

Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

Sonda molecolare a DNA

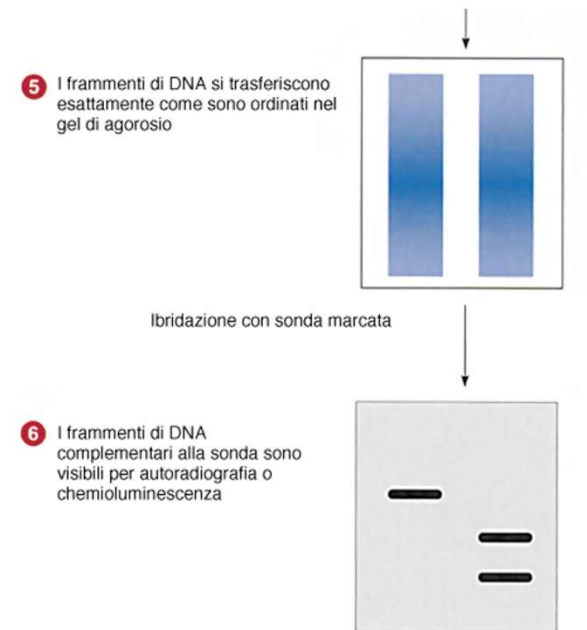
Sonde radioattive o "calde", marcate con **radioisotopi**, le più sensibili (picogrammo).

Le sonde **"fredde"** sono marcate con **biotina**, una vitamina idrosolubile (vitamina H) che si lega alle basi e con **digossigenina**, uno steroide vegetale che modifica chimicamente nucleotidi pirimidinici.

La biotina viene riconosciuta da una proteina batterica, la **streptavidina**, con la quale instaura un legame ad affinità talmente elevata da essere considerato uno dei più forti conosciuti in biologia.

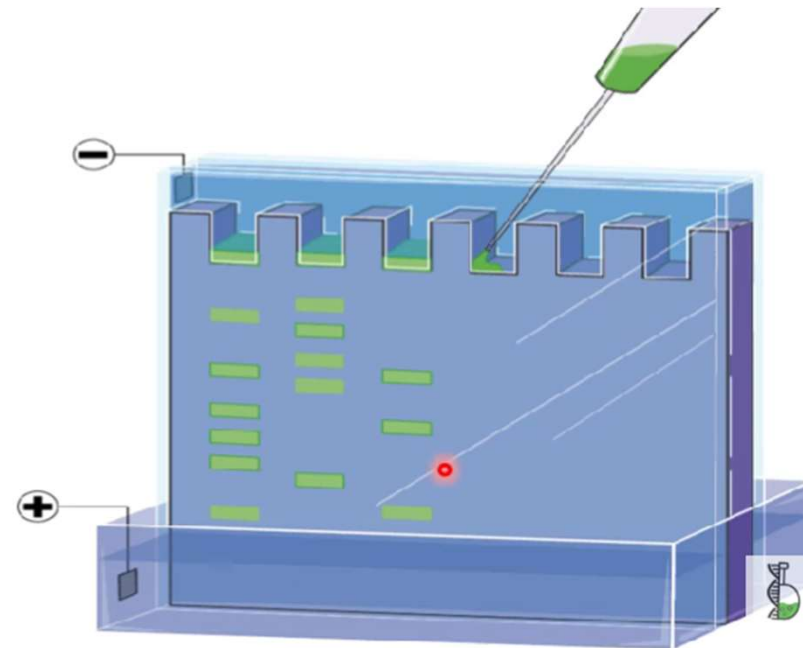
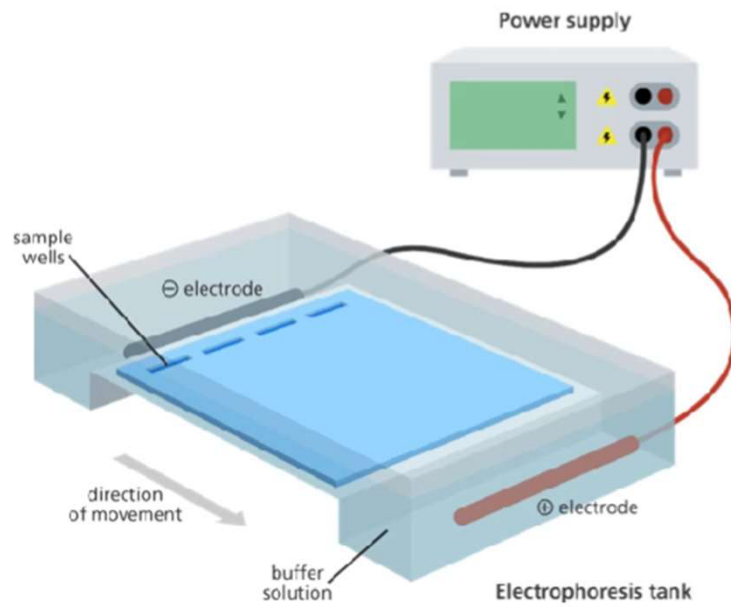
La digossigenina incorporata nei nucleotidi pirimidinici viene invece legata da un **anticorpo specifico**.

La visualizzazione dell'interazione sonda-molecola bersaglio avviene però solo se la streptavidina e l'anticorpo anti-digossigenina sono coniugati con **fluoròfori** o **enzimi** (come la fosfatasi alcalina e la perossidasi) che permettano l'emissione di luce o la produzione di un colore in saggi di chemiluminescenza o colorimetrici.



Le sonde sono usate per identificare (saggi di ibridazione) o isolare (saggi di purificazione) sequenze specifiche in una popolazione eterogenea di DNA.

L'elettroforesi in gel permette di separare frammenti di DNA



Saggi di ibridazione

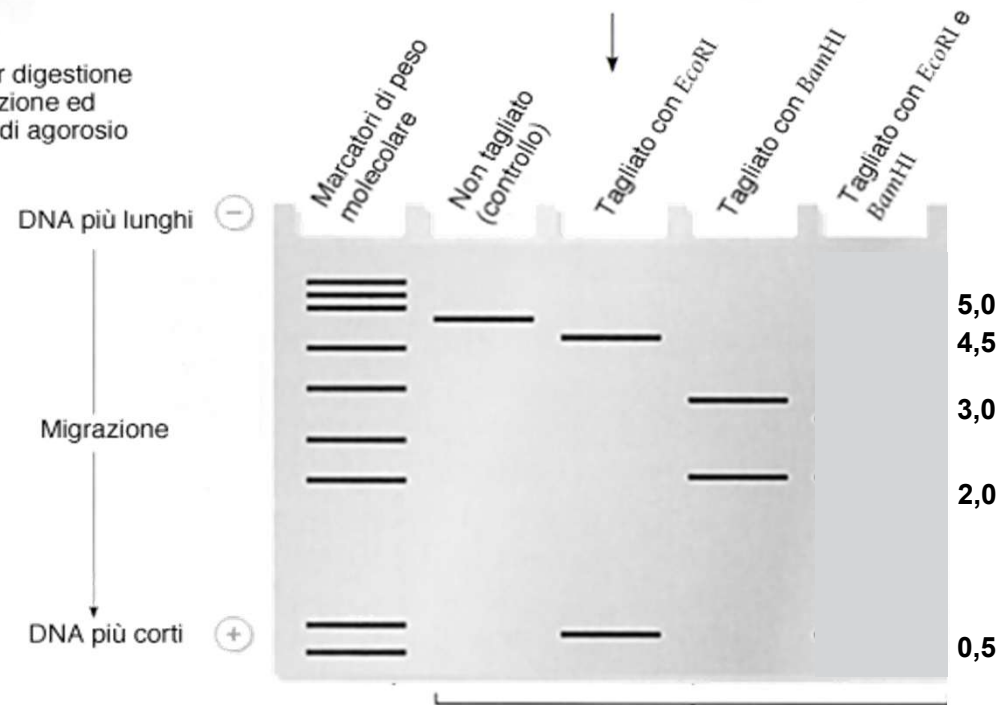


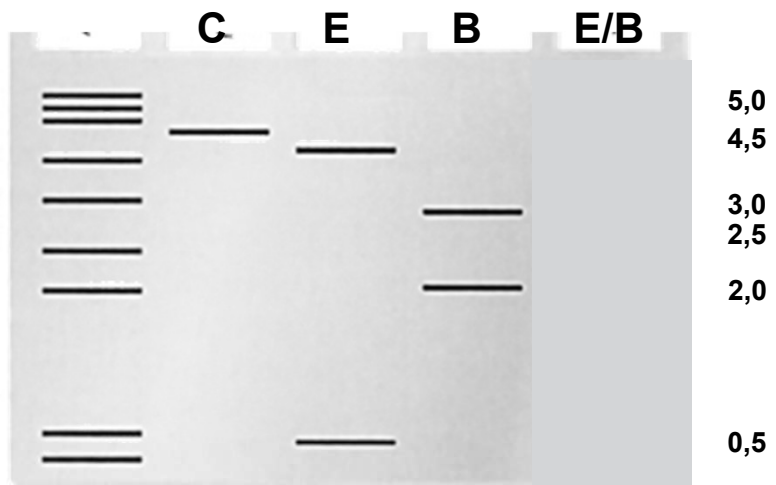
Costruzione di una mappa di restrizione per EcoRI e BamHI in un frammento di DNA

1 Popolazione di frammenti lineari di DNA di 5,0 kb clonati

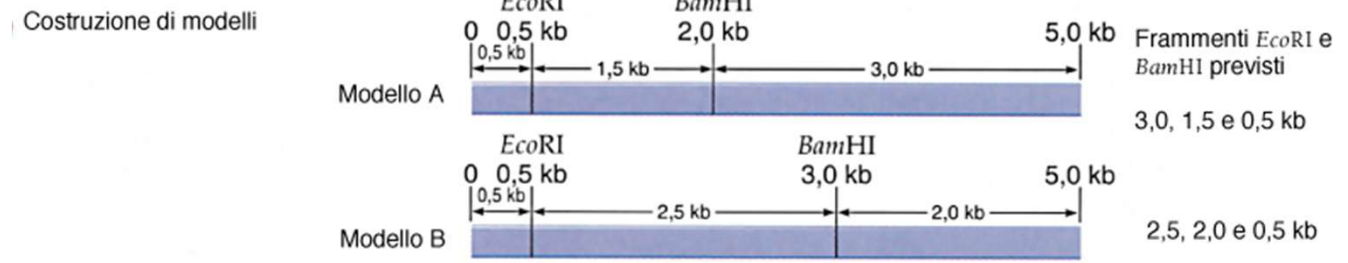
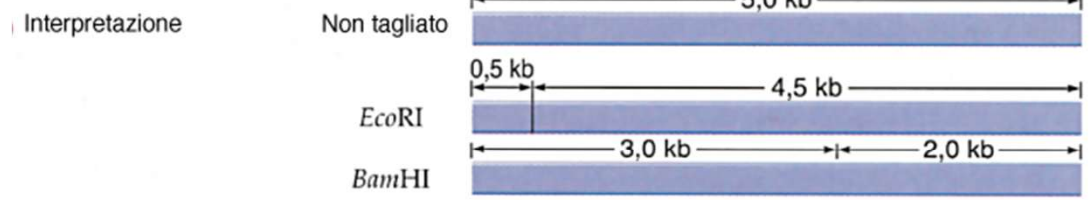


2 Analisi del DNA per digestione con enzimi di restrizione ed elettroforesi su gel di agarosio





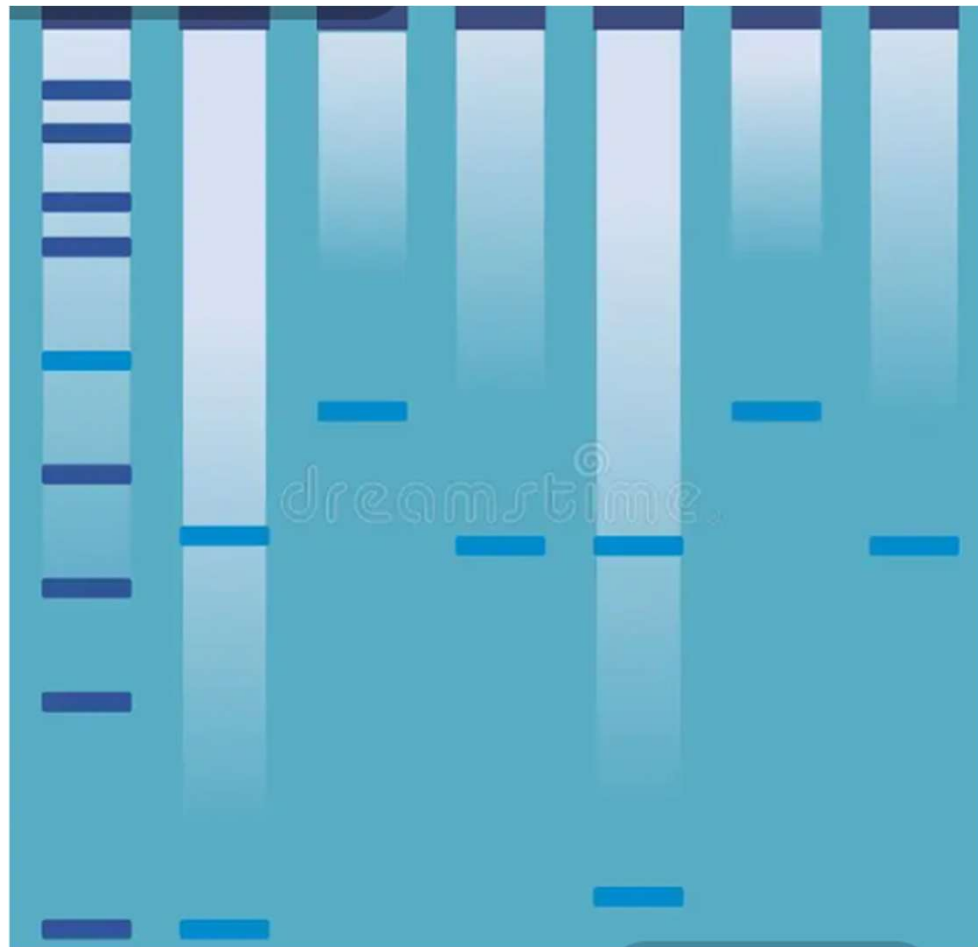
Risultati	Non tagliato	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI + BamHI</i>
	5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb



Si può frammentare con enzimi di restrizione
tutto il DNA genomico
e valutarne specifici profili di frammenti di
restrizione

SOUTHERN BLOTTING





Un sito di restrizione, e quindi il profilo di restrizione di un pezzo di DNA digerito con il relativo enzima di restrizione, può variare per:

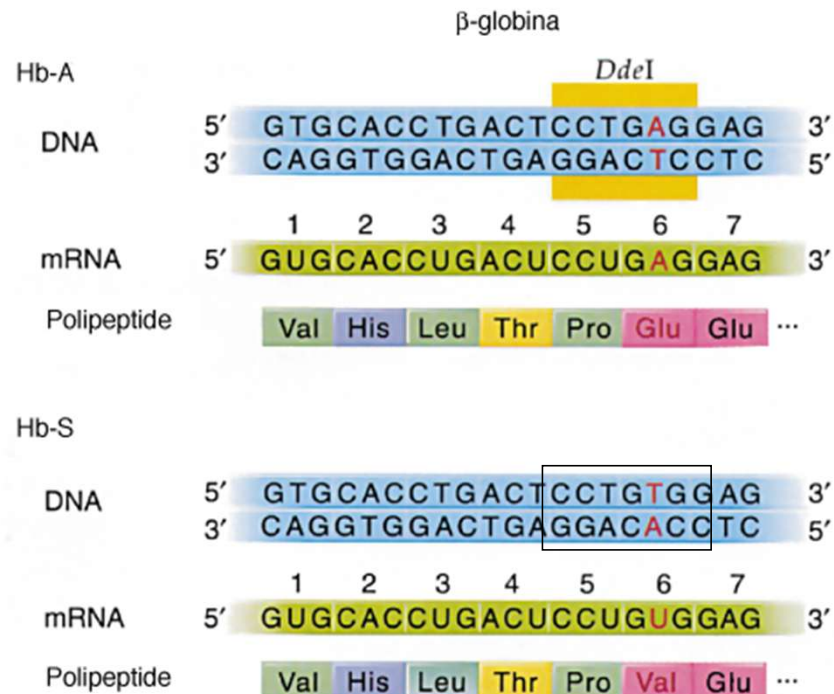
- Mutazioni

- Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs)

Diagnosi di malattia genetica la cui mutazione patogenetica altera un sito di restrizione:

l'esempio dell'**anemia falciforme**

Gene della globina β normale (Hb-A) e della globina β mutata dell'anemia falciforme (Hb-S)

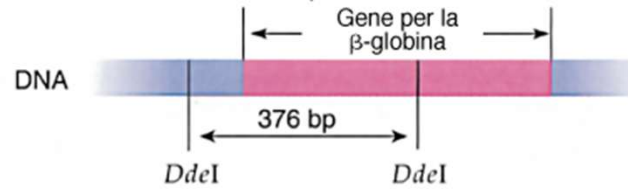


La mutazione (causa della malattia) modifica un sito di restrizione

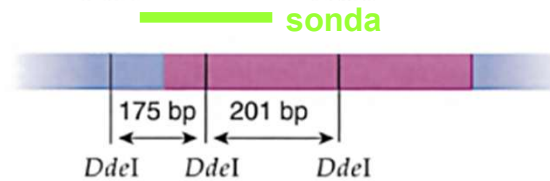
Saggi di ibridazione

a) Siti di restrizione *DdeI*

β^s (Allele mutante dell'anemia falciforme)



β^A (Allele normale)



Il Southern Blotting
permette di fare
diagnosi molecolare di
malattia

Diagnosi di malattia genetica
ASSOCIATA ad un polimorfismo
non patogenetico:

l'esempio della **fibrosi cistica**

Quando il gene responsabile della malattia
non è noto la diagnosi può servirsi del
**Polimorfismo di Lunghezza dei Frammenti
di Restrizione
(RFLP)**

Alcuni siti di restrizione del genoma sono polimorfici (SNPs).

Un particolare polimorfismo può essere strettamente associato ad un gene patologico (di cui si ignora sequenza e mutazione) e quindi segregare con esso.

Più il sito polimorfico è vicino al gene malattia, più sarà improbabile che un evento di crossing over in meiosi separi e faccia segregare indipendentemente i due caratteri.

L'analisi degli RFLP consiste:

§ nell'analizzare le sequenze non codificanti adiacenti a un gene

§ nel tipizzarle mediante digestione con enzimi di restrizione

§ nel confrontare i risultati della frammentazione nei soggetti appartenenti a un medesimo nucleo familiare.

L'utilizzo di sonde specifiche per le regioni adiacenti al gene contenenti siti di restrizione polimorfici possono evidenziare l'associazione tra uno specifico RFLP e il fenotipo patologico.

Quelle sonde potranno essere utilizzate per la diagnosi.

Gli RFLP possono servire all'identificazione, isolamento e caratterizzazione di un gene malattia

Intere famiglie con alta incidenza di fibrosi cistica furono studiate per la presenza di polimorfismi di siti di restrizione strettamente associati alla malattia.

Un marcatore RFLP che segregava debolmente con il gene malattia fu utilizzato per individuare il cromosoma su cui è situato il gene CF (cromosoma 7).

Furono usati quindi RFLP noti del cromosoma 7 tra cui ne furono individuati due strettamente associati al gene malattia (7q31-32).

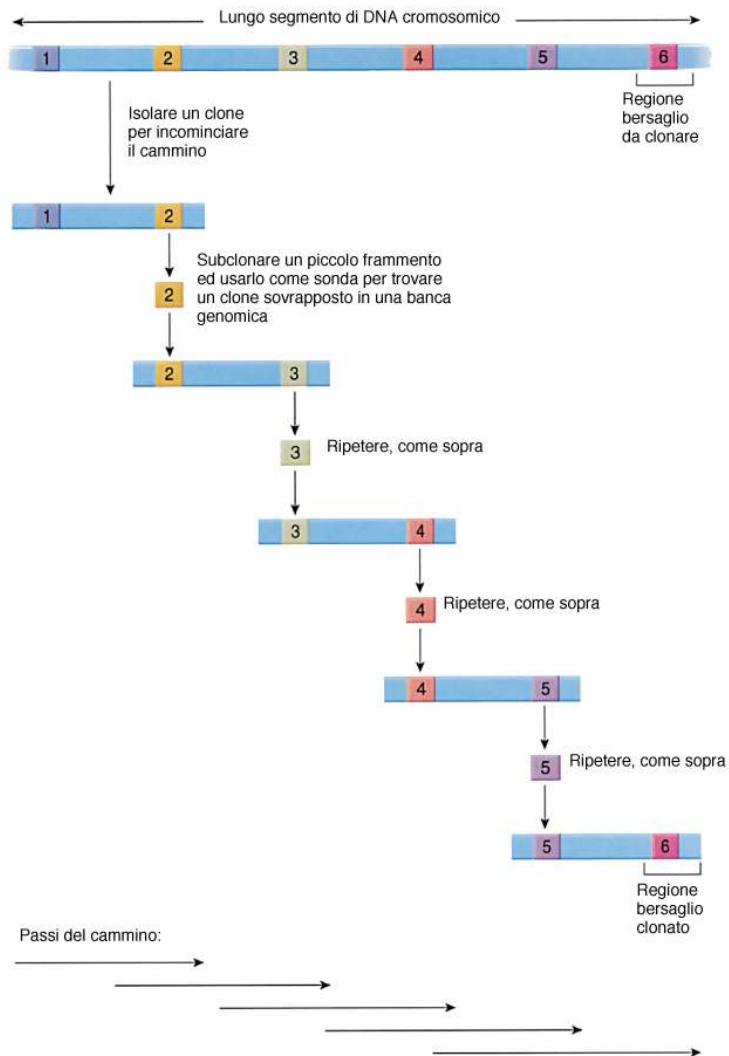
Saggi di ibridazione

Cromosoma 7



Gene della fibrosi cistica

Saggi di ibridazione



Il gene della Fibrosi Cistica fu identificato tramite "Chromosome Walking", cioè camminando sul cromosoma 7

Saggi di ibridazione

Nel 68% dei pazienti la malattia è associata alla delezione di 3 nt successivi con conseguente perdita dell'aminoacido fenilalanina nella proteina.

Nel resto dei pazienti si sono ritrovate più di 60 mutazioni diverse.

La sequenza del gene e della proteina prodotta ha permesso l'elaborazione di un'analisi computerizzata che ha individuato due domini proteici: uno transmembrana e uno di legame all'ATP.

La mutazione più frequente colpisce proprio la parte centrale del dominio transmembrana.

ALTERAZIONE DI UN CANALE DEL CLORO
CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)



ALTERAZIONI TRASPORTO ELETTROLITICO

ALTERAZIONE DELLE SECREZIONI MUCOSE

INFEZIONE INFIAMMAZIONE



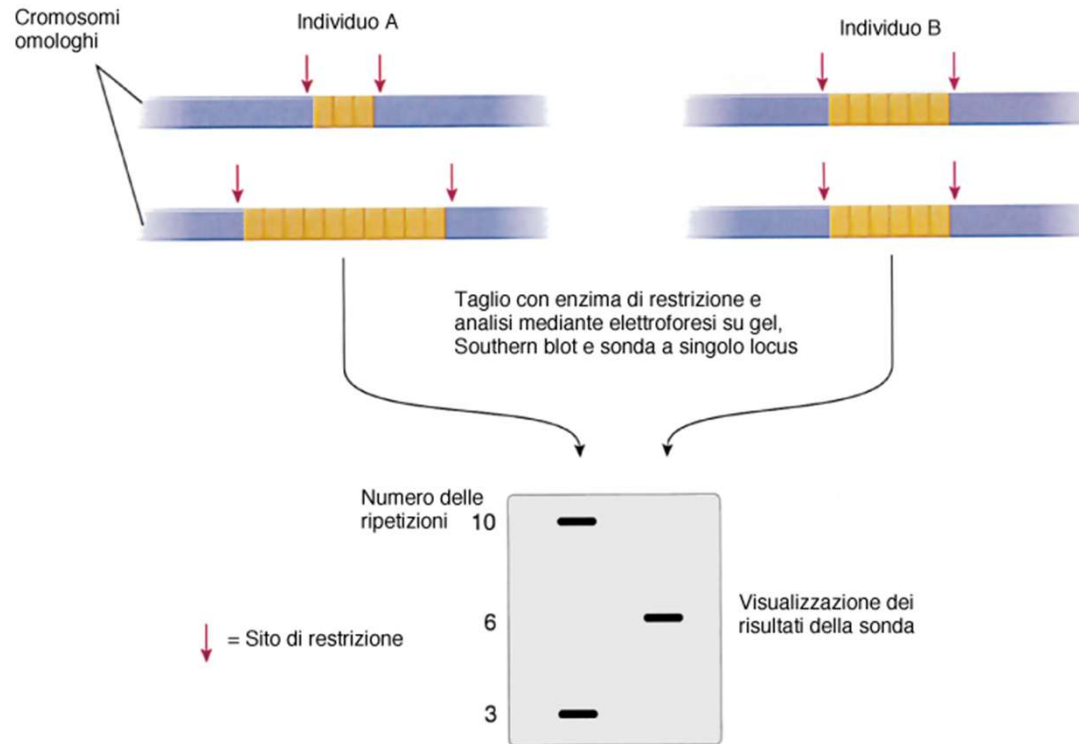
ALTI LIVELLI DI Cl- NEL SUDORE

SECREZIONI ESOCRINE MUCOSE DENSE

Utilizzo di RFLP per tipizzazione del DNA:

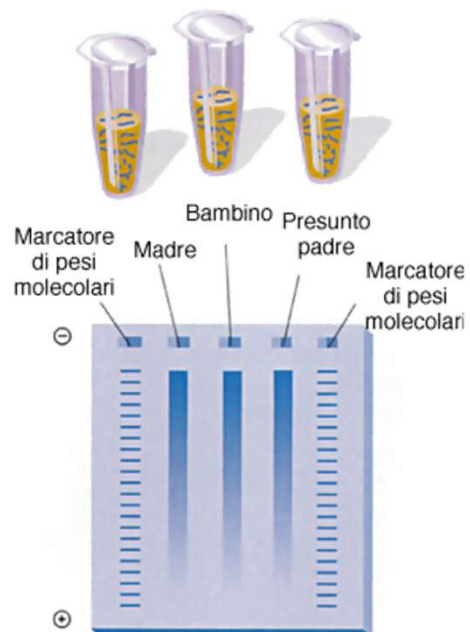
Gli esempi dell' **Attribuzione di paternità e dell'Identificazione dell'autore di un delitto**

Impronte di DNA (DNA fingerprinting): I satelliti



Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

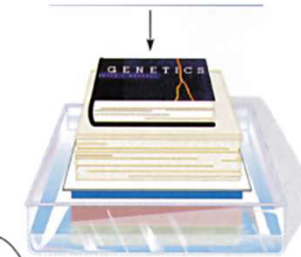
- 1 Il DNA è prelevato dalla madre, dal bambino e dal presunto padre. In analisi separate, il DNA è tagliato in frammenti con l'enzima di restrizione



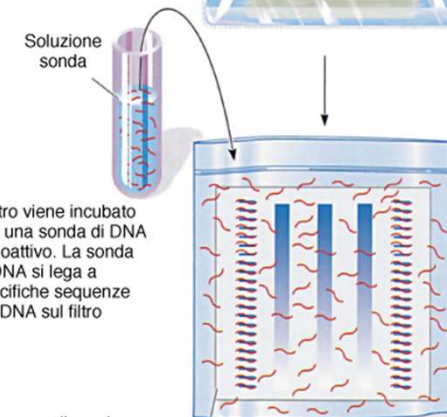
- 2 Elettroforesi su gel del DNA di ciascun campione e dei marcatori di pesi molecolari

Saggi di ibridazione

- 3 Preparato Southern blot dal gel



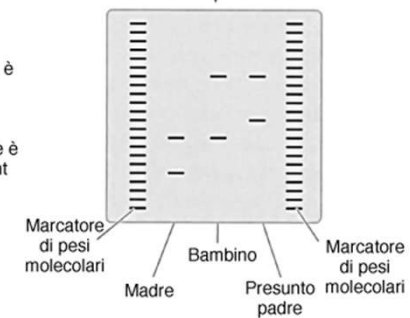
- 4 Il filtro viene incubato con una sonda di DNA radioattivo. La sonda di DNA si lega a specifiche sequenze del DNA sul filtro

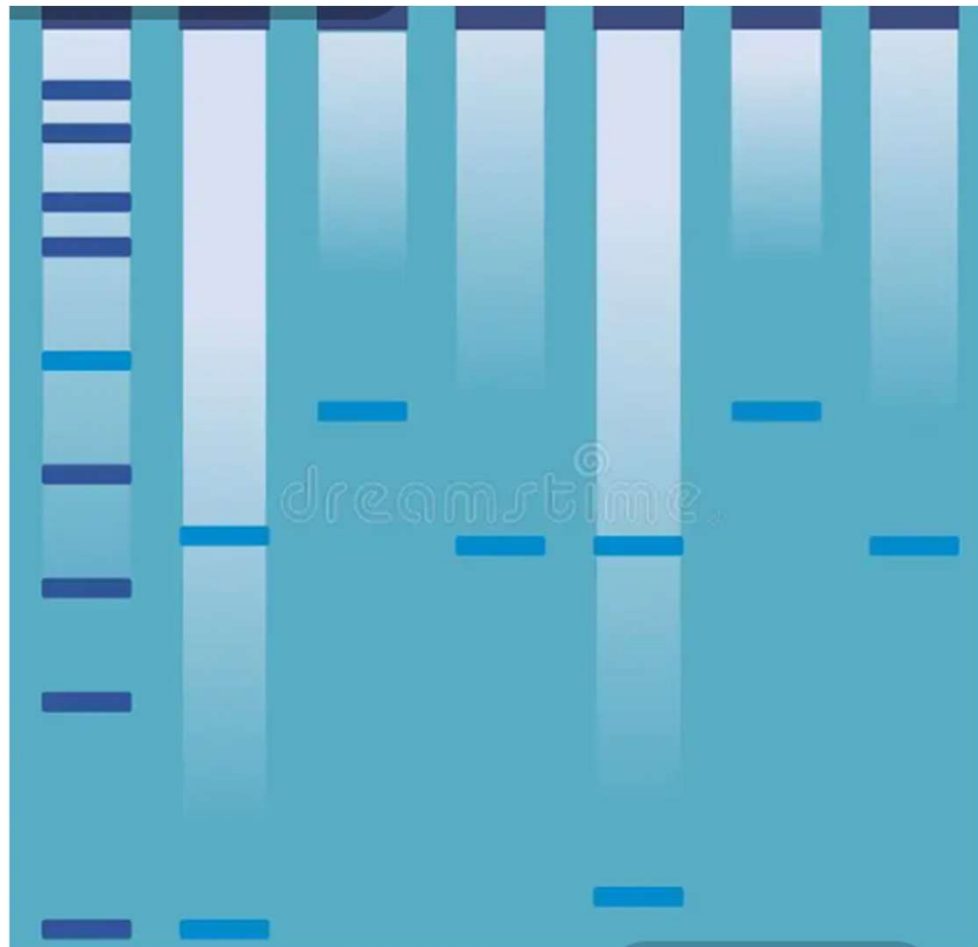


- 5 L'eccesso di sonda è lavato via, lasciando la sonda radioattiva ibridata al filtro

Filtro con DNA legato

- 6 L'autoradiografia è preparata. La distribuzione delle bande per ciascun campione è un DNA fingerprint

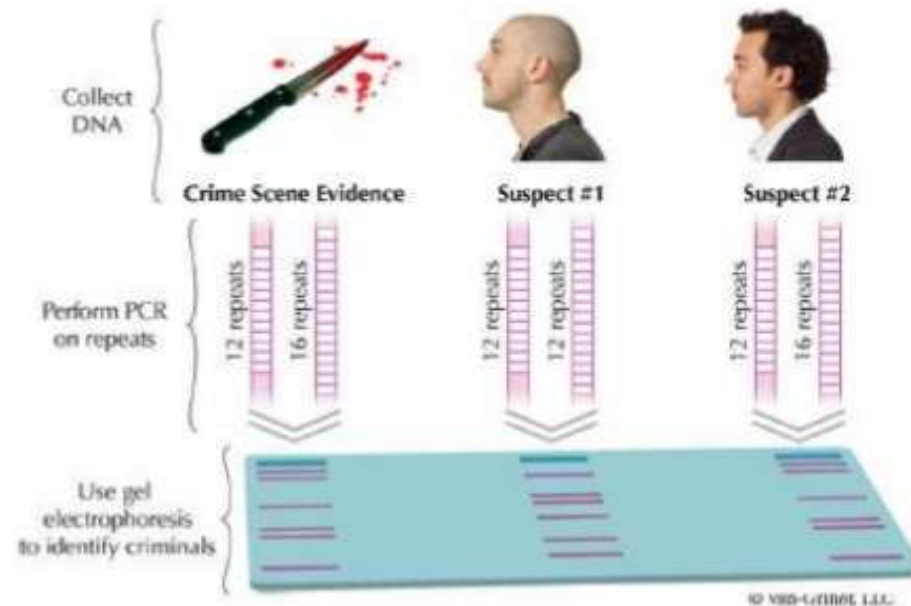




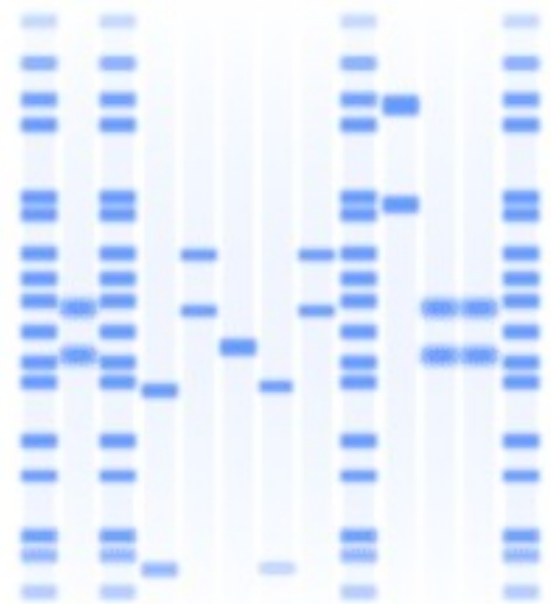
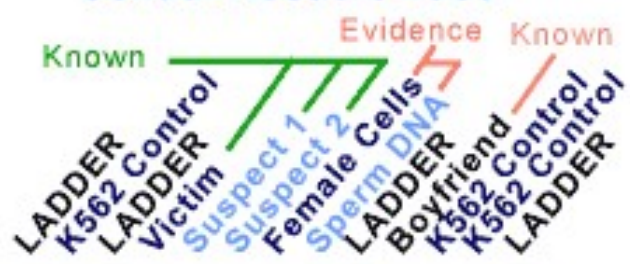
Tipizzazione del DNA per identificazione autore di delitto

Saggi di ibridazione

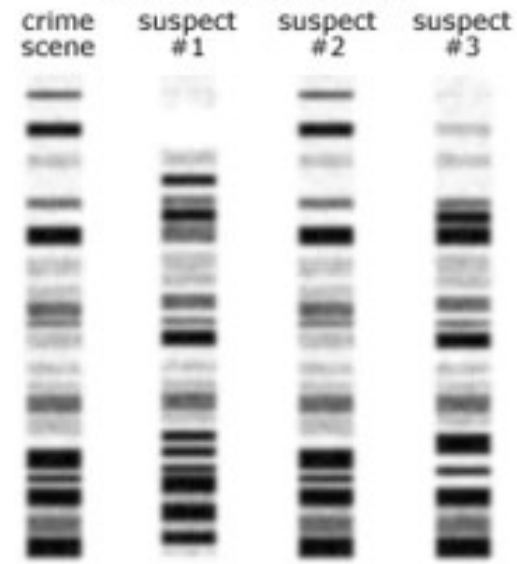
Which suspect was at the crime scene?



Sexual Assault Case



DNA samples from:

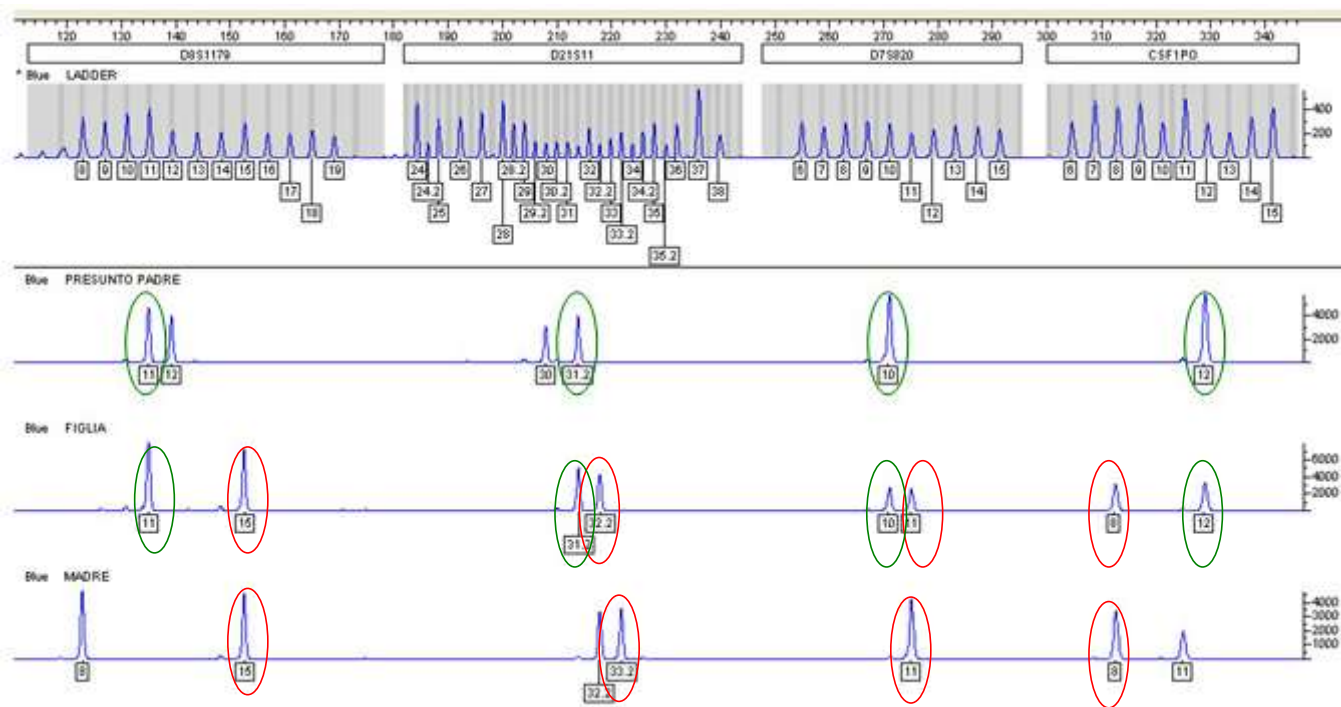


Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

PCR di STR

Amplificazione tramite PCR di STRs e analisi delle dimensioni

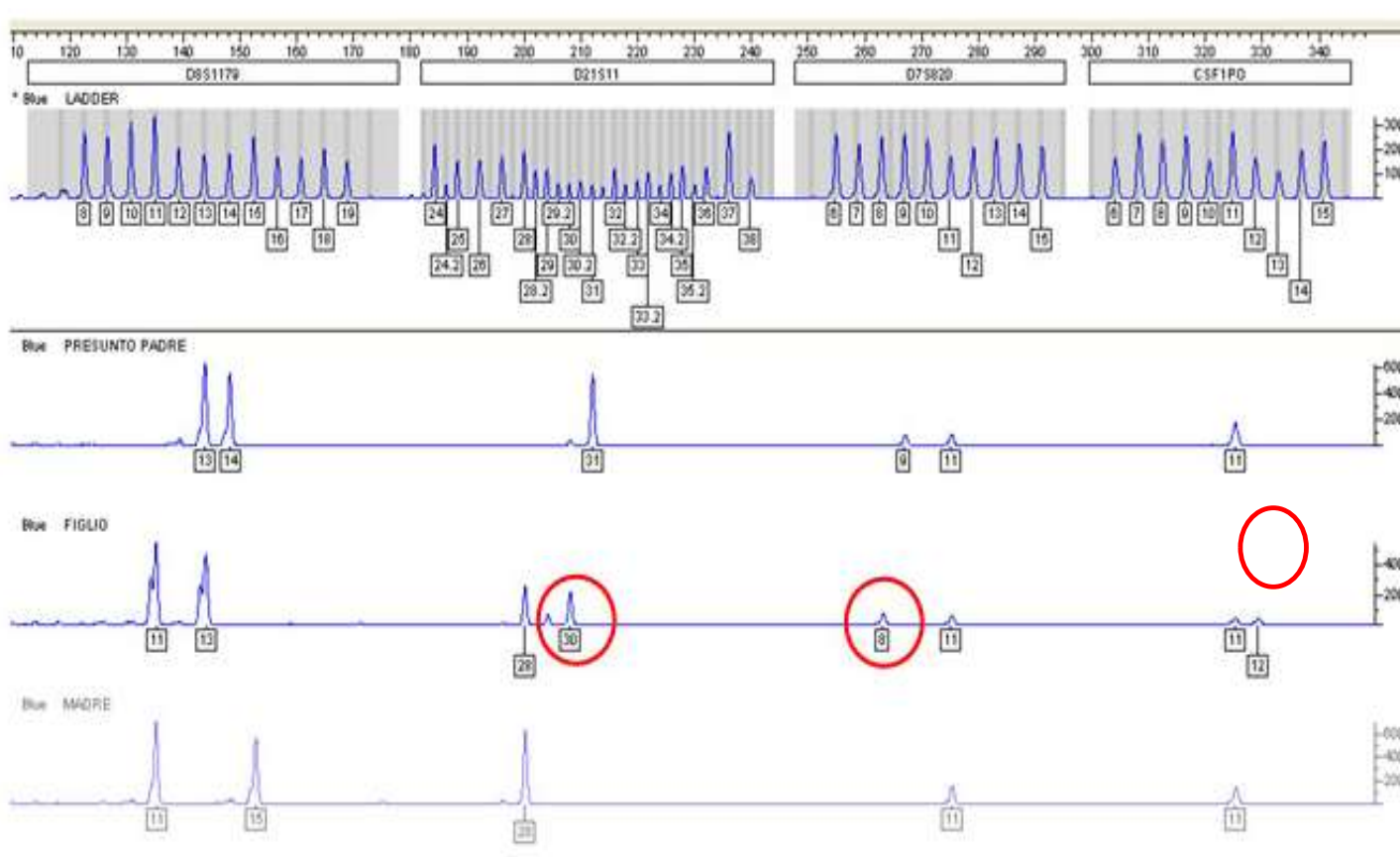
Attribuzione di paternità



Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

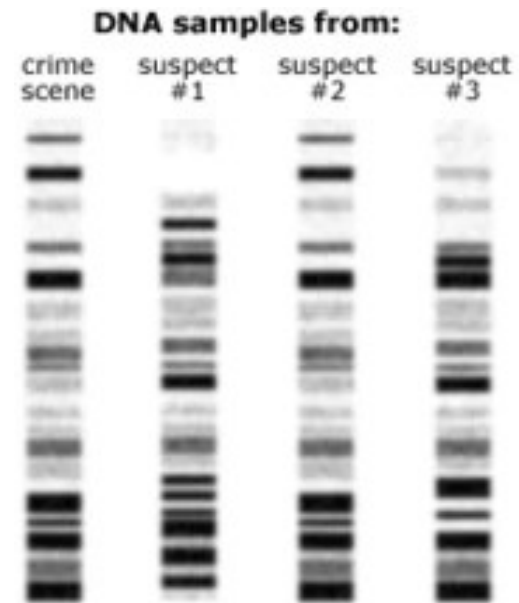
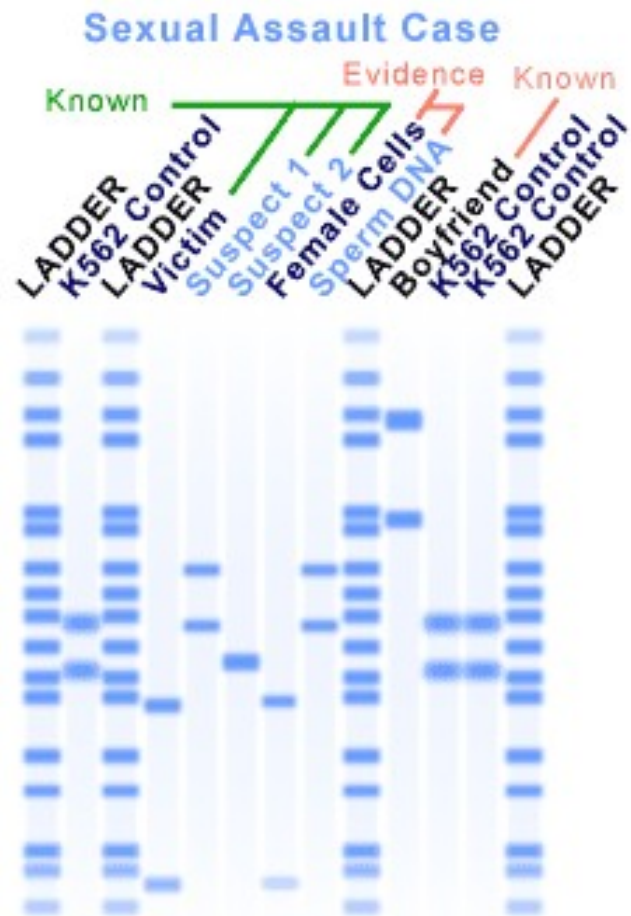
PCR di STR

Esclusione di paternità



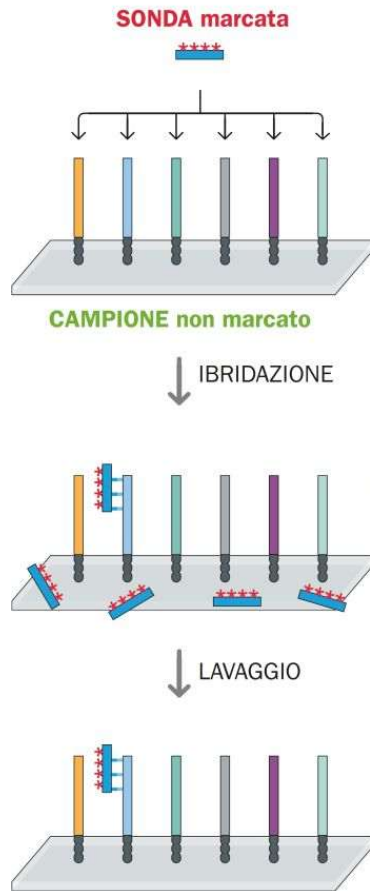
Tipizzazione del DNA per identificazione autore di delitto

Saggi di ibridazione

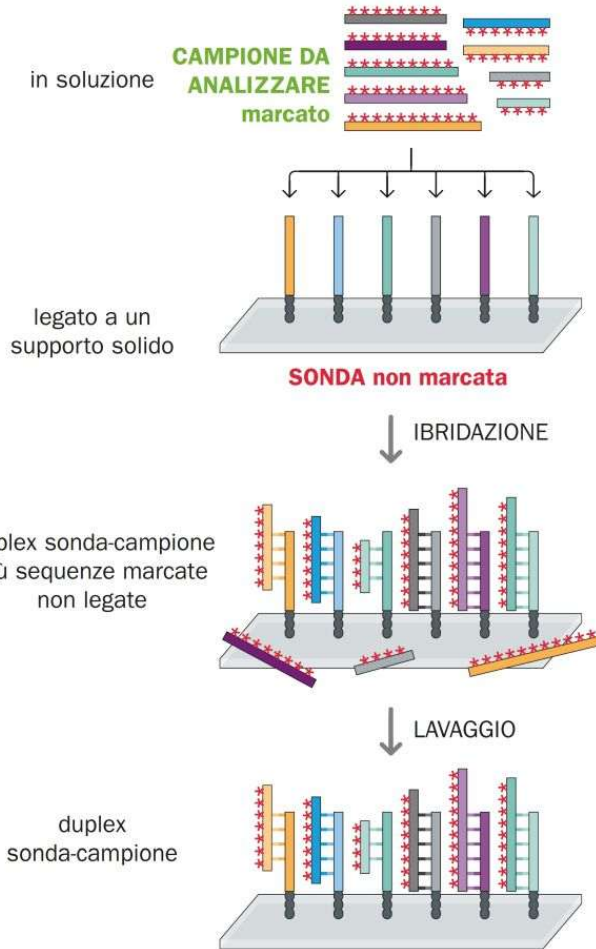


Saggi di ibridazione

SAGGIO STANDARD

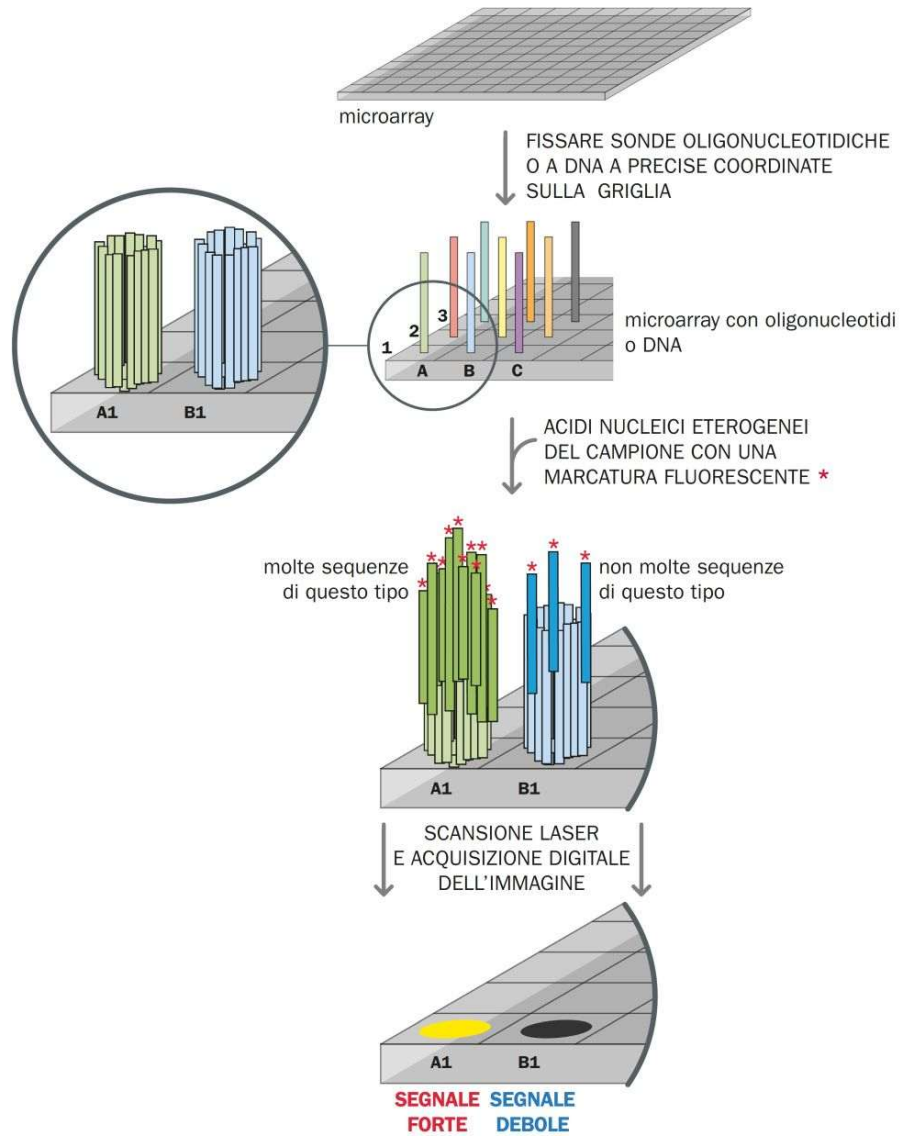


SAGGIO REVERSE

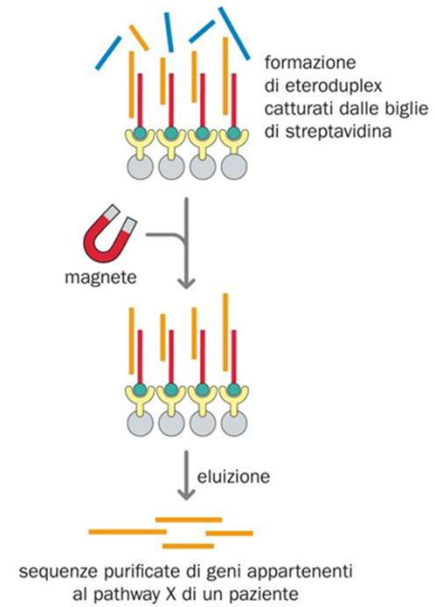
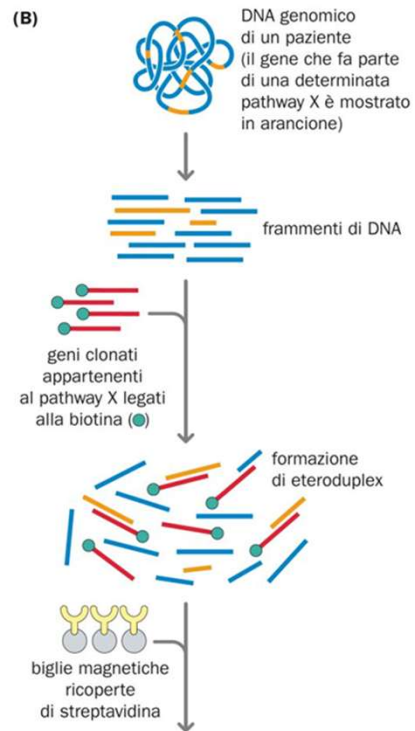
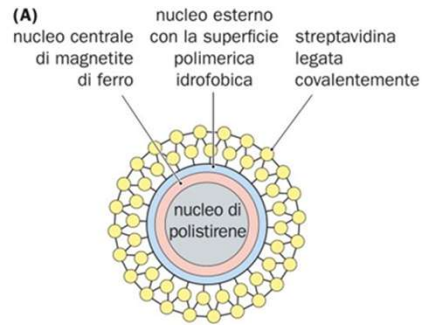


Saggi di ibridazione

I microarray



Saggi di purificazione

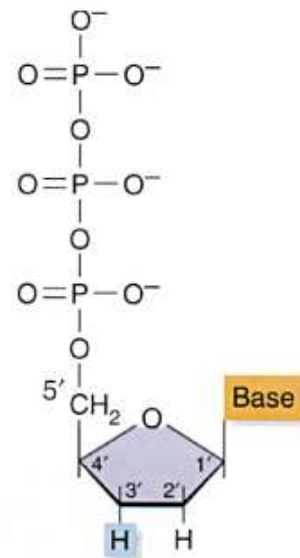


Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

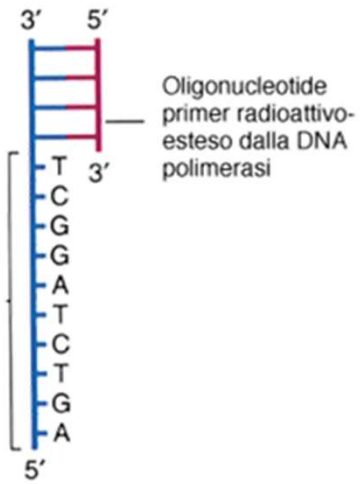
SEQUENZIAMENTO DEL DNA metodo dei didesossinucleotidi



Didesossinucleoside
trifosfato

(il normale precursore del
DNA ha OH in posizione 3')

Sequenza clonata da analizzare

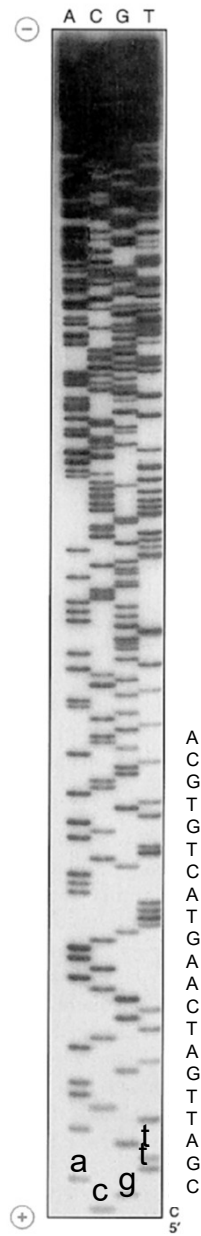


Reazione:

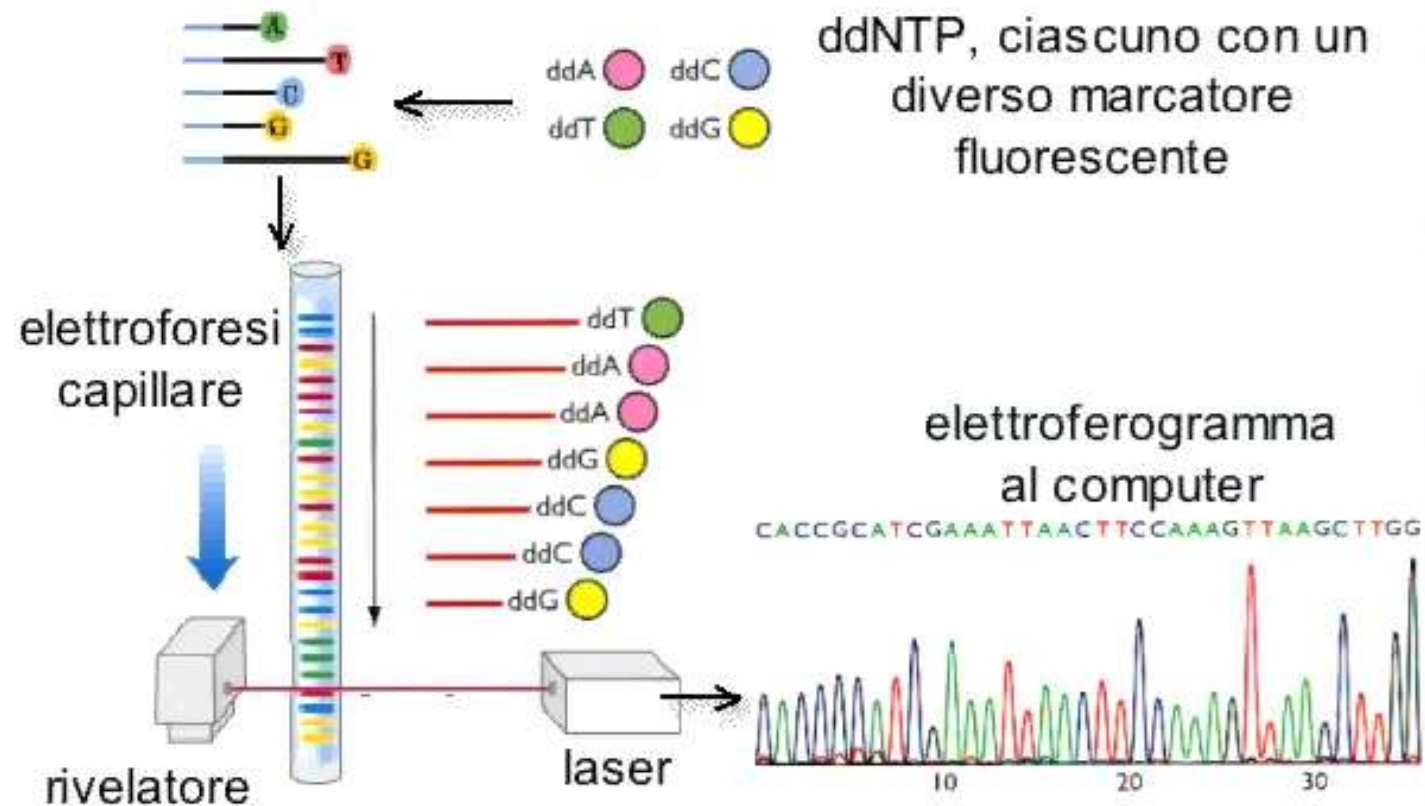
Prodotti di DNA:

	ddA	ddC	ddG	ddT
5'	A A A	A A A	A A	A A
	G G	G G G	G G	G G
	C C	C C C	C	C C
	T T	C C	C T	C C
	A A	T	T	T
	G	A	A	A
	A	G	G	G
		A		A
		C		C
3'				T

Sequenziamento



Sequenziatori a fluorescenza



Sequenziamento

Sequenziamento automatico del DNA con marcatori fluorescenti

