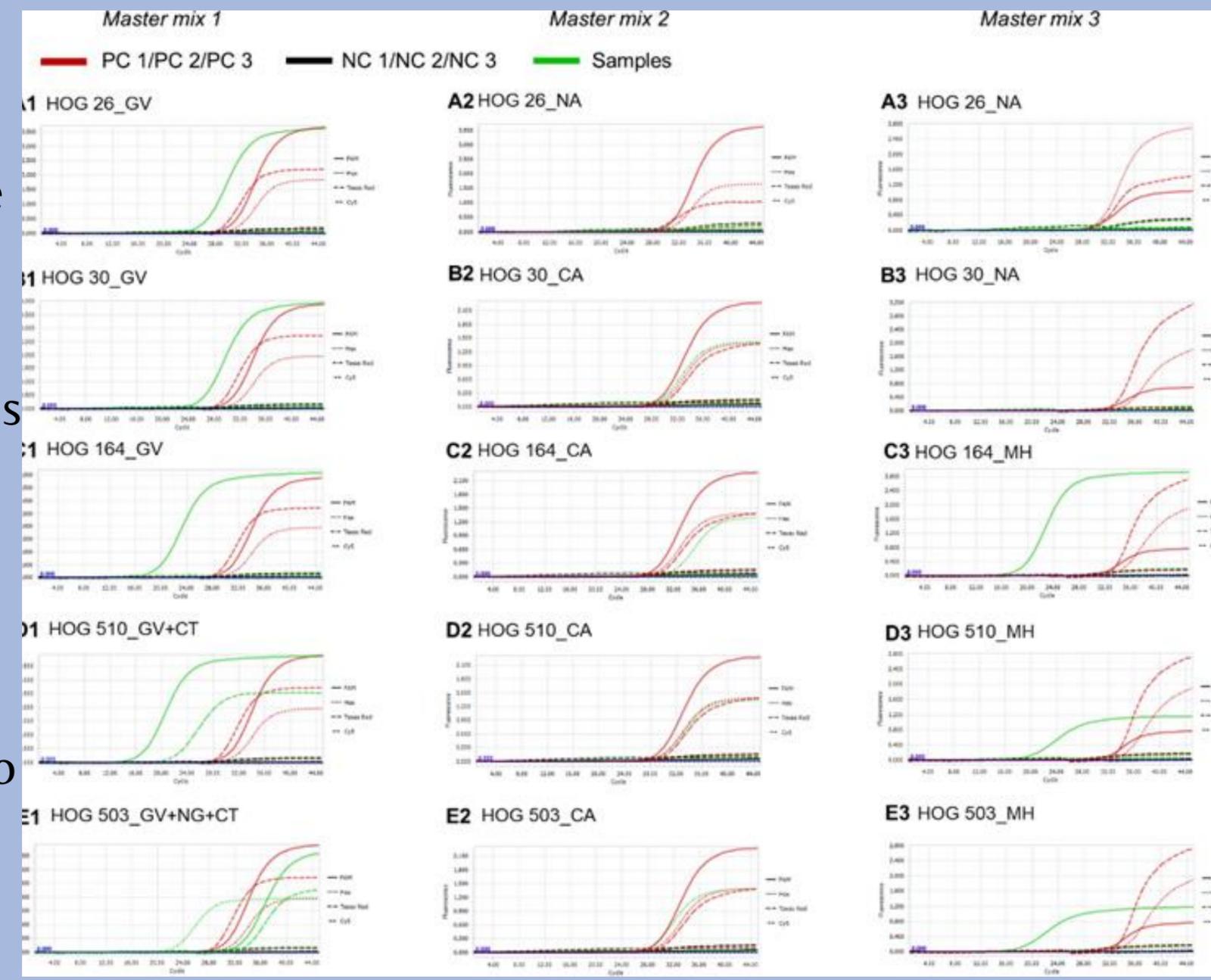
APPLICAZIONI

- Malattie infettive (HIV, tubercolosi)
- Test genetici
- Diagnosi terapie anti-cancro
- Determinazione del sesso
- Medicina legale
- Studi evoluzione molecolare
- Identificazione OGM

Simultaneous real-time PCR detection of nine prevalent sexually transmitted infections using a predesigned double-quenched TaqMan probe panel.

(Ha T. V. Bui, Huyen T. Bui, Son V. Chu, Huyen, T. Nguyen, Anh T. V. Nguyen, Phuong T. Truong, Thang T. H. Dang, Anh T. V. Nguyen)

Il 28 aprile 2020 è stata ricevuta l'approvazione del consiglio di etica medica e lo studio è stato condotto da dicembre 2020 a luglio 2022. Questo studio si è concentrato sullo sviluppo di un test PCR simultaneo in tempo reale sensibile che utilizza sonde TaqMan a doppia tempra per il rilevamento di nove agenti patogeni comunemente presenti in Vietnam. (Chlamydia trachomatis (CT), Neisseria gonorrhoeae (NG), Candida albicans (CA), Mycoplasma genitalium (MG), Trichomonas vaginalis (TV), Mycoplasma hominis (MH), Gardnerella vaginalis (GV) e alfa herpesvirus umano (HSV) di tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2)). Fino a 532 casi (99,44%) erano positivi per almeno una delle nove malattie sessualmente trasmissibili. I dati ottenuti indicano che il nuovo test della sonda TaqMan a doppia tempra PCR in tempo reale è affidabile per la rilevazione della maggior parte delle principali malattie sessualmente trasmissibili, con un'elevata prevalenza di agenti patogeni singoli e multipli.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36877694/>



Bibliografia

- [https://www.treccani.it/enciclopedia/diagnostica-molecolare_\(Dizionario-di-Medicina\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/diagnostica-molecolare_(Dizionario-di-Medicina)/)
- Southern blotting by Kevin F. Kelly, Department of Medical Genetics, Aberdeen Royal Hospitals NHS Trust, Foresterhill, Aberdeen AB9 2ZB, Proceedings of the Nutrition Society (1996), 55, 591-597
- https://moodle2.units.it/pluginfile.php/371344/mod_resource/content/1/20-DNA%20ricombinante%203.pdf
- <https://us.vwr.com/store/category/uv-transilluminators/2993662#:~:text=UV%20transilluminators%20are%20used%20in,to%20fluoresce%20and%20become%20visible.>
- Sambrook et al. 1989
- https://www.mun.ca/biology/scarr/Southern_Blot_analysis.html
- <https://microbenotes.com/southern-blot/>
- <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/southern-blot-principles-example-workflow-applications>
- [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23591355/.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23591355/)
- https://elearning.uniroma1.it/pluginfile.php/1359881/mod_resource/content/1/Methodologie2024_Lezione%201_Tecniche%20di%20base.pdf
- <https://www.chimica-online.it/download/autoradiografia.htm>
- <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/southern-blotting/#:~:text=of%20southern%20blotting-,Advantages,sizing%20of%20their%20repeat%20expansion.>



GRAZIE PER L'ATTENZIONE