

Metodi di Quantificazione dell'Espressione Genica I



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dr. Roberto Mattioli

e-mail: roberto.mattioli@uniroma1.it



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Cosa significa “quantificazione dell’espressione genica?”

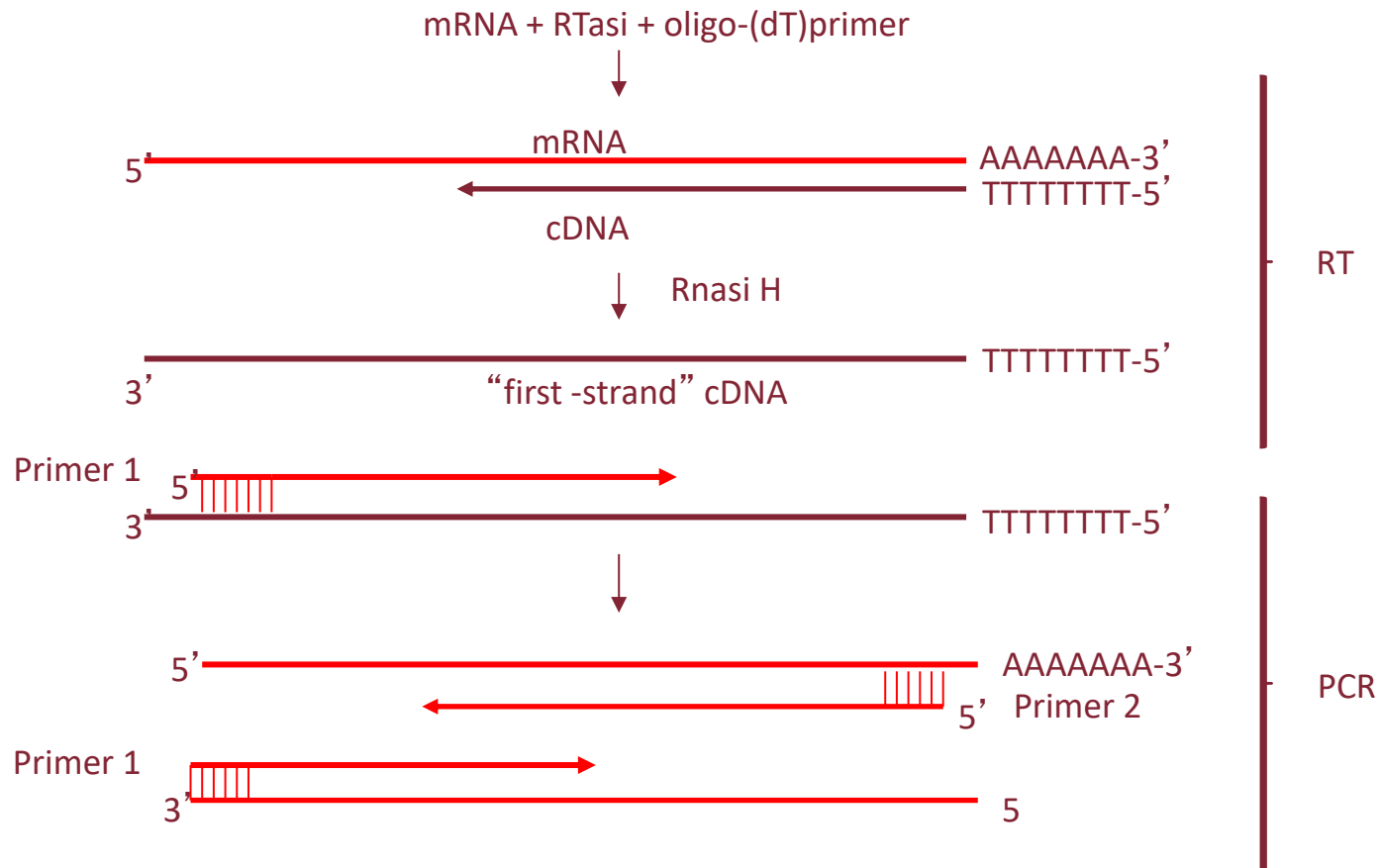


Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica

- RT PCR
- qRT PCR (Real Time)
- Northern Blot
- Western Blot

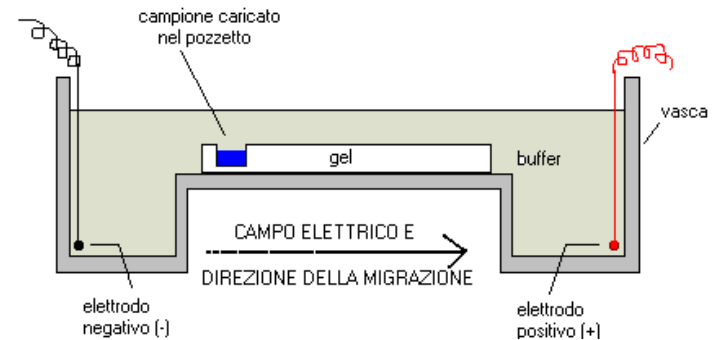


Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: RT PCR

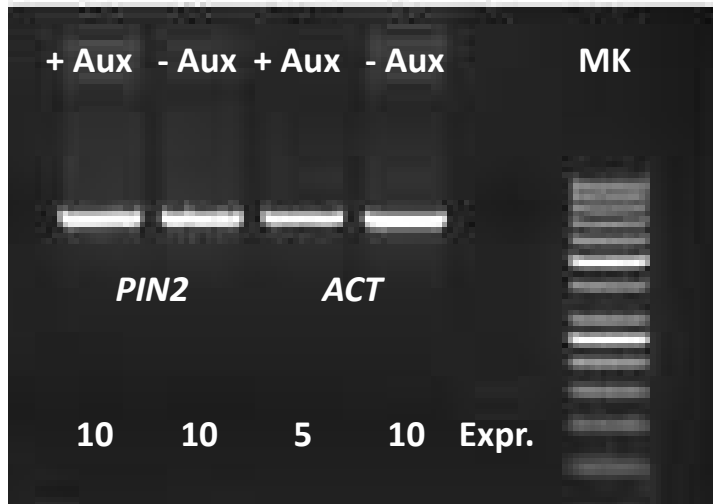


Quantificazione dei risultati della RT PCR

Si prepara un gel di agarosio ad una data percentuale (1-2%) con 0,4 µg/ml di Etidio Bromuro, si sviluppano le immagini del gel e si analizzano i risultati



risultati:



$$10/5 = 2$$

$$10/10 = 1$$

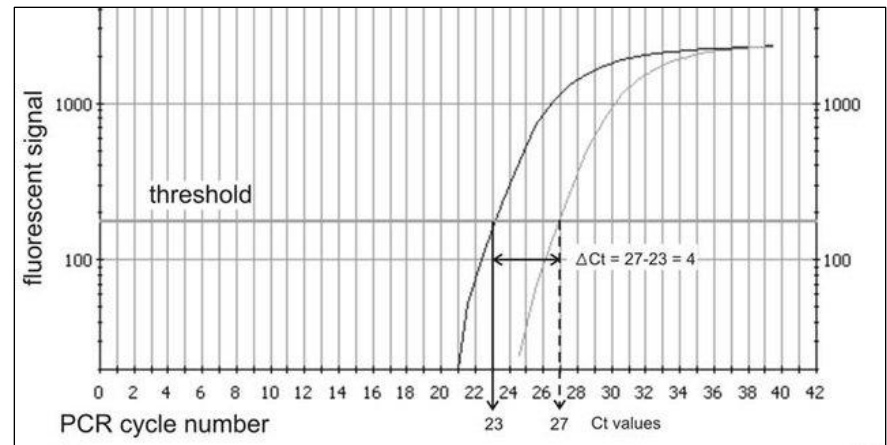


Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: PCR semiquantitativa

Una delle cause della inattendibilità della RT-PCR, a livello quantitativo è la difficoltà di stimare esattamente l'intensità di segnale di prodotti di amplificazione che vanno a saturazione.

La saturazione della reazione di PCR dipende , tra l'altro, dalla:

- Inattivazione della *Taq* polimerasi
- Deplezione dei NTP
- Deplezione dei primers
- Inibizione da parte del pirofosfato
- Auto appaiamento di DNA amplificati



Una semplice variante della PCR, nota come PCR semiquantitativa risolve in parte questo problema. Poiché è noto che i primi cicli di amplificazione seguono un andamento ragionevolmente esponenziale, nella PCR semiquantitativa si esegue una reazione di pochi cicli, e poi si risolvono i prodotti di amplificazione su gel di agarosio e di visualizzare il risultato mediante Southern blotting e ibridazione con una sonda radioattiva.



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: PCR competitiva

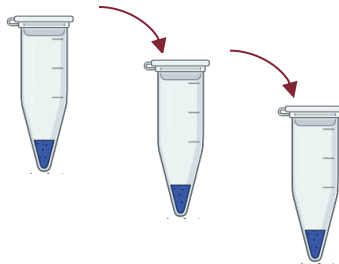
Anche se la PCR semi-quantitativa riesce a dare stime ragionevoli dei livelli di espressione relativi, recuperando, in parte il rapporto tra quantità di messaggero e livello di amplificazione, i suoi risultati sono comunque molto approssimati e non può risalire in alcun modo alla concentrazione esatta dei trascritti.

La PCR competitiva affronta il problema in modo indiretto: non potendo conoscere la concentrazione esatta del trascritto in esame si preoccupa di compararlo con quella di un mRNA o di un DNA a concentrazione nota.

In questa tecnica vengono usati due DNA, amplificabili con una stessa coppia di primers, ma risultanti in amplificati di dimensioni diverse. Un DNA, il competitore, è di concentrazione nota. Vengono allestite una serie di reazioni parallele in cui il cDNA incognito viene mantenuto costante, mentre il competitore viene aliquotato in diluizioni seriali.

Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: PCR competitiva

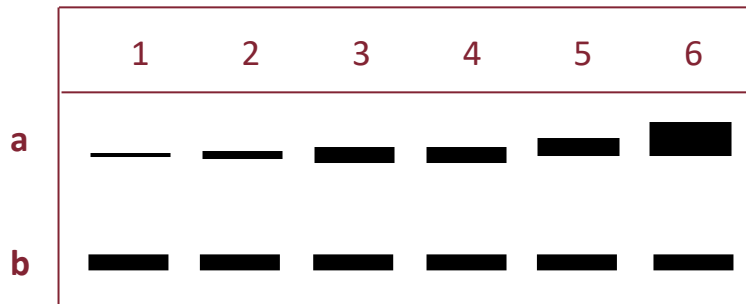
1 Diluizioni seriali di una quantità nota di competitore



2 Effettuare la PCR con la stessa coppia di primers



3



Cercare il segnale approssimativamente uguale

Analizzare su gel. La coppia con quantità di amplificati approssimativamente uguali indica che il cDNA target e il DNA competitore, in competizione per gli stessi primers, all'inizio dell'amplificazione erano presenti in quantità uguali. Poiché la concentrazione del DNA competitore è nota, si può risalire alla concentrazione del cDNA incognito



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: qRT-PCR/real time PCR

La PCR in tempo reale è una implementazione della PCR che permette di avere informazioni quantitative più precise sulle concentrazioni relative di cDNA amplificati e dei loro mRNA corrispondenti.

La quantificazione può essere assoluta o relativa.

Nel caso della quantificazione assoluta si fa ricorso alla costruzione di una curva di calibrazione standard di RNA a concentrazione nota, da cui si può estrapolare la concentrazione ignota e quindi il numero di copie iniziali del nostro campione.

La quantificazione relativa compara, con vari metodi, le concentrazioni relative di due campioni normalizzati ad un gene di riferimento.



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: qRT-PCR/real time PCR

L'accuratezza della qRT-PCR deriva dalla sua capacità di monitorare i prodotti di reazione in tempo reale, che gli permette di ottenere informazioni sulla fase logaritmica della reazione di PCR

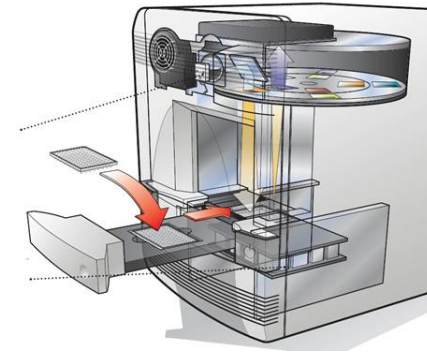
Infatti, a differenza della PCR classica che ha bisogno di un post-trattamento, tipicamente un gel di agarosio con bromuro di etidio, per visualizzare i risultati dopo un certo numero di cicli alla fine della reazione, la PCR in tempo reale è in grado di identificare, "al suo primo apparire", un prodotto di PCR, monitorando di continuo l'andamento della reazione, senza dover interrompere la reazione per poterla visualizzare su gel.

La real time PCR risolve questo problema utilizzando precursori fluorescenti, come il bromuro di etidio o il SYBR Green, che vengono incorporati nel prodotto in formazione o che si intercalano nella doppia elica, man mano che si forma. In ogni caso sarà possibile monitorare in tempo reale la formazione del prodotto di amplificazione seguendone l'assorbimento con un sistema spettrofotometrico, in un sistema automatizzato che provvede anche alla routine della PCR.

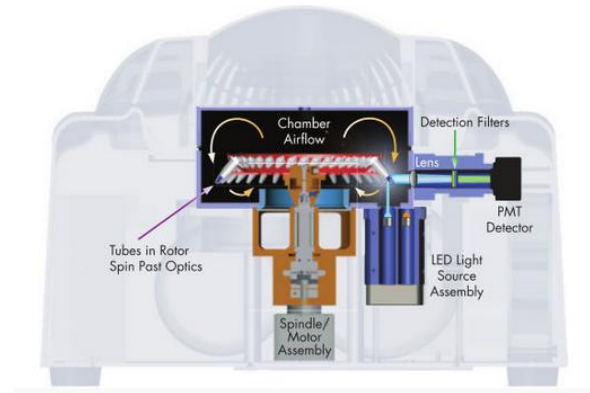
In questo modo la qRT-PCR riesce a misurare le curve di accumulo durante tutte le fasi della reazione

Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: qRT-PCR/real time PCR

Letture a piastra

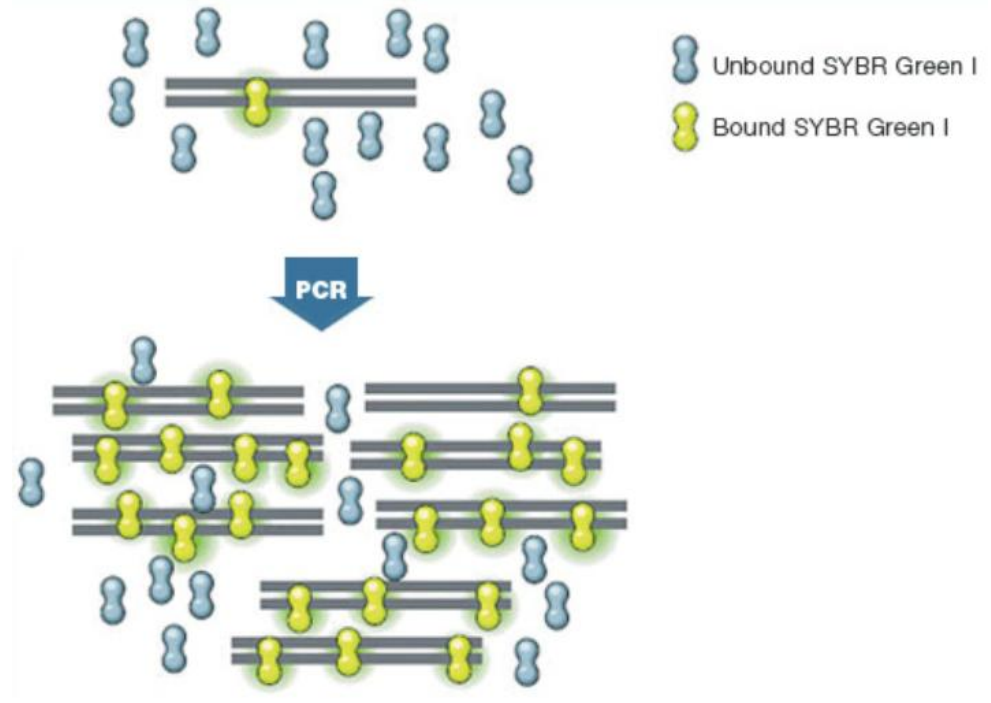
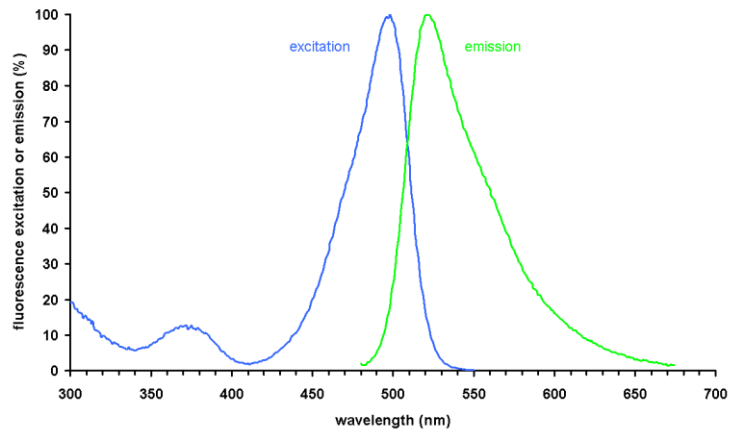
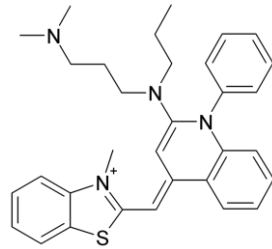


Rotor gene



Metodi di rilevamento di un segnale da qRT-PCR/real time PCR: il metodo Sybr-green

Il Sybr-green è una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento

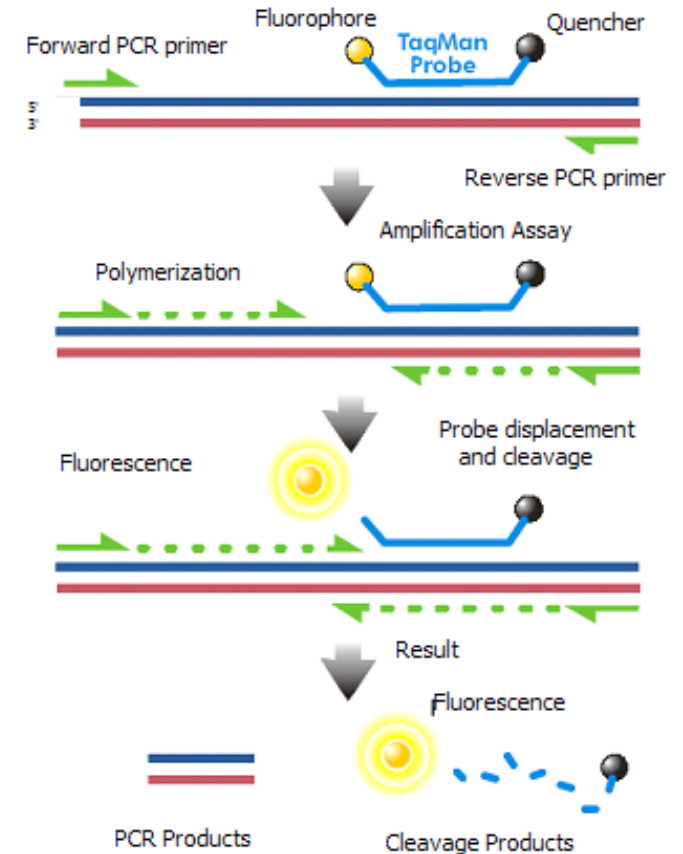




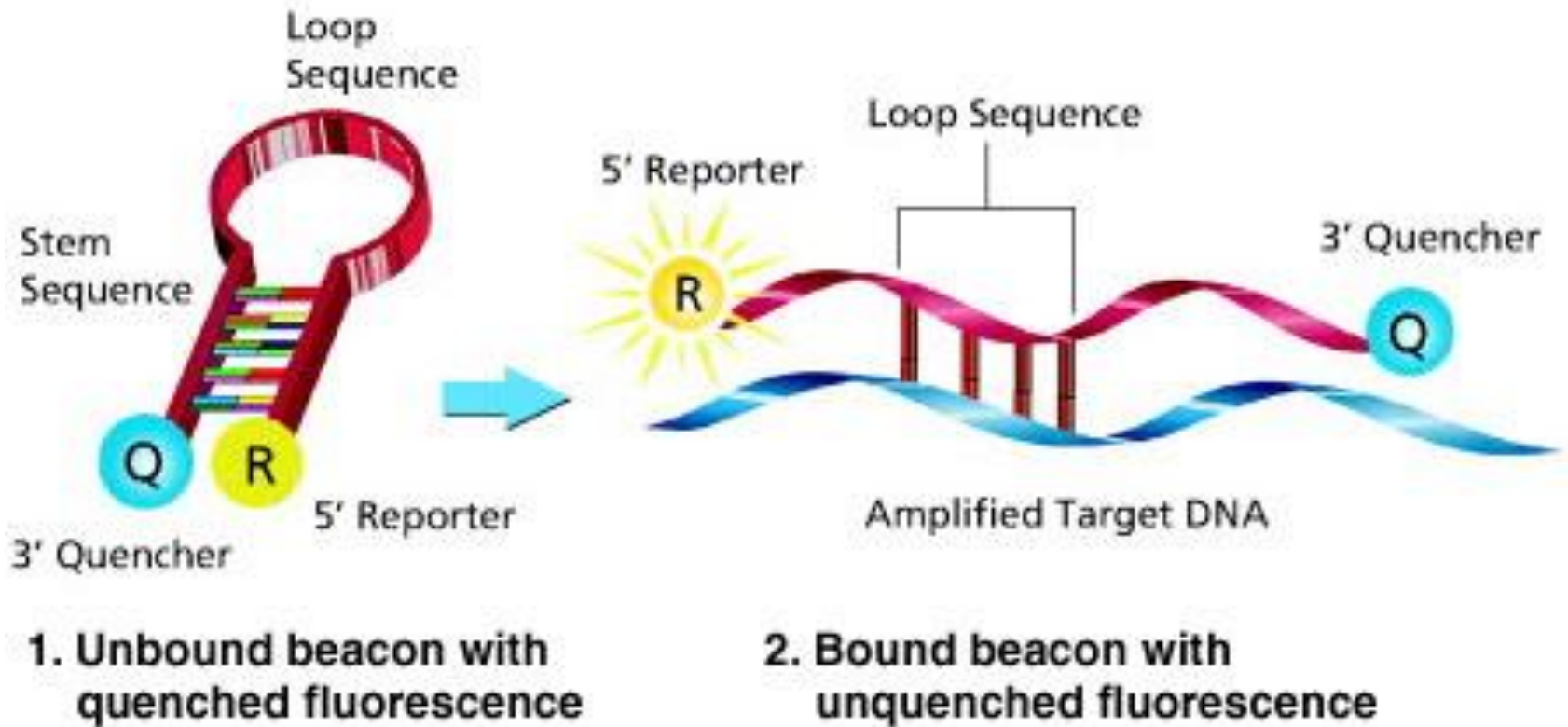
Metodi di rilevamento di un segnale da qRT-PCR/real time PCR: il metodo Taq-man

TaqMan è il nome di una serie di sonde utilizzate per aumentare la specificità della real time PCR. Il metodo, descritto per la prima volta nel 1991, si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide marcato con un fluoroforo a una estremità mentre nell'altra estremità è presente un *quencher*. Sfruttando l'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi, dopo la normale fase di *annealing* della PCR, l'enzima esplica la propria attività esonucleasica scindendo il fluoroforo dal resto della molecola durante l'ibridazione. Pertanto, ad ogni ciclo, dopo irradiazione del campione viene emessa una fluorescenza in quantità proporzionale al DNA target che diviene così facilmente quantificabile. Quando invece il fluoroforo si trova vicino al quencher quest'ultimo ne smorza l'emissione di fluorescenza tramite trasferimento di energia per risonanza.

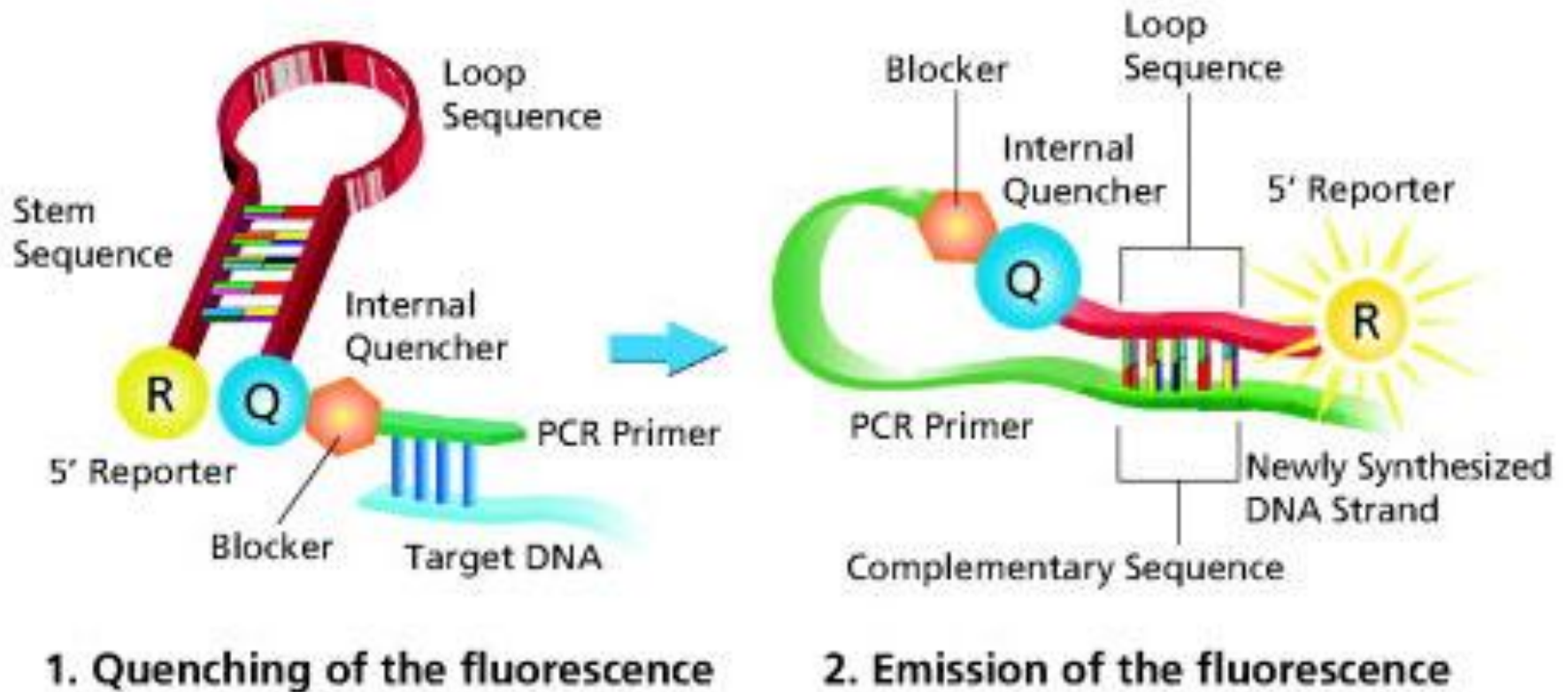
Il nome TaqMan deriva dal videogioco Pac-Man (Taq polimerasi + PacMan = TaqMan) richiamandone il principio di funzionamento. La tecnica trova comunemente utilizzo in biologia molecolare e nella diagnostica di laboratorio di diverse malattie infettive



Metodi di rilevamento di un segnale da qRT-PCR/real time PCR: il metodo Molecular Beacon



Metodi di rilevamento di un segnale da qRT-PCR/real time PCR: il metodo Molecular Scorpion





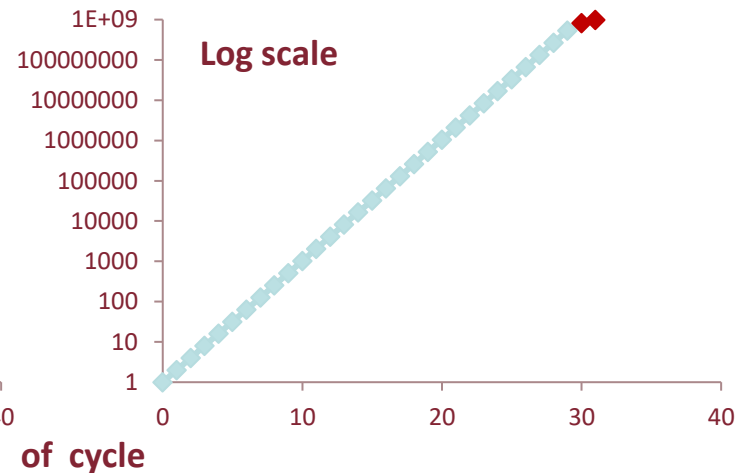
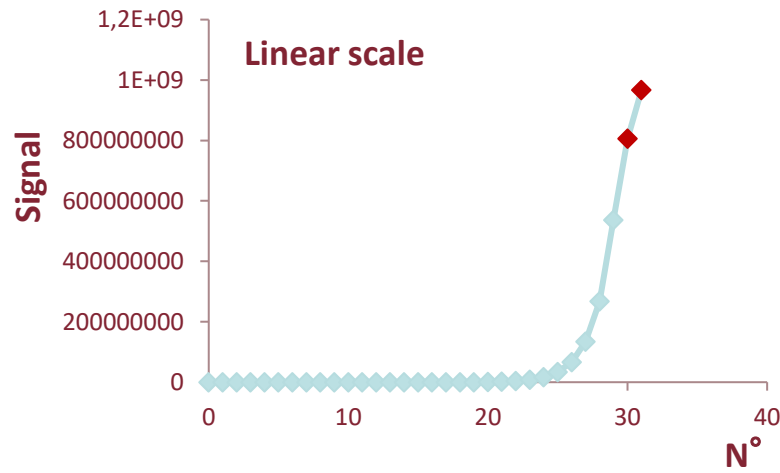
Significato della qRT-PCR/real time PCR

Esistono due modi di visualizzare i risultati di una qRT-PCR/real time PCR su un grafico:

1. Scala lineare
2. Scala Log

Dato l'andamento esponenziale della reazione, è impossibile visualizzare dettagli dell'amplificazione durante i primi cicli su una scala lineare; si passa dunque alla visualizzazione in scala logaritmica

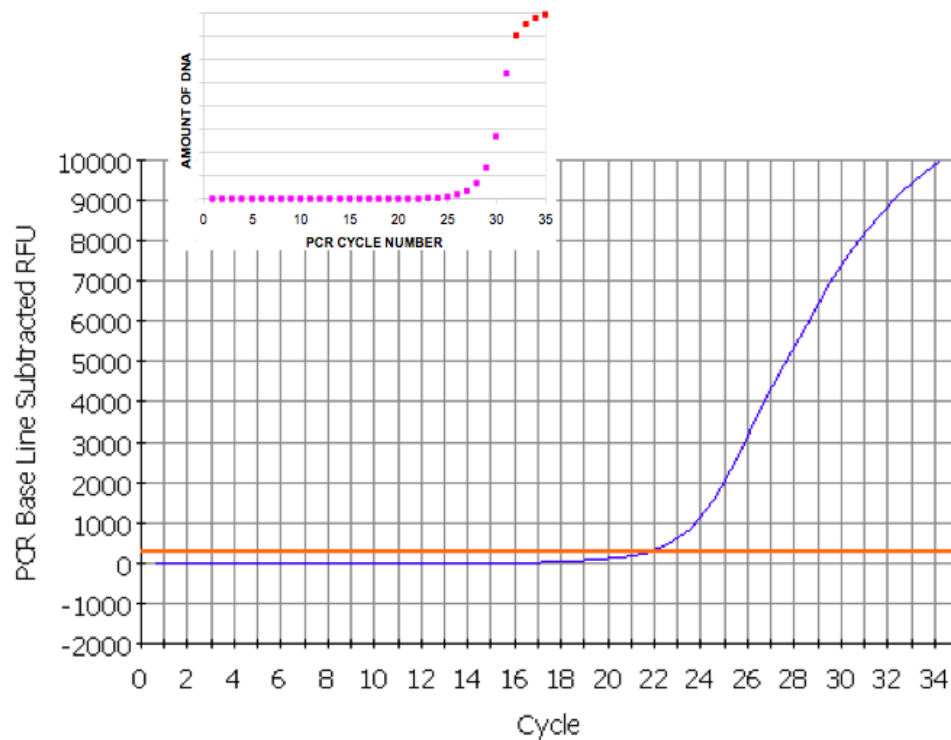
N° of cycle	N° of molecules
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
11	2048
12	4096
13	8192
14	16384
15	32768
16	65536
17	131072
18	262144
19	524288
20	1048576
21	2097152
22	4194304
23	8388608
24	16777216
25	33554432
26	67108864
27	134217728
28	268435456
29	536870912
30	805306368
31	966367641,6





Significato della qRT-PCR/real time PCR

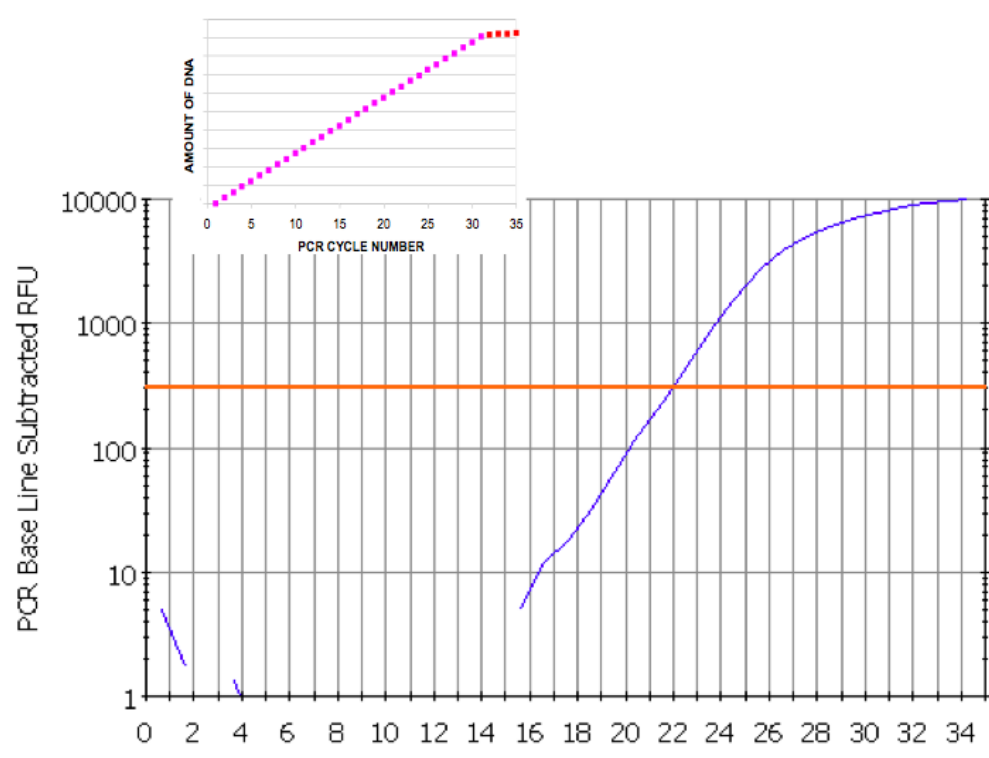
La qRT-PCR invece di misurare l'accumulo dei prodotti di reazione dopo n cicli, misura i cicli necessari per raggiungere una soglia arbitraria di fluorescenza detta Ct (concentration threshold). Naturalmente il valore di Ct, in questo caso 22, dovrà cadere nella regione esponenziale della curva





Significato della qRT-PCR/real time PCR

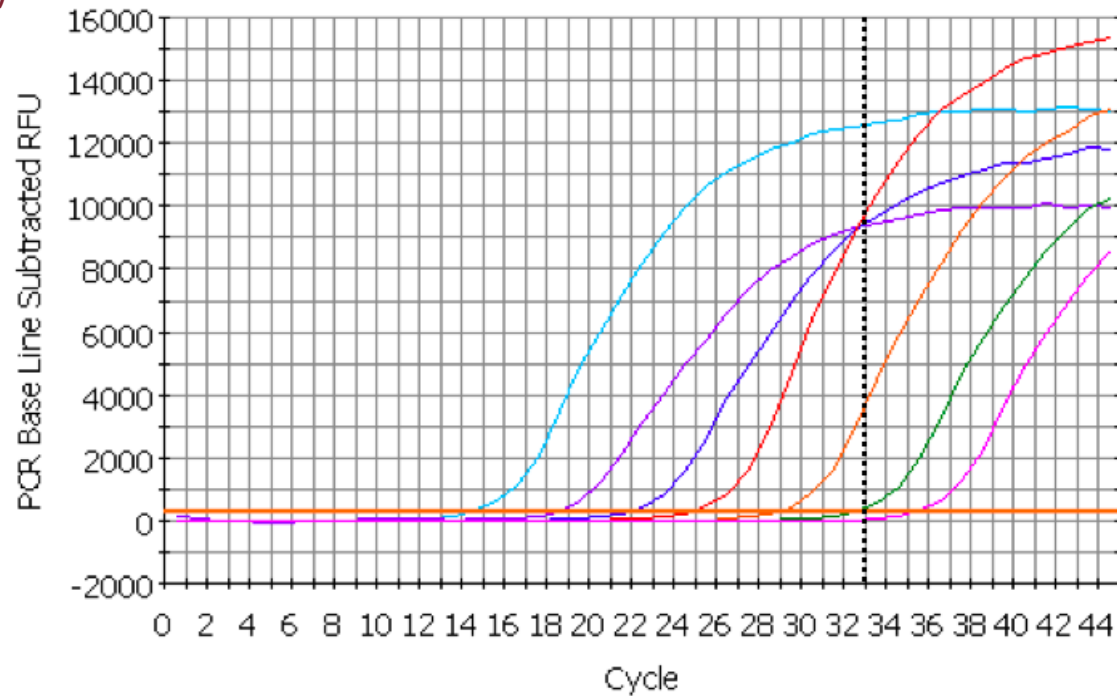
Trasformando il grafico in scala logaritmica, appare più evidente come il valore di Ct va a cadere nella parte esponenziale della curva logaritmica, assicurando elevata accuratezza a questo tipo di analisi





Significato della qRT-PCR/real time PCR

Un'importante proprietà della qRT-PCR è che i valori di C_t sono inversamente proporzionali alla concentrazioni iniziali dei DNA target, come si può verificare facendo diluizioni seriali di un campione e osservando come, man mano che le diluizioni crescono, ci vogliono più cicli per raggiungere la soglia di concentrazione (C_t)

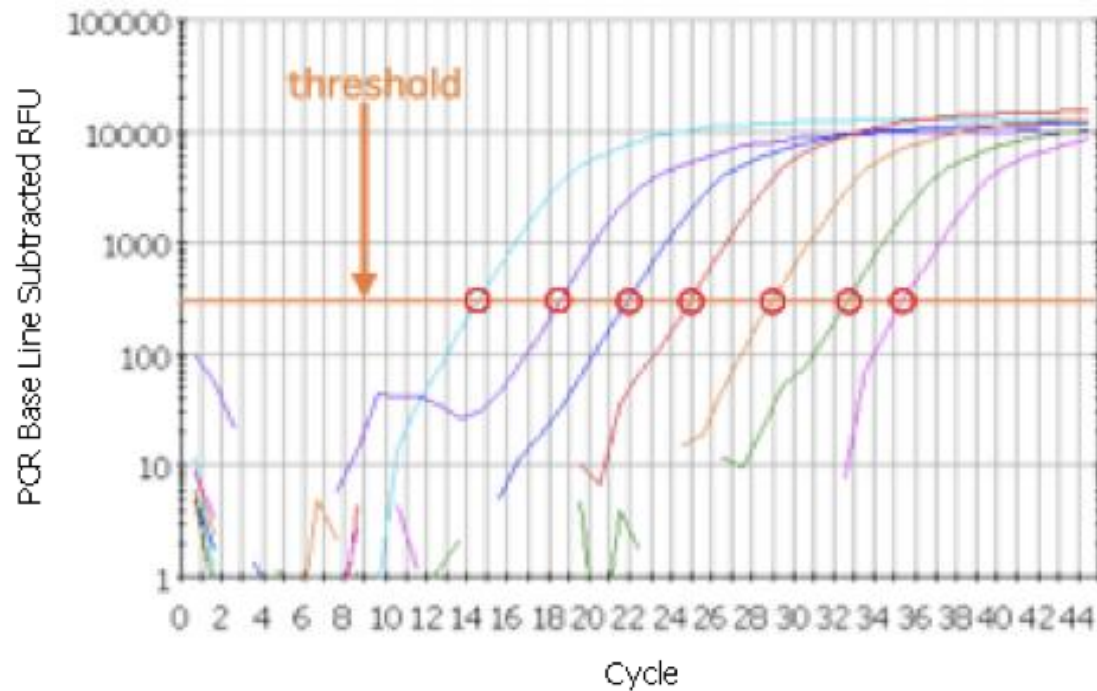


Nella figura un esempio di diluizioni seriali (10 volte)



Significato della qRT-PCR/real time PCR

Passando in scala logaritmica, come al solito è più evidente la correlazione tra i Ct e le diluizioni (notare che a Ct più elevati la correlazione è perduta)



Nella figura un esempio di diluizioni seriali (10 volte)



Trattazione matematico-quantitativa della qRT-PCR/real time PCR

Per l'equazione generale della PCR avremo alla concentrazione di threshold (Ct)

$$N_f = N_i (1+\eta)^{ct}$$

Dove N_f è il numero di copie finali, N_i il numero di copie iniziali, η l'efficienza di amplificazione

Le concentrazioni di a e b al punto di threshold saranno:

$$N_{fa} = N_{ia} (1+\eta_a)^{cta}$$

$$N_{fb} = N_{ib} (1+\eta_b)^{ctb}$$

e poichè, per definizione, $N_{fa} = N_{fb}$ abbiamo: $N_{ia} (1+\eta_a)^{cta} = N_{ib} (1+\eta_b)^{ctb}$

$$\frac{N_{ia}}{N_{ib}} = \frac{(1+\eta_b)^{ctb}}{(1+\eta_a)^{cta}} \quad \text{equivalente a:} \quad \text{Log } N_{ia} - \text{Log } N_{ib} = \text{Log } (1+\eta_b)^{ctb} - \text{Log } (1+\eta_a)^{cta}$$

Assumendo $\eta_a = \eta_b$; $1+\eta = E$ avremo:

$$\text{Log } N_{ia} - \text{Log } N_{ib} = \text{Log } (E)^{(ctb - cta)}$$

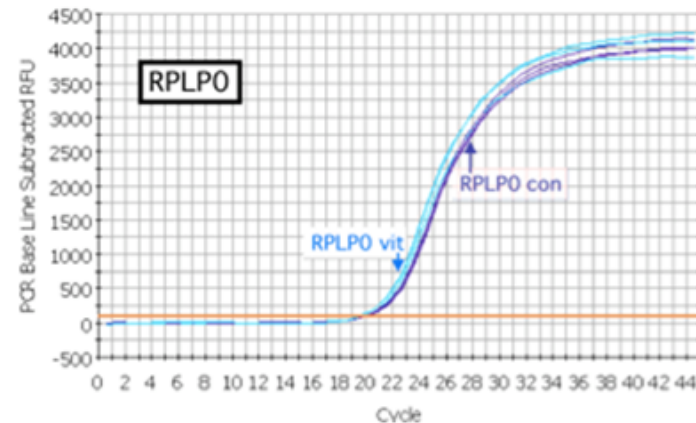
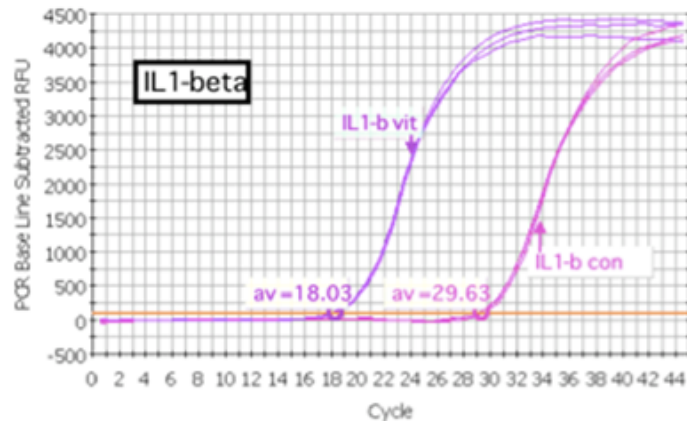
$$ct_b - ct_a = \Delta ct$$



Trattazione matematico-quantitativa della qRT-PCR/real time PCR

Se vogliamo conoscere per esempio, la variazione di espressione del gene interleuchina β in seguito a un certo trattamento, ci calcoliamo la Δct del campione in esame;
 $ct_2 - ct_1 = 29.63 - 18.03 = 11.60$. Senza considerare l'efficienza di amplificazione il trattamento ha indotto il nostro gene:

$$\Delta ct = 2^{ct_2 - ct_1} = 2^{29.63 - 18.03} = 2^{11.60} = 3104 \text{ volte}$$



Dobbiamo però considerare l'espressione del gene housekeeping di controllo per correggere $ct_2 - ct_1 = 19.93 - 19.80 = 0.13$

Il $\Delta \Delta ct$ è quindi uguale a: $\Delta \Delta ct = 2^{\Delta ct_{target} - \Delta ct_{controllo}} = 2^{11.60 - 0.13} = 2^{11.47} = 2836 \text{ volte}$

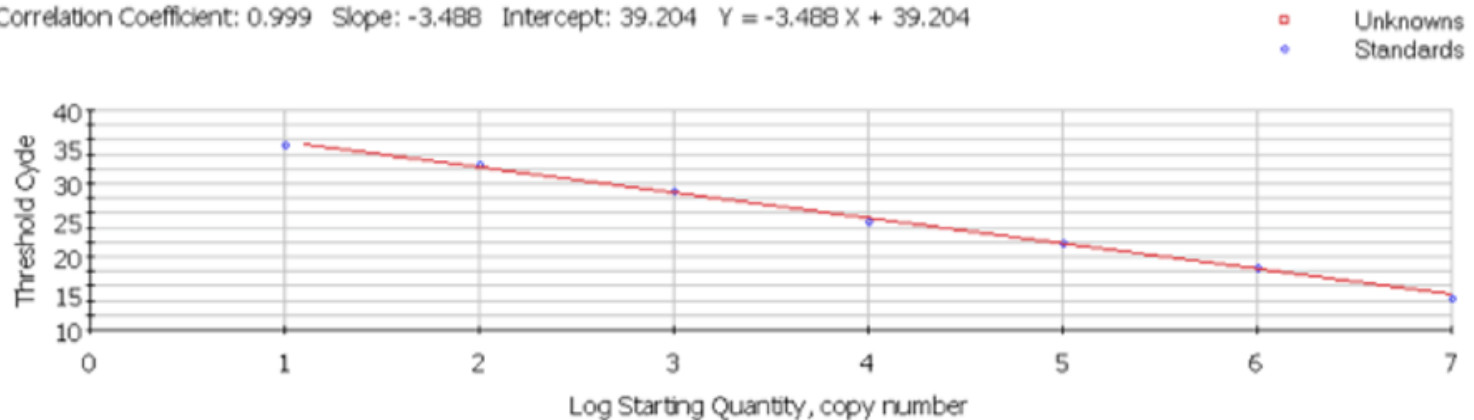


Trattazione matematico-quantitativa della qRT-PCR/real time PCR

Finora abbiamo volutamente trascurato l'efficienza di amplificazione (che dipende principalmente dai primers e, in misura minore da parametri sperimentali che possono variare da reazione a reazione), che può in alcuni casi essere molto meno efficiente del 100%. A causa della diversa efficienza di amplificazione non è di solito possibile paragonare campioni amplificati con primers diversi con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ (a meno che non abbiano la stessa efficienza)

Graficando in ordinata i C_t e in ascissa il log delle concentrazioni, tutti i punti cadono lungo una retta con un alto valore di correlazione. E' quindi possibile costruire una curva di taratura da cui estrapolare l'efficienza di amplificazione

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$





Trattazione matematico-quantitativa della qRT-PCR/real time PCR

Calcolo dell'efficienza di reazione

Per l'equazione generale della PCR avremo al punto Ct:

$$N_f = N_i (1+\eta)^{ct}$$

Trasformando in Log:

$$\text{Log } N_f = \text{Log } N_i + ct \text{ Log } (1+\eta)$$

e risolvendo per ct:

$$ct = (1/\text{Log } (1+\eta)) \text{ Log } N_f - \text{Log } N_i / \text{Log } (1+\eta)$$

otteniamo l'equazione di una retta

dove: $ct = y$

$$1/\text{Log } (1+\eta) = m$$

$$\text{Log } N_f = x$$

$$\text{Log } N_i / \text{Log } (1+\eta) = q$$

da cui possiamo ricavare η come:

$$\eta = [10^{(-1/m)}] - 1$$



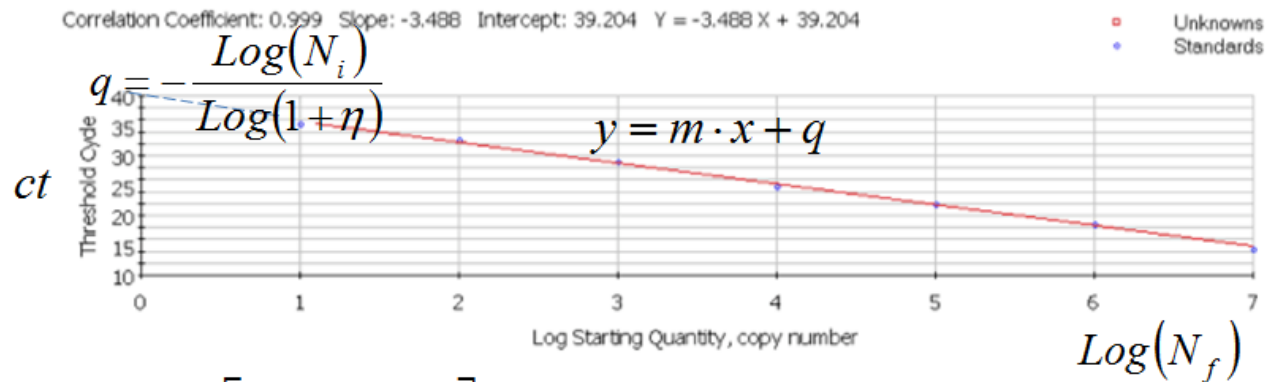
Trattazione matematico-quantitativa della qRT-PCR/real time PCR

Calcolo dell'efficienza di reazione

Includendo il termine di efficienza di reazione η , al punto Ct si avrà:

$$N_f = N_i \cdot (1 + \eta)^{ct} \Rightarrow ct = \left[\frac{1}{\text{Log}(1 + \eta)} \right] \text{Log}(N_f) - \left[\frac{\text{Log}(N_i)}{\text{Log}(1 + \eta)} \right]$$

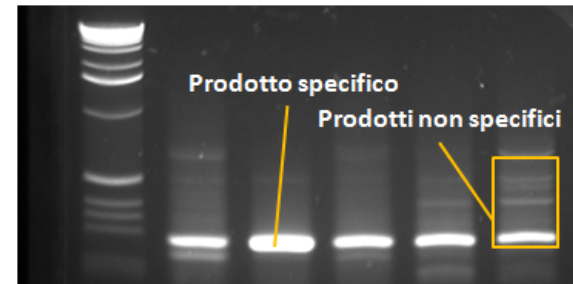
m q



$$m = \left[\frac{1}{\text{Log}(1 + \eta)} \right] \Rightarrow \boxed{\eta = 10^{-1/m} - 1}$$

qRT-PCR/real time PCR: un problema da tenere presente

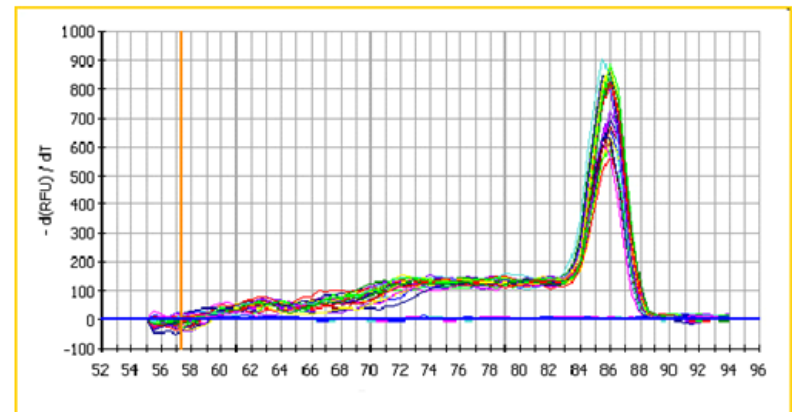
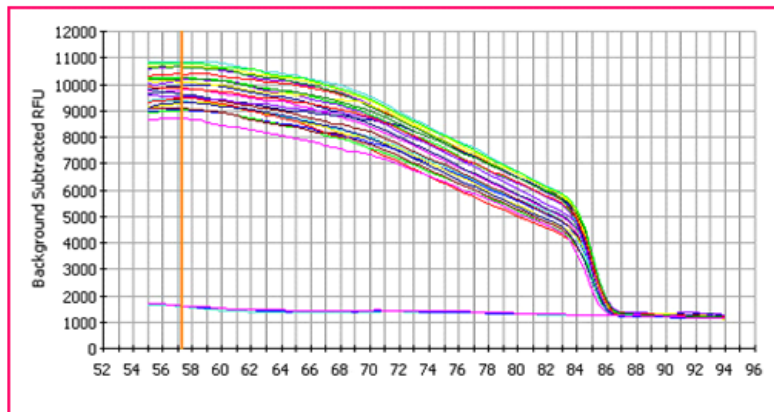
Su gel di agarosio eravamo in grado di distinguere, in base al peso molecolare, la presenza di uno o più prodotti non specifici



INVECE

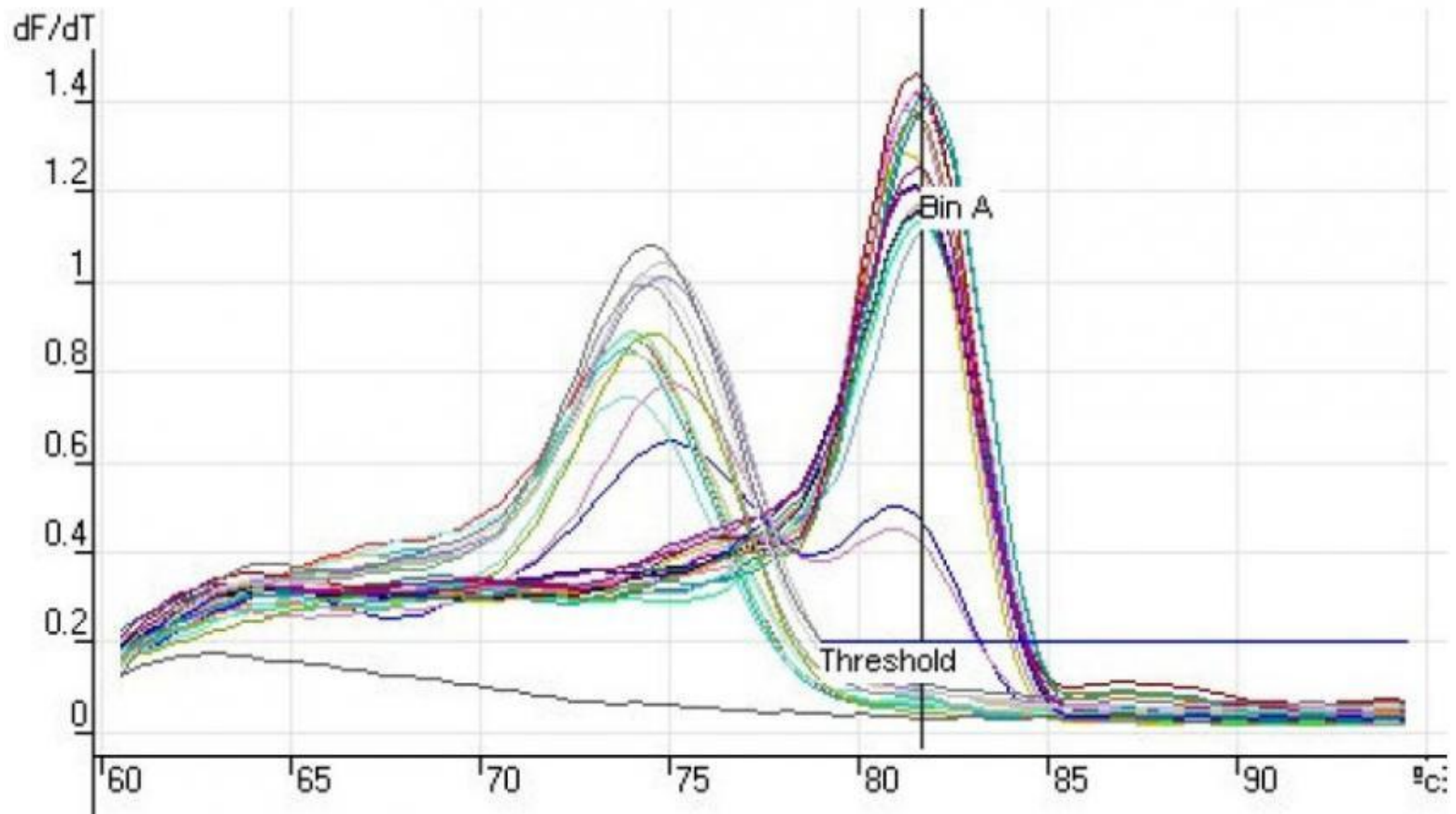
La macchina di Real Time misura l'intensità di fluorescenza riemessa dal pozzetto senza distinguere la provenienza del segnale

La curva di dissociazione risolve il problema





qRT-PCR/real time PCR: un problema da tenere presente

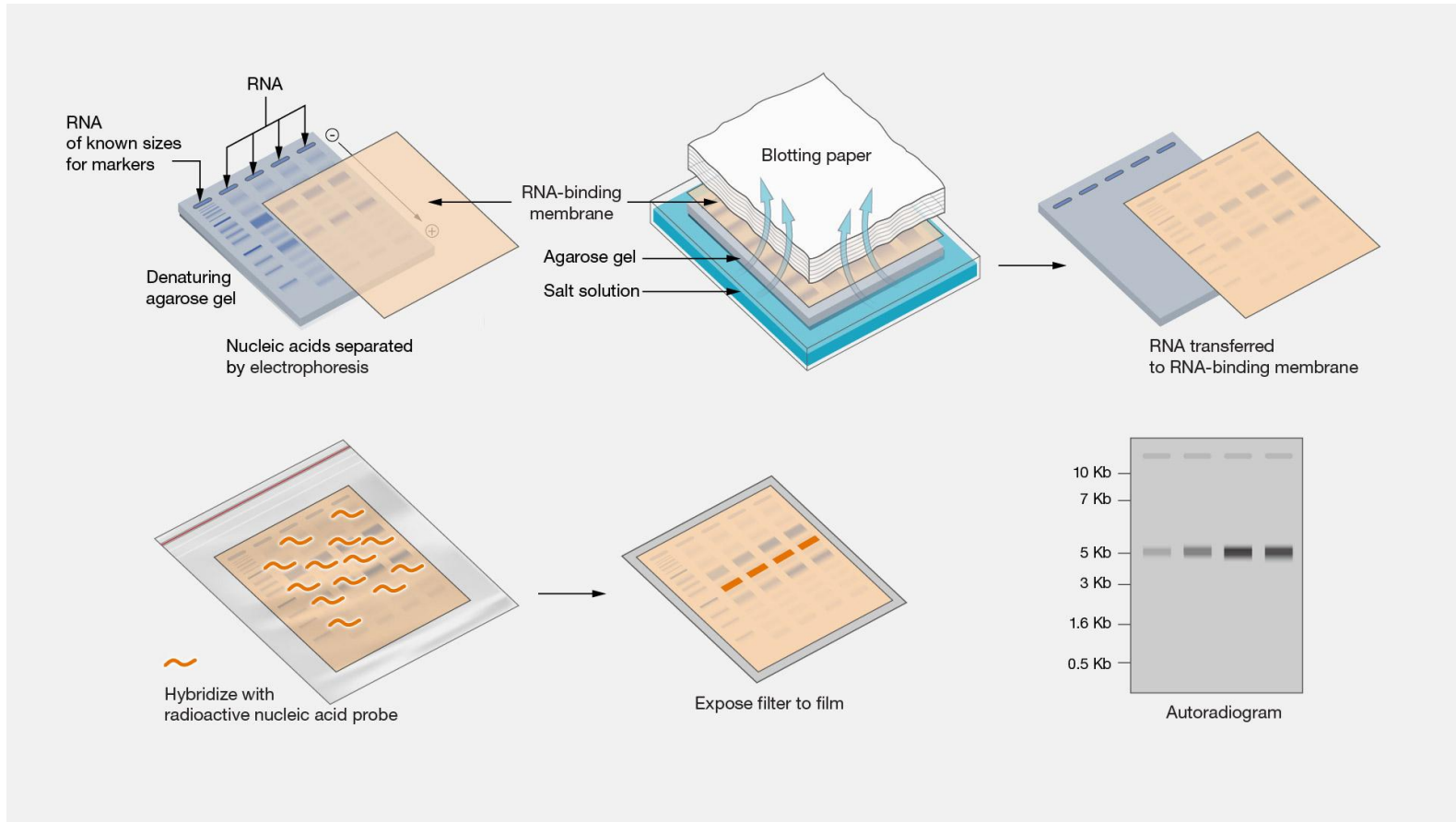




Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica

- RT PCR
- qRT PCR (Real Time)
- Northern Blot
- Western Blot

Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Northern blot

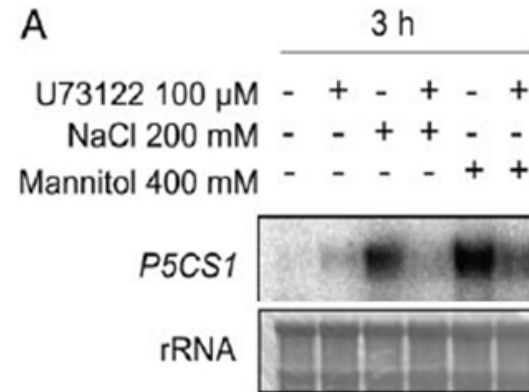




Esempio pratico dell'applicazione di un Northern blot

Analisi dell'espressione del gene *P5CS1* in risposta a stress salino in *Arabidopsis*

Il gene *P5CS1* (pirrolino 5 carbossilato sintetasi) sintetizza prolina a partire dall'acido glutammico. In pianta risponde a diversi tipi di stress tra cui quello idrico e salino. Nell'immagine di fianco un esperimento di northern blot evidenzia la sua capacità di rispondere, a livello trascrizionale, in seguito a trattamento salino. L'rRNA viene usato come normalizzatore.





Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

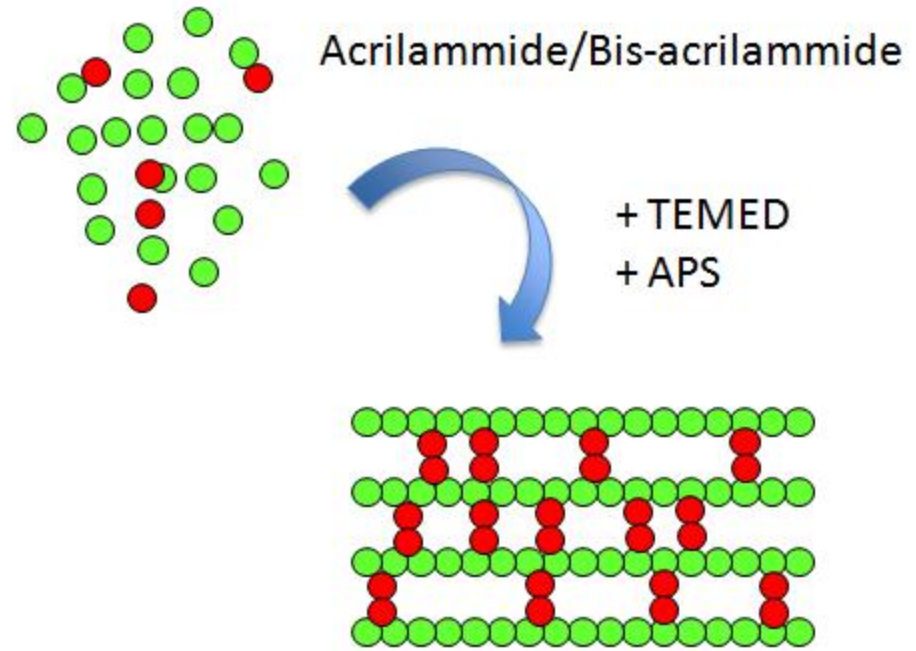
La tecnica del Western blot viene utilizzata per quantificare una o più proteine presenti all'interno di un campione biologico. Come per DNA ed RNA, prima di poter procedere, è necessario estrarre il materiale di interesse (proteine)

Non esiste un unico metodo per estrarre le proteine. Questo perchè ogni proteina ha caratteristiche diverse, come per esempio dimensioni, proprietà, carica netta. Bisogna quindi studiare un protocollo di estrazione in base al tipo di proteina che si vuole studiare. Di lato sono indicati alcuni tipici tamponi che possono essere utilizzati; a questi tamponi possono essere aggiunti additivi e inibitori delle proteasi (leupeptina, pepstatina, PMSF)

Buffer	pH range
Citric acid - NaOH	2.2 - 6.5
Sodium citrate - citric acid	3.0 - 6.2
Sodium acetate - acetic acid	3.6 - 5.6
Cacodylic acid sodium salt - HCl	5.0 - 7.4
MES - NaOH	5.6 - 6.8
Sodium dihydrogen phosphate - disodium hydrogen phosphate	5.8 - 8.0
Imidazole - HCl	6.2 - 7.8
MOPS - KOH	6.6 - 7.8
Triethanolamine hydrochloride - NaOH	6.8 - 8.8
Tris - HCl	7.0 - 9.0
HEPES - NaOH	7.2 - 8.2
Tricine - NaOH	7.6 - 8.6
Sodium tetraborate - boric acid	7.6 - 9.2
Bicine - NaOH	7.7 - 8.9
Glycine - NaOH	8.6 - 10.6

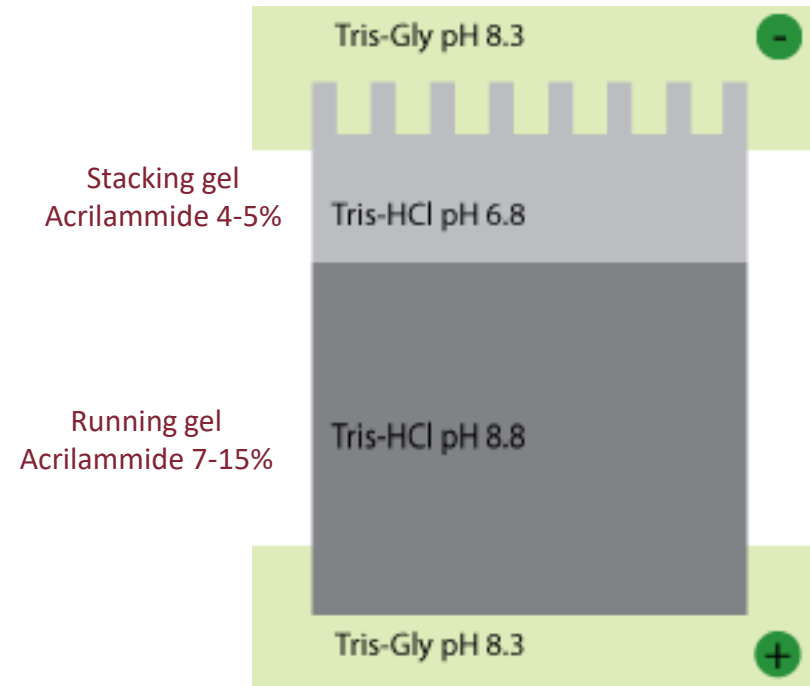
Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

Concettualmente non molto diversa dall'elettroforesi orizzontale, quella verticale si realizza a partire da una matrice di acrilammide e bis-acrilammide (29:1) – 6 - 15%. Affinché la soluzione polimerizzi, è necessario aggiungere il TEMED (tetrametiletilendiammina) che è il catalizzatore della reazione di polimerizzazione. Una volta aggiunto il TEMED si aggiunge APS (persolfato di ammonio) che innesca la reazione radicalica di polimerizzazione.



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

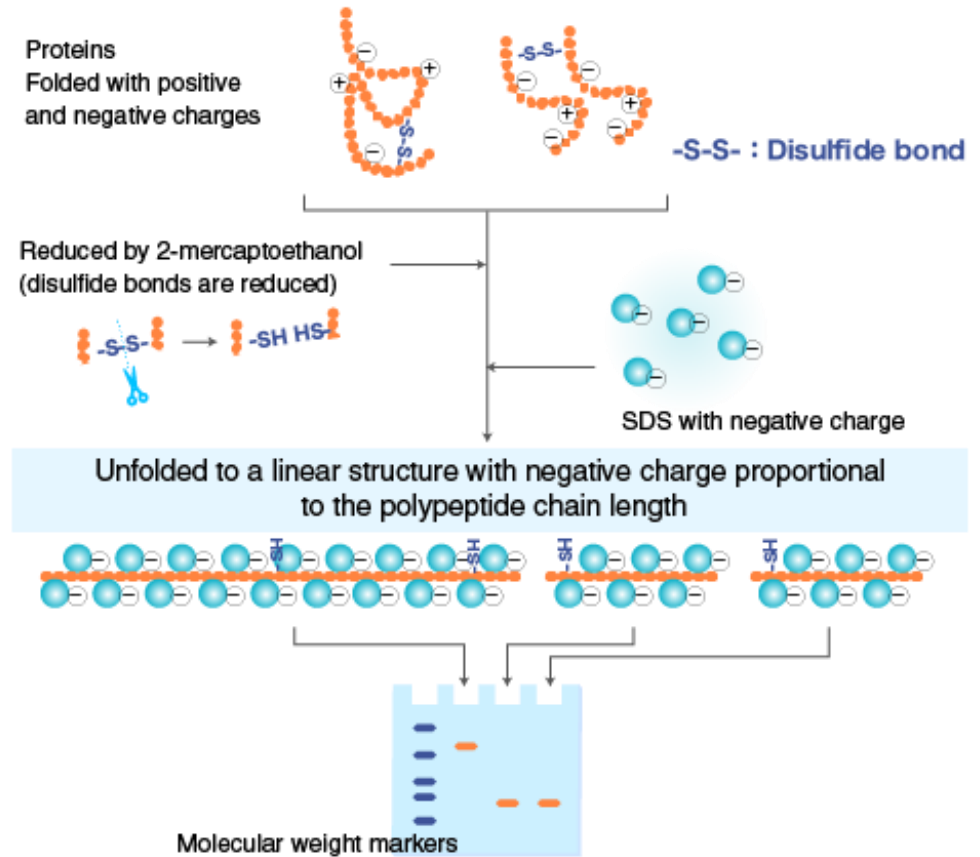
Il gel di poliacrilammide è composto da due parti: lo stacking gel (percentuale di acrilammide più bassa) e il running gel. Il primo, posto nella parte superiore, rappresenta la porzione di gel all'interno del quale vengono creati i pozzetti di caricamento; inoltre consente di "impaccare" tutto il materiale caricato in modo che arrivi uniformemente sul fronte di corsa. Il secondo invece è la porzione di gel dove avviene la vera e propria corsa elettroforetica che consente di separare il campione di interesse in base alle sue dimensioni



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

Preparazione del campione:

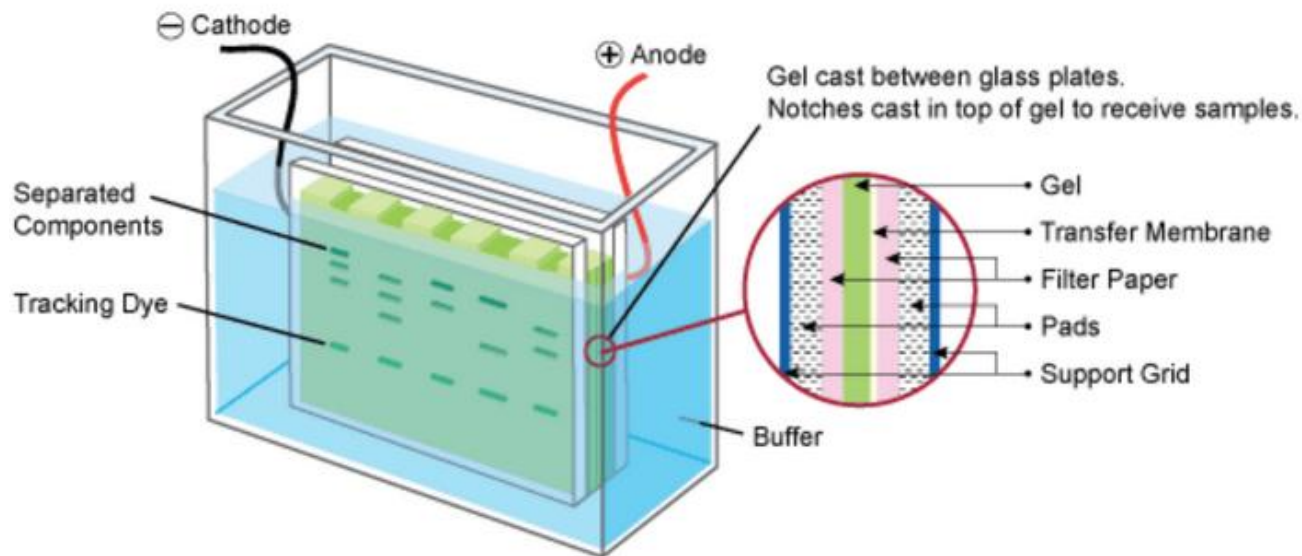
Prima del caricamento, i campioni di proteine vengono trattati con un agente riducente (β -mercapto-etanolo) che rompe i legami di solfuro ed SDS, un detergente anionico che scherma le proteine di cariche negative. In questo modo la corsa delle proteine avverrà solamente in funzione della loro taglia



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

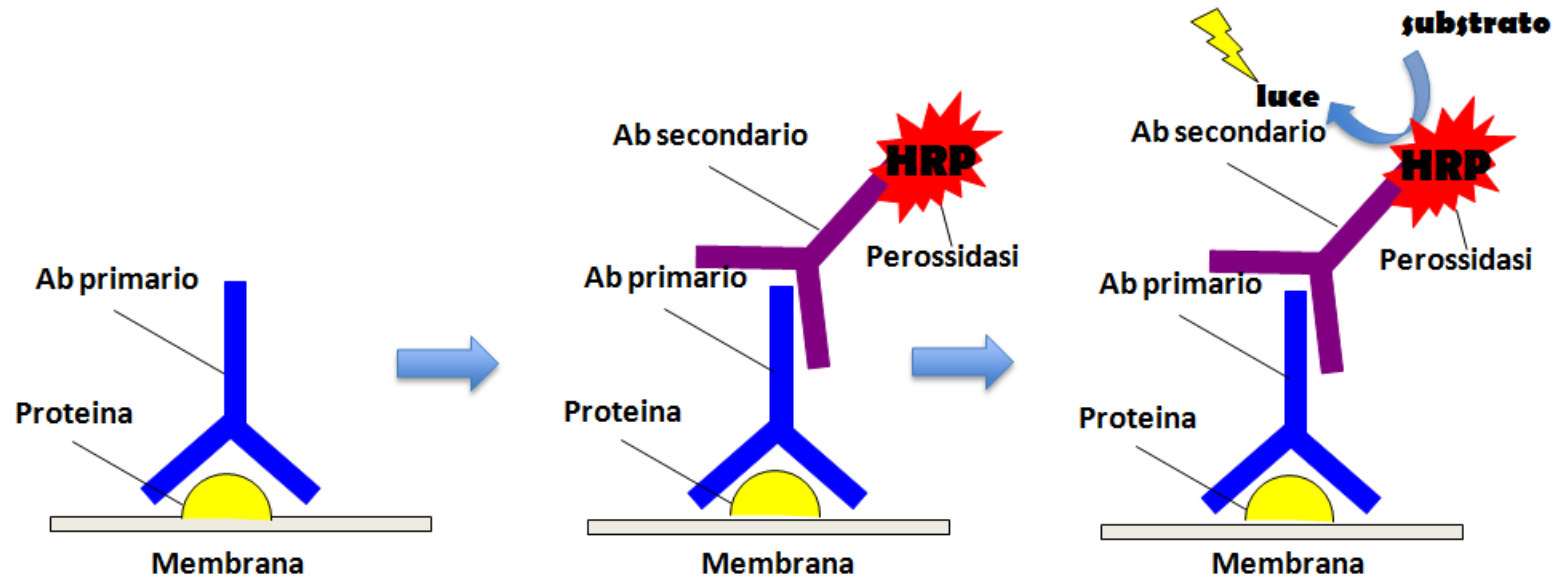
Con il termine Blotting ci si riferisce genericamente alle operazioni di trasferimento del/dei campioni dal gel ad una membrana di nylon o nitrocellulosa, che permetta le successive operazioni di ibridazione, lavaggio e rivelazione.

Electro blotting (Western)



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

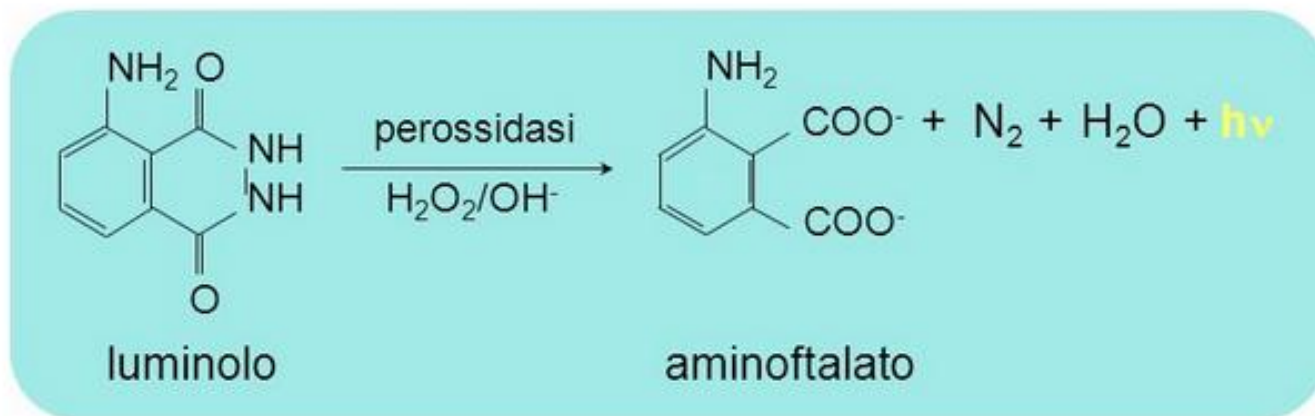
Nel Western Blot la sonda utilizzata non è un frammento di acido nucleico marcato ma anticorpi primari che riconoscono in maniera specifica la nostra proteina di interesse e anticorpi secondari che riconoscono gli anticorpi primari. Gli anticorpi secondari portano su di essi sistemi di rilevamento come ad esempio enzimi in grado di trasformare substrati in prodotti rilevabili (luce, particolari colorazioni). [Esempio dell'ECL]



Esempi di alcune tecniche per quantificare l'espressione genica: Western blot (quantificazione di proteine)

Nel Western Blot la sonda utilizzata non è un frammento di acido nucleico marcato ma anticorpi primari che riconoscono in maniera specifica la nostra proteina di interesse e anticorpi secondari che riconoscono gli anticorpi primari. Gli anticorpi secondari portano su di essi sistemi di rilevamento come ad esempio enzimi in grado di trasformare substrati in prodotti rilevabili (luce, particolari colorazioni). **[Esempio dell'ECL]**

Luminolo/ H_2O_2 /Perossidasi

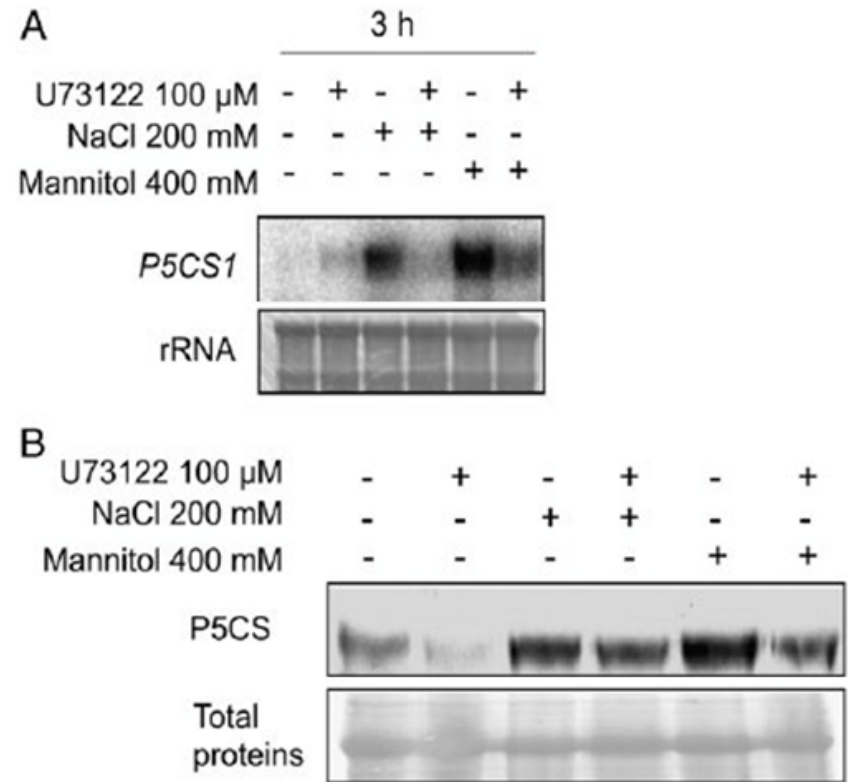




Esempio pratico dell'applicazione di un Western blot

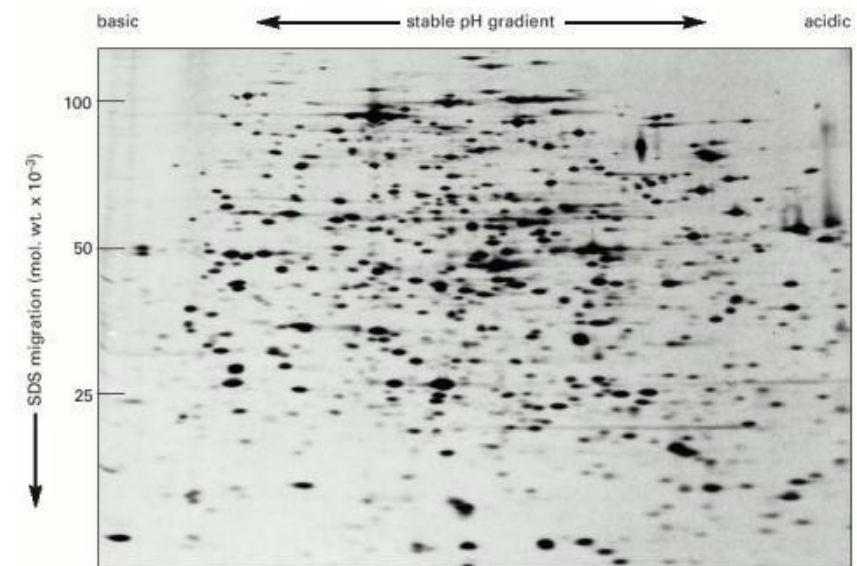
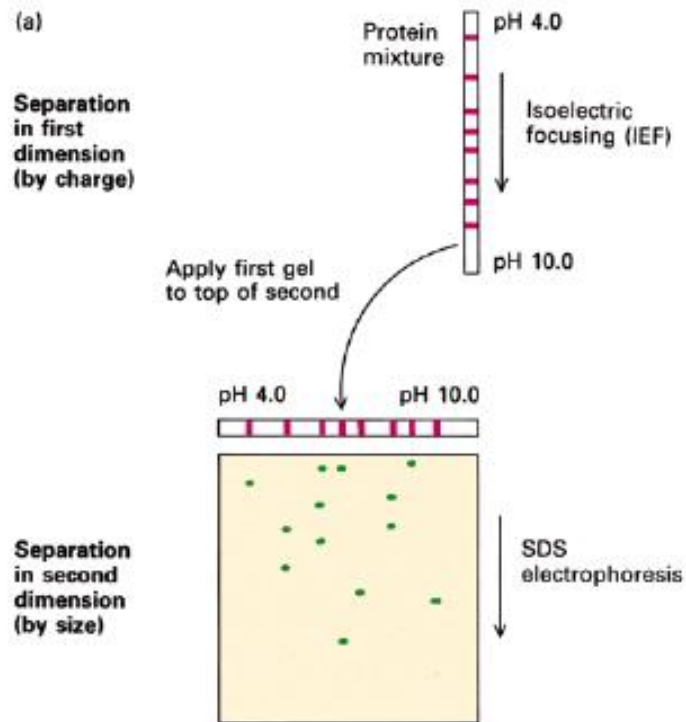
Analisi dell'espressione del gene P5CS1 in risposta a stress salino in Arabidopsis

Non necessariamente l'espressione di un gene, analizzato ad esempio tramite northern blot, riflette la quantità di proteina che verrà poi effettivamente prodotta. La tecnica del western blot permette di verificarlo. In figura A sono riportati i risultati tramite northern blot, in figura B quelli tramite western blot. In questo caso c'è concordanza tra i due esperimenti.



Western blot in due dimensioni: 2D-PAGE

Molto spesso le soluzioni di proteine caricate su un gel “monodimensionale” sono così complesse che si ricorre alla elettroforesi “bidimensionale”. L’elettroforesi bidimensionale sfrutta due diverse separazioni, in ordine sequenziale, dello stesso campione; la prima separa le proteine in base al loro punto isoelettrico, la seconda separa le proteine in base alle loro dimensioni





SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA