

Biotechnologie

Le sonde molecolari

Definizione

Tecniche di ibridazione

II DNA ricombinante

Sonde molecolari

Disegno in copertina

tRNA By Vossman - Own work, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=405262>

Definizione

Prerequisiti

Tecniche di ibridazione su filtro:
Southern blotting e Northern blotting,
dot-blot

Tecniche di ibridazione in situ e su
colonia: FISH, ibridazione su colonia

DNA Microarray

Photo credits

Definizione

BioTechnologieSanitarie.it

Definizione

Cercare e identificare una precisa sequenza di basi azotate o un gene è stato certamente un problema fino a qualche tempo fa quando sono state messe a punto le sonde molecolari.

Le sonde molecolari si basano sul principio che i singoli filamenti spaiati degli acidi nucleici hanno una naturale tendenza ad accoppiarsi con le sequenze complementari.

Prerequisiti

BioTechnologieSanitarie.it

Prerequisiti

Sintesi della sonda. Sulla base di questo principio sono state sintetizzate delle sequenze di basi azotate (le più usate vanno da qualche decina a un migliaio) attraverso meccanismi diversi:

- ❖ clonazione del DNA in vettori molecolari
- ❖ attraverso l'uso di trascrittasi inverse, partendo quindi dall'mRNA e arrivando al cDNA
- ❖ sfruttando la PCR
- ❖ per sintesi chimica

Prerequisiti

Quello che si ottiene è una **sonda a DNA o RNA** chiamata anche DNA o RNA probe.

Una volta prodotta, la sonda deve essere messa a confronto con migliaia di sequenze tra cui cercare il gene target. Bisogna quindi trovare un metodo per marcarla e facilitare la lettura.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde radioattive o calde

La soluzione più rapida è la marcatura radioattiva con ^{32}P e ^{35}S (elementi presenti nella struttura molecolare).

La sensibilità di tale marcatura è alta considerando che in questo modo si riesce a riconoscere il gene target anche quando è presente in picogrammi ma bisogna tenere conto della loro pericolosità e dei costi.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde radioattive o calde

I due isotopi citati ad esempio devono essere conservati in contenitori di piombo.

Tali attività devono essere eseguite in laboratori appositi muniti di cappe e docce di contaminazione.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde radioattive o calde

Bisogna indossare sempre guanti di lattice e mai toccare direttamente la sorgente radioattiva.

Devono esserci in dotazione degli schermi protettivi.

Lo smaltimento deve seguire procedure molto accurate.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde non radioattive o fredde

Ovviamente in questo caso non ci sono problemi per la salute di chi opera e per l'ambiente.

Il sistema consente di usare la sonda in concentrazioni molto alte.

I costi sono bassi.

I tempi di analisi più corti.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde non radioattive o fredde

La marcatura può essere diretta attraverso *fluoresceina*.

I fluorofori (o fluòrocromi), a diversa lunghezza d'onda e che quindi emettono colori diversi, vengono incorporati nei nucleotidi e quindi rilevati attraverso pellicole, microscopi a fluorescenza o con altri rilevatori.

Prerequisiti

Marcatura. Sonde non radioattive o fredde

La marcatura può essere indiretta attraverso *biotina* o *digossigenina*.

La biotina è una vitamina che si lega chimicamente agli acidi nucleici. Mentre la digossigenina si lega solo ai nucleotidi pirimidinici. Si estrae dalla *Digitalis purpurea*.

L'uso di questi marcatori implica il ricorso poi a tecniche immunoenzimatiche con anticorpi monoclonali.

Prerequisiti

Ibridazione La sonda marcata con il metodo scelto deve essere poi messa a confronto con il gene target in modo da poter sfruttare la sua tendenza naturale ad accoppiarsi con una eventuale sequenza complementare. Questo riconoscimento e appaiamento (ibridazione) deve essere preceduto dalla denaturazione perché deve avvenire tra filamenti singoli.

Prerequisiti

Denaturazione

Avviene sottoponendo sonda e gene target all'azione del calore.

Altro metodo: trattamento in ambiente alcalino

BioTecnologieSanitarie.it

Prerequisiti

Tramite l'uso delle sonde si possono rintracciare anche sequenze non esattamente e del tutto complementari presenti in DNA di specie diverse. Per esempio geni omologhi in specie diverse. O nella stessa specie geni omologhi che derivano da un gene ancestrale comune.

Cambiando alcune condizioni infatti si possono ottenere ibridazioni di segmenti parziali (15-20 nucleotidi contigui).

Vediamo ora alcuni esempi.

Tecniche di ibridazione

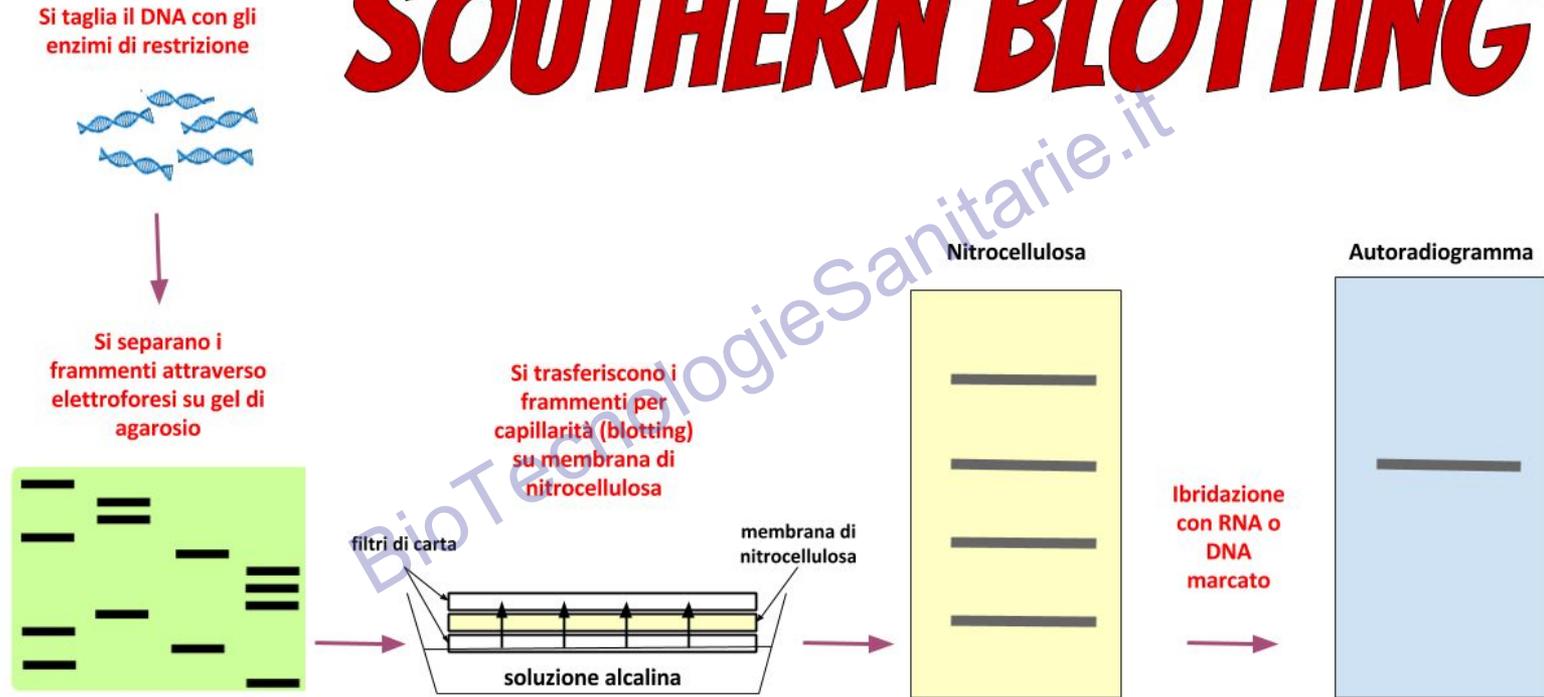
BioTechnologySanitarie.it

Southern blotting

Le tappe fondamentali per individuare il gene target sono:

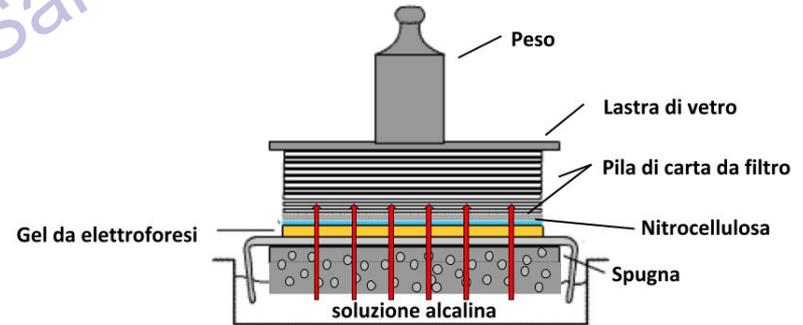
- ❖ **digestione del DNA attraverso enzimi di restrizione**
- ❖ **separazione dei frammenti attraverso elettroforesi su gel di agarosio**
- ❖ **trasferimento per capillarità (blotting) su membrana di nitrocellulosa o nylon**
- ❖ **denaturazione**
- ❖ **ibridazione con sonda radioattiva**

SOUTHERN BLOTTING



Southern blotting

L'immagine precedente semplifica molto il procedimento. In realtà quando si trasferiscono i frammenti per capillarità sulla membrana di nitrocellulosa la struttura è più complessa come si può vedere nel disegno di lato.



Trasferimento dei frammenti di DNA dal gel alla membrana di nitrocellulosa

Southern blotting

Per ottenere l'ibridazione la membrana di nitrocellulosa viene messa in una bottiglia di vetro con un tampone e la sonda marcata con radionuclidi.

La bottiglia viene fatta ruotare delicatamente per diverse ore per far avvenire l'ibridazione.

Poi viene lavata per eliminare la sonda in eccesso e il segnale emesso dalla sonda viene identificato.

Southern blotting

Con questa tecnica si possono testare genomi di batteri, virus e cellule eucariotiche e anche campioni eterogenei di DNA.

Molto importante in campo diagnostico perché quando si tratta un DNA con gli enzimi di restrizione i frammenti sono numerosissimi e la strisciata che si ottiene con l'elettroforesi è quasi continua. Questo metodo invece consente di definire meglio i frammenti di interesse soprattutto quando si devono fare diagnosi in campo genetico oppure nel DNA fingerprinting.

Northern blotting

La tecnica è simile solo che in questo caso la sonda è a DNA mentre il gene target è l'RNA.

<https://www.youtube.com/watch?v=Vnipby1-D3g>

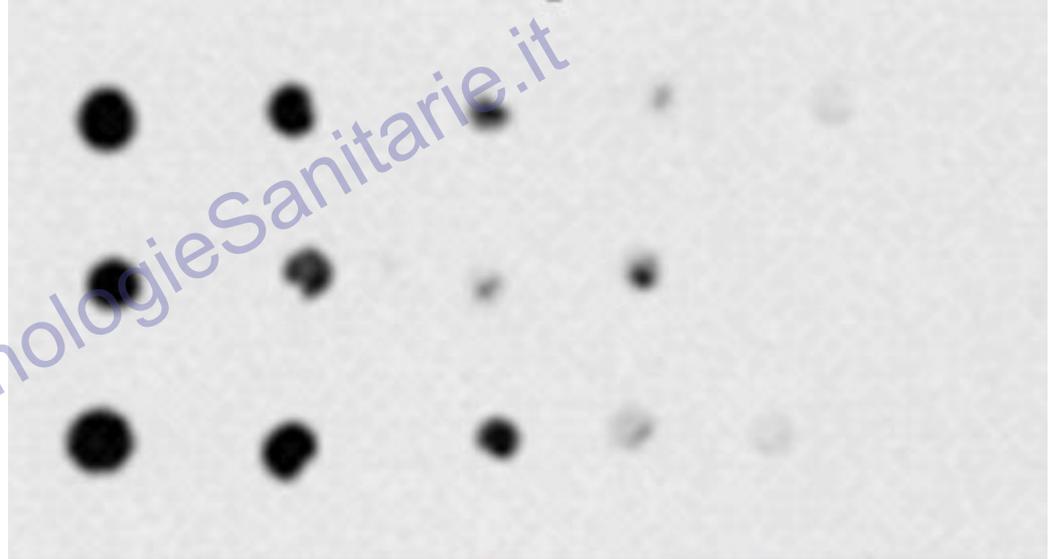


Dot-blot

La tecnica è più semplice rispetto alle precedenti e anche più rapida. Viene usata nella diagnostica microbiologica perché consente di fare screening rapidi alla ricerca di patogeni (*Chlamydia trachomatis*). A differenza della Northern e Southern blotting i miscugli di DNA eterogenei non vengono sottoposti ad elettroforesi. Vengono depositi direttamente sul filtro come punti e poi, dopo alcuni trattamenti, ibridati con sonda marcata.

Dot-blot

Il test dot-blot può servire come rapida conferma della presenza nel cibo di *Listeria monocytogenes*



Tecniche di ibridazione “in situ” e su colonia

BioTechnologySanitarie.it

Ibridazione in situ (FISH)

La tecnica è molto interessante perché consente di localizzare direttamente sui cromosomi una sequenza specifica di basi azotate. La presenza ma anche l'assenza. Quindi questa tecnica è molto importante per la diagnostica genetica e ancora più importante per quella prenatale. Altri campi di applicazione sono quelli tumorali.

Si può realizzare anche nella fase di trascrizione sull'mRNA sempre con gli stessi scopi e in campo tissutale.

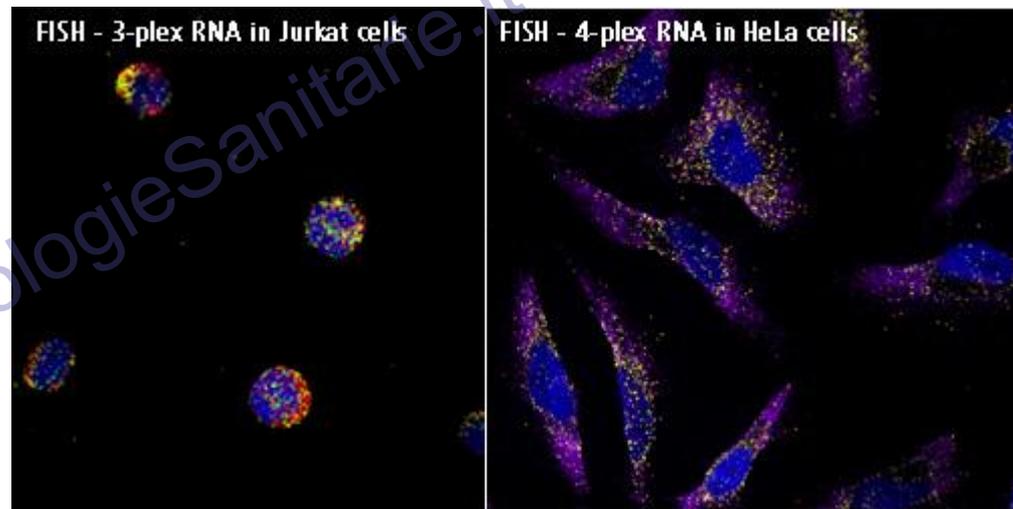
Ibridazione in situ (FISH)

La tecnica fa sì che l'ibridazione possa avvenire direttamente nelle cellule con sonde di lunghezza prestabilita e molto precisa.

La marcatura è indiretta attraverso fluorocromi e viene accertata l'avvenuta ibridazione mediante microscopio a fluorescenza.

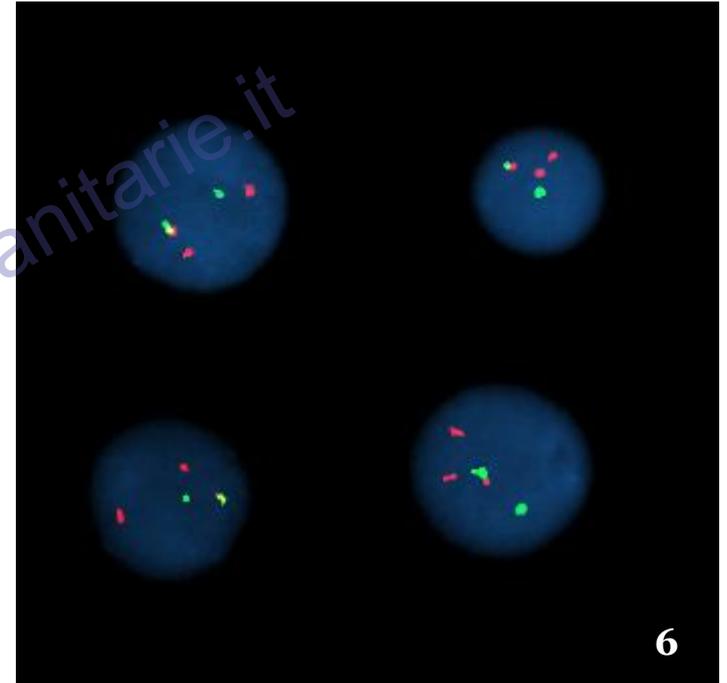
Ibridazione in situ (FISH)

Vediamo ora alcuni esempi.
Di lato potete vedere la tecnica utilizzata per evidenziare molteplici forme di RNA all'interno di due tipi diversi di cellule.



Ibridazione in situ (FISH)

In quest'altro caso invece sono state fotografate cellule in interfase positive per un riarrangiamento cromosomico t(9;22)



Ibridazione su colonia

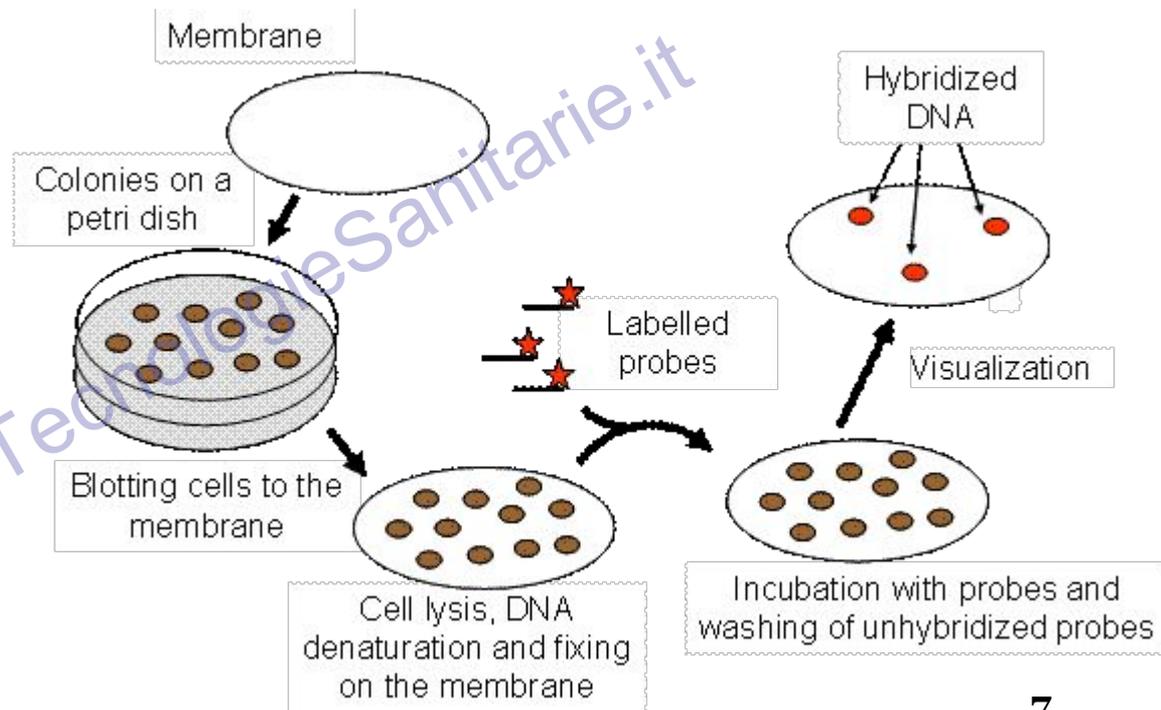
Serve soprattutto per isolare un clone ricombinante in alternativa alla α -complementazione e alla inattivazione inserzionale.

Infatti non sempre le due metodiche sono precise e affidabili.

Un esempio vale per tutti: quando l'efficienza del clonaggio è bassa e ci si aspetta solo pochi cloni tra centinaia di negativi.

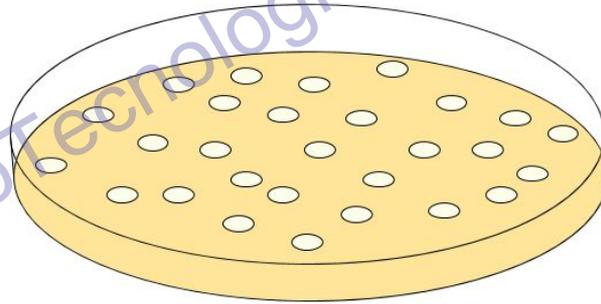
Ibridazione su colonia

Nel disegno accanto vedete l'intero procedimento. Nelle slide successive vengono, invece, evidenziate le singole fasi.



Ibridazione su colonia

**Piastra madre con colonie di batteri
trasformati in cui bisogna identificare i
cloni ricombinanti**



8

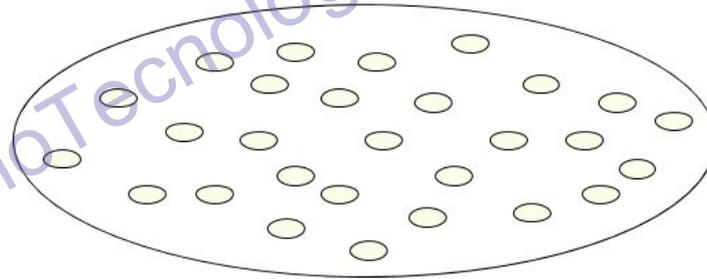
Ibridazione su colonia

Si trasferiscono le colonie su un filtro di nitrocellulosa



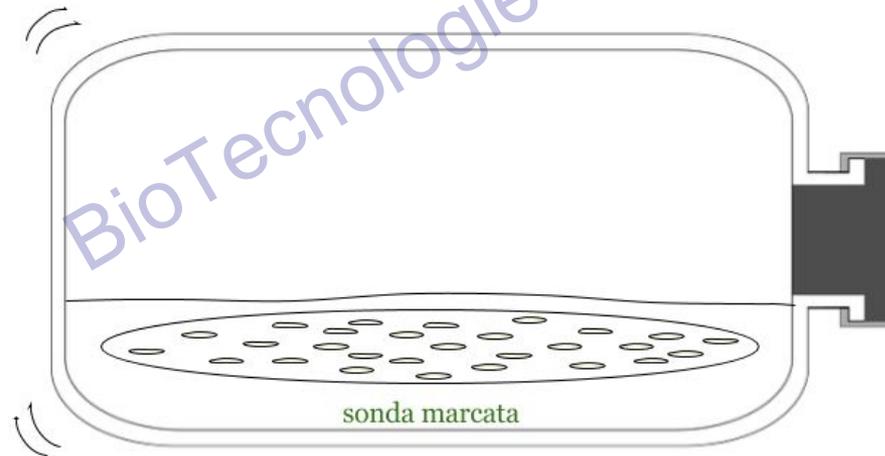
Ibridazione su colonia

Si tratta il filtro di nitrocellulosa con un detergente per fissare le colonie e poi con idrossido di sodio per denaturare il DNA e separare i filamenti.



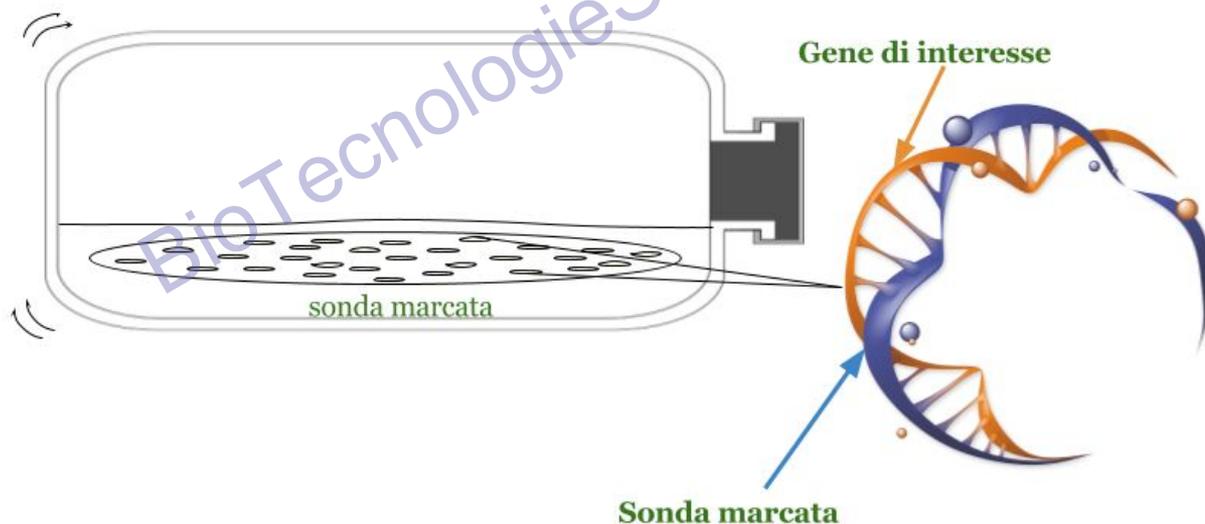
Ibridazione su colonia

Si fa reagire il filtro di nitrocellulosa con la sonda marcata a caldo radioattivamente. Il tutto avviene in una bottiglia che viene fatta ruotare lentamente



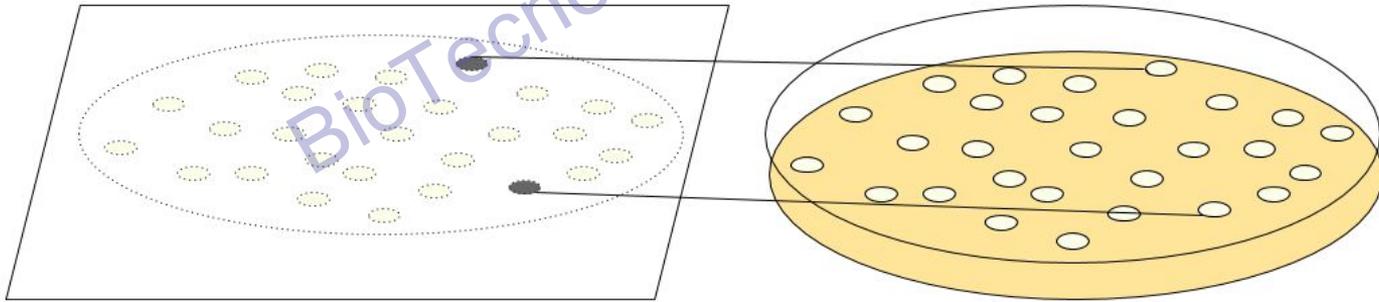
Ibridazione su colonia

Così può avvenire l'ibridazione tra la sonda marcata e i geni di interesse presenti nelle cellule batteriche.



Ibridazione su colonia

**Il filtro viene tolto dalla bottiglia e lavato per rimuovere la sonda non ibridata.
Poi esposto su una lastra di raggi X.
La lastra sviluppata viene confrontata con le colonie per individuare i cloni ricombinanti.**



DNA microarray

BioTechnologySanitarie.it

DNA Microarray o DNA chip

**Cosa sono i microarray?
Ne vedete un tipo nella
foto di lato, paragonati
ad un fiammifero.**
Sono dei supporti di
vetro o di plastica su cui
vengono fissate migliaia
di sonde molecolari.



DNA Microarray o DNA chip

I microarray possono essere fabbricati usando diverse tecnologie, come la stampa di micro solchi, con un particolare microspillo appuntito su una lastrina di vetro dove verrà attaccata covalentemente la sonda (probe) di materiale genetico ottenuta per clonazione sfruttando la tecnica PCR.

In genere la produzione è robotizzata e molto sofisticata.

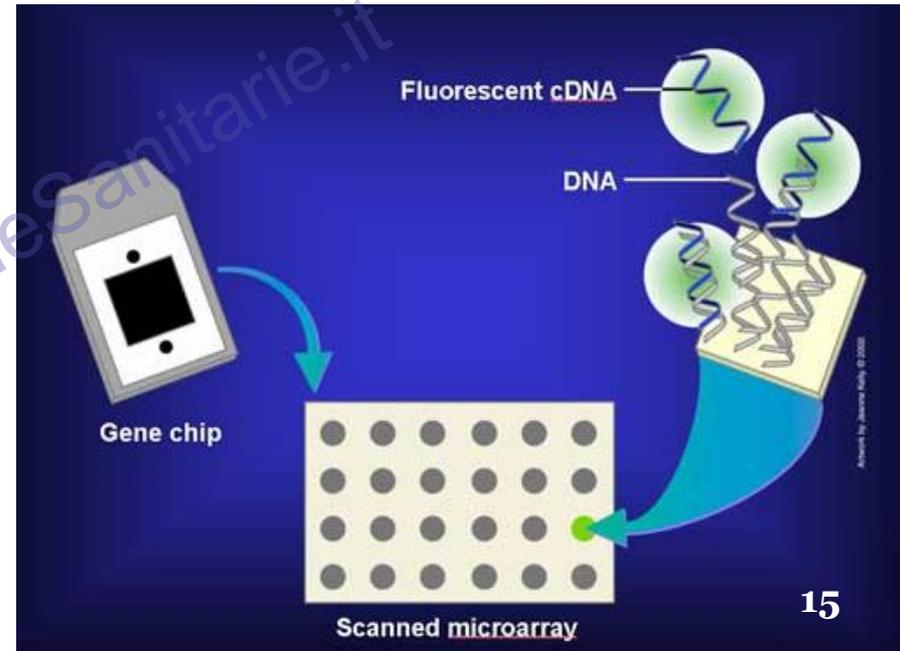
DNA Microarray o DNA chip

Ogni spot su un microarray contiene più filamenti identici di DNA.

La sequenza di DNA su ogni punto è unico.

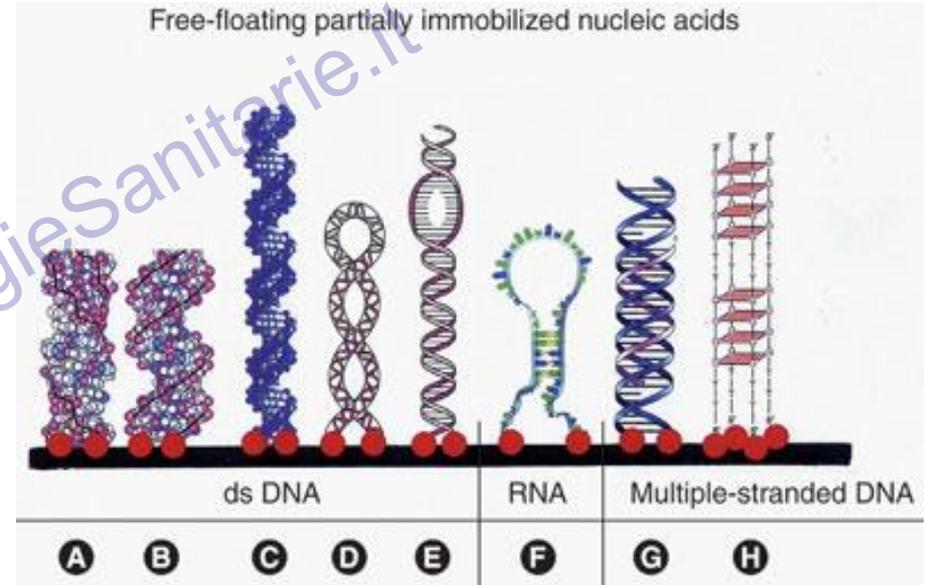
Ogni spot rappresenta un gene.

La posizione precisa e la sequenza di ogni spot viene registrato in un database.



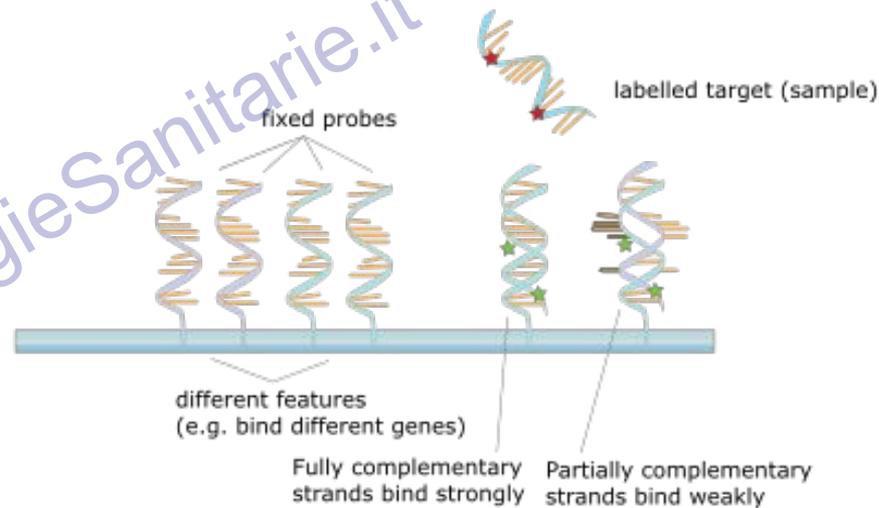
DNA Microarray o DNA chip

In questa immagine si possono vedere 8 diverse molecole di DNA ed RNA ancorate al supporto del microarray.



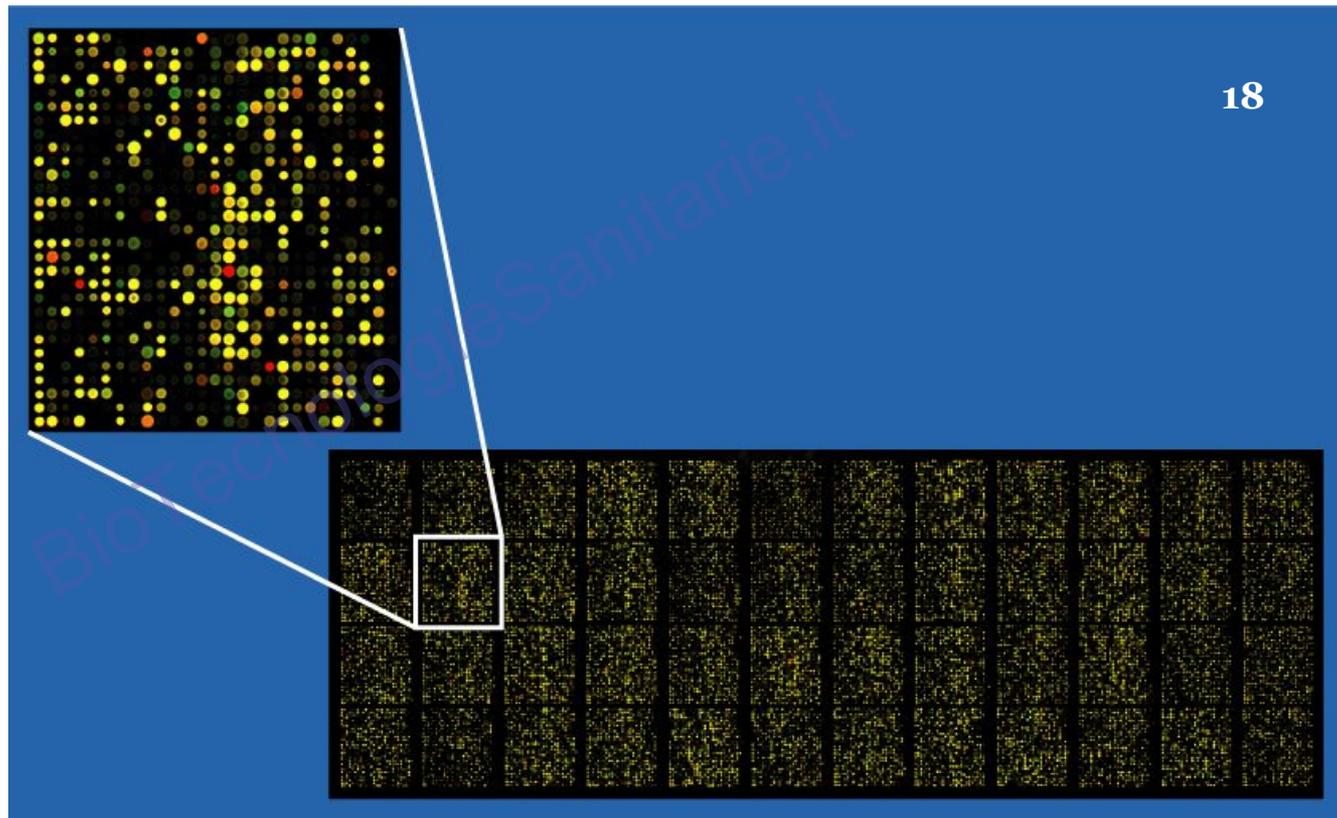
DNA Microarray o DNA chip

Sul microarray, in ogni punto, viene poi posizionato il DNA target marcato con fluorocromi. Dove si verifica ibridazione si avrà emissione di fluorescenza.



DNA Microarray o DNA chip

Questa è la lettura che ne deriva. Lettura che, è ovvio, deve essere effettuata al computer con software specifici.



18

DNA Microarray o DNA chip

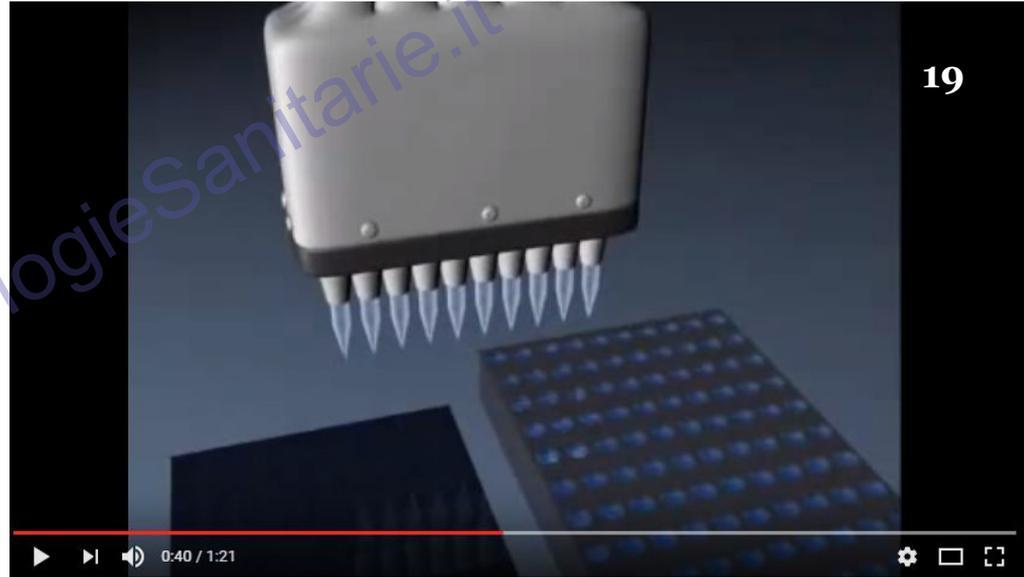
L'immagine di lato riassume molto bene il lavoro attuale nei laboratori di ricerca e diagnostici ed evidenzia come sia cambiato negli ultimi decenni.



DNA Microarray o DNA chip

Riassumiamo ora la
metodica guardando la
seguinte animazione

<https://www.youtube.com/watch?v=UgL1Pq2sk3M>



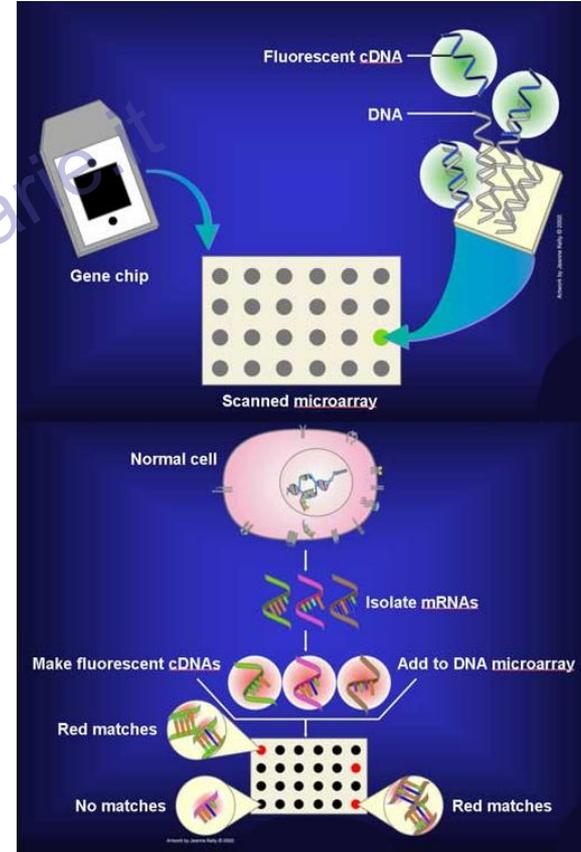
DNA Microarray o DNA chip

Se ne deduce che si può lavorare estraendo dai campioni anche mRNA che viene poi convertito in cDNA e marcato in maniera da facilitare la lettura.

Quindi si possono fare analisi sui geni e sull'mRNA in moltissimi settori diversi. Diagnosi rapide su campioni umani o su alimenti, per esempio.

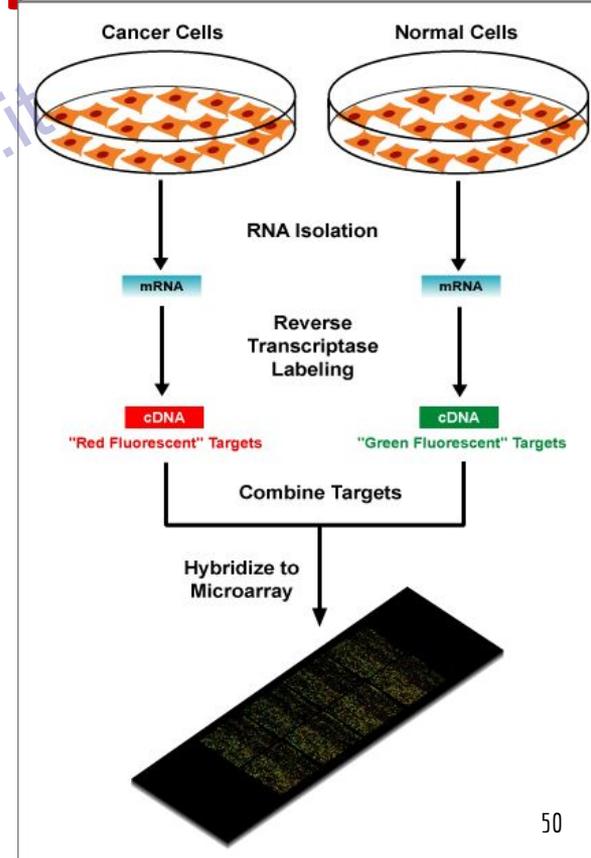
DNA Microarray o DNA chip

Nel caso schematizzato di lato si parte da una cellula normale con l'intento di individuare dei geni specifici. Si aspetta il momento in cui la cellula produce l'mRNA e lo si trasforma nel cDNA che viene marcato con fluorocromi e messo a confronto con il DNA probe del microarray. L'avvenuta ibridazione è segnalata dalla colorazione rossa.



DNA Microarray o DNA chip

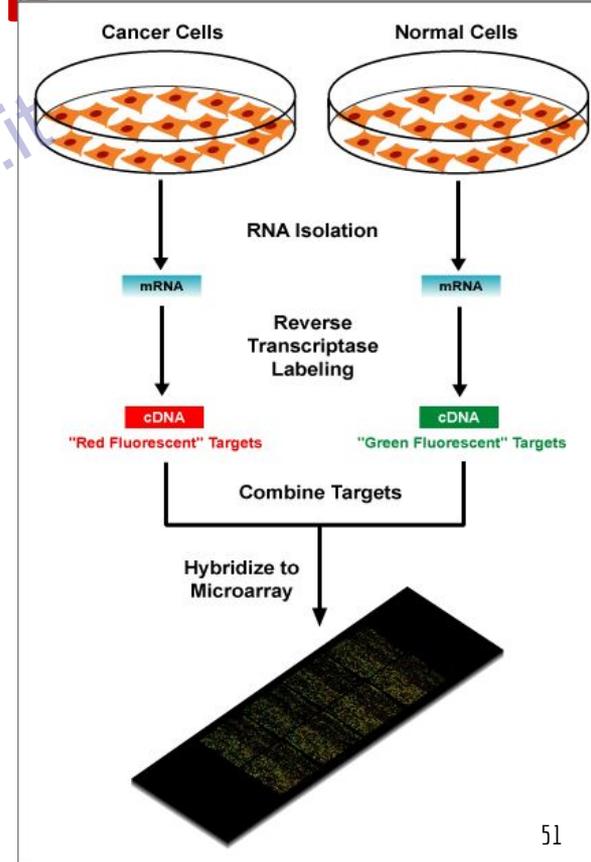
I microarray possono anche essere utilizzati per confrontare l'espressione genica tra cellule tumorali e cellule normali. Si parte dell'mRNA che, attraverso la trascrittasi inversa, viene convertito in cDNA. Poi si utilizzano due marcatori, fluorocromi a diversa lunghezza d'onda, che danno un segnale rosso o verde.



DNA Microarray o DNA chip

Il rosso si utilizza per esempio per le cellule tumorali e il verde per le normali.

Sulla griglia di supporto ci sono le sonde con la sequenza genica nota. Ad ibridazione avvenuta si vanno a leggere i risultati.

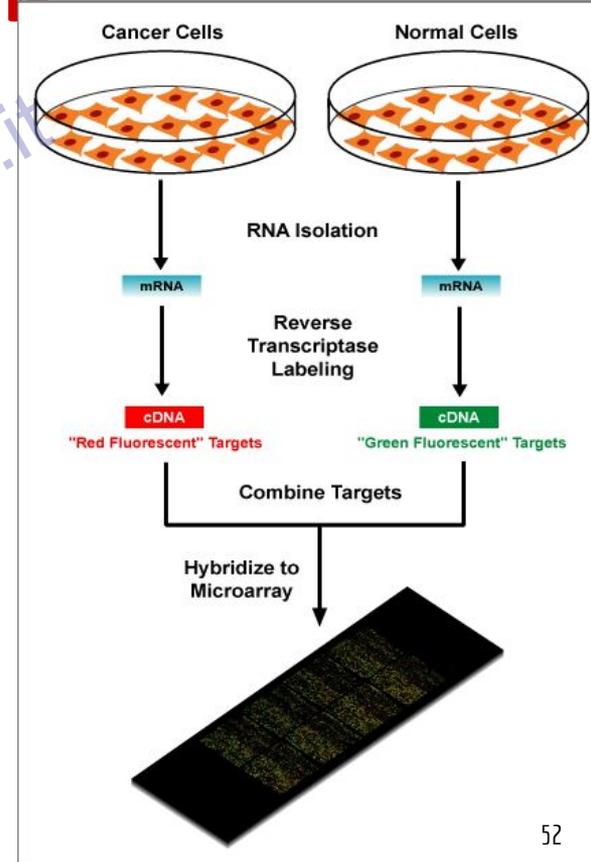


DNA Microarray o DNA chip

Il rosso indica l'espressione di un gene solo nella cellula tumorale.

Il verde l'espressione solo nella cellula normale.

Il giallo l'espressione in entrambe le cellule (perché si è verificata la sovrapposizione tra rosso e verde)



DNA Microarray o DNA chip

Concludiamo con un altro video che, anche se in inglese, è molto chiaro e descrive una metodica eseguita su piante infette o non infette da un virus specifico.

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



Photo credits

1 e 2 Immagini di proprietà dello studio associato R&D

3 Immagine del video

4 By UPODMG 1213 Imorgue (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons

5 By Ryan Jeffs - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21469151>

6 By No machine-readable author provided. Cohesion assumed (based on copyright claims). - No machine-readable source provided. Own work assumed (based on copyright claims)., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=585574>

7 By Kaksonen [Public domain], via Wikimedia Commons

8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 di proprietà dello studio associato R&D

14 Di Nessun autore leggibile automaticamente. Schutz presunto (secondo quanto affermano i diritti d'autore). - Nessuna fonte leggibile automaticamente. Presunta opera propria (secondo quanto affermano i diritti d'autore)., CC BY 2.5,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=694717>

Photo credits

15 By National Cancer Institute [Public domain], via Wikimedia Commons

16 By Fozs - Own work, CC BY-SA 4.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48384997>

17 By Squidonius (talk) - Own work (Original text: I (Squidonius (talk)) created this work entirely by myself.), Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39422948>

18 Di Paphrag di Wikipedia in inglese - Trasferito da en.wikipedia su Commons., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1612185>

19 Immagine estratta dal video linkato

20 By National Cancer Institute [Public domain], via Wikimedia Commons

21 By Paphrag at English Wikipedia (Transferred from en.wikipedia to Commons.) [Public domain], via Wikimedia Commons

22 Immagine estratta dal video linkato