

lezione 15-16

martedì 6 aprile 2010

aula 2 ore 9:00

corso integrato di Biologia Applicata (BU)
ed Ingegneria Genetica (BCM)

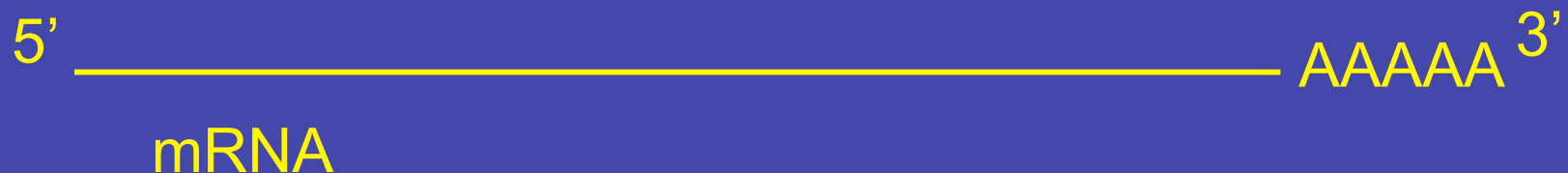
R.A.C.E.

Con la RT-PCR si amplifica solo un frammento del cDNA
Se si vuole identificare l'intero cDNA e non si conosce e si vuole evitare lo "screening" di una "library" si può ricorrere alla RACE

Rapid amplification of cDNA ends 5' or 3' unknown

- I) retrotrascrizione fatta con primers random o con poly T
 - quale è la differenza nella scelta di una strategia o dell'altra?
 - se si cerca il 5' si userà il random priming (esanucleotidi)
 - se si cerca il 3' si userà oligo dT

a meno che non si voglia usare un primer specifico anche per la RT



Principi della RACE

(Rapid Amplification of cDNA Ends)

La RACE è una tecnica per l'amplificazione di sequenze nucleotidiche, usando come stampo un mRNA tra una ben definita regione interna ad esso ed una sua estremità (3' o 5').

Questa tecnica, nota anche come “one-sided” PCR o “anchored” PCR, può essere considerata una variante della più classica PCR.

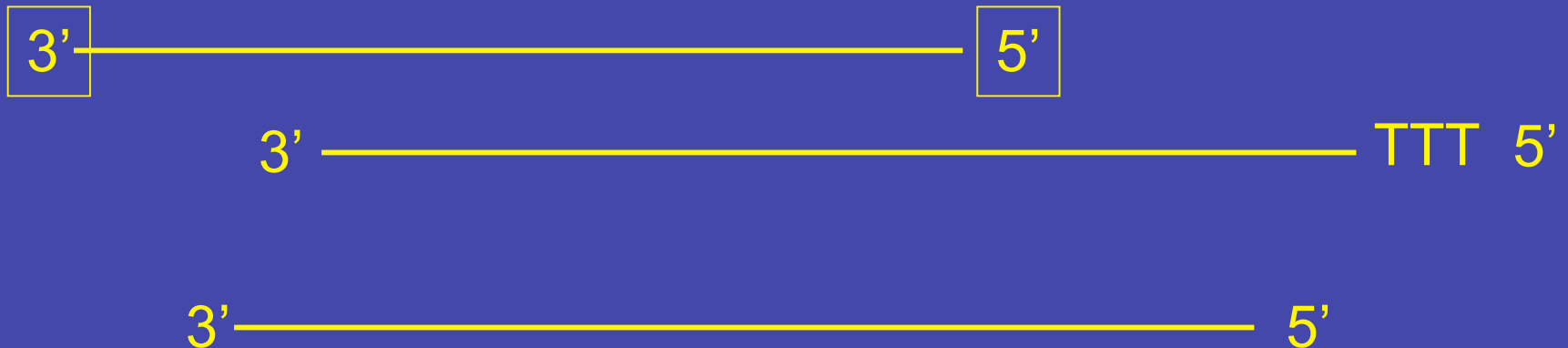
LIMITE PRINCIPALE

La RACE richiede almeno una regione a sequenza nota e interna all'mRNA che si vuole tipizzare.

Differenze nella ricerca di 5' o 3' ignoti



cDNA primo filamento prodotto dalla RT (completi e non)

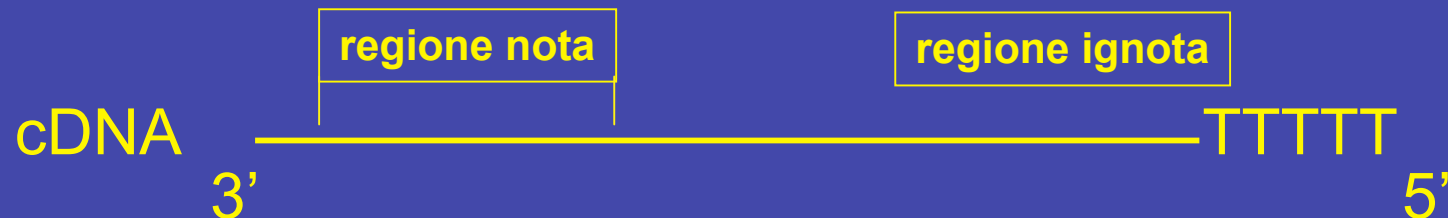


I cDNA ottenuti possono avere estremità diverse a secondo dell'efficienza della RT, e dei primers usati

Cerchiamo il 3' sconosciuto

In questo caso si usa un oligo dT per sintetizzare il cDNA

- Prima della RT si può effettuare una reazione di DNase per eliminare il DNA genomico che potrebbe dare falsi positivi perché contamina l' RNA e successivamente il cDNA
- Dopo la reazione di RT si può fare una reazione di RNase per eliminare RNA



RT = reverse transcriptase / trascrittasi inversa

Cosa serve per fare la RACE



Un **aiuto** non indifferente è dato:

Dalle banche **EST (expressed sequence tags)**;

Da studi di funzione (per esempio **EXON** e **PROMOTER TRAPPING**);

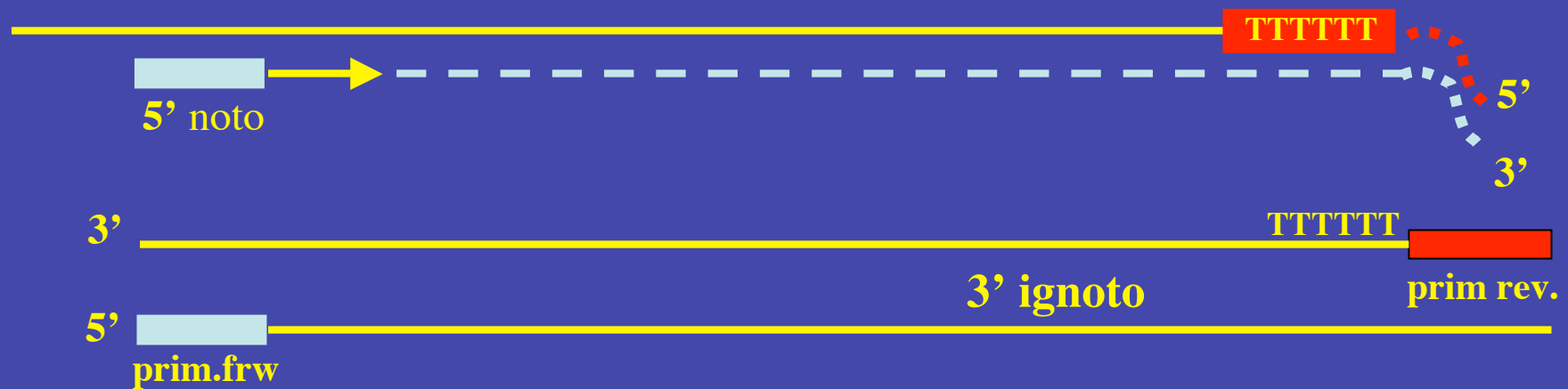
Dall'**IBRIDAZIONE** con sequenze conservate evolutivamente e/o funzionalmente.

Race ricerca del 3' ignoto



sintesi del I filamento di cDNA con RT con
 primer oligo dT
 trattamento con RNase

PCR con primer frw. noto e primer rev. con coda aggiunta



Scelta dei primers per la RACE 3'

Il primo primer obbligato è quello per la RT (poly T)

Il secondo primer viene scelto nella regione nota e deve essere specifico

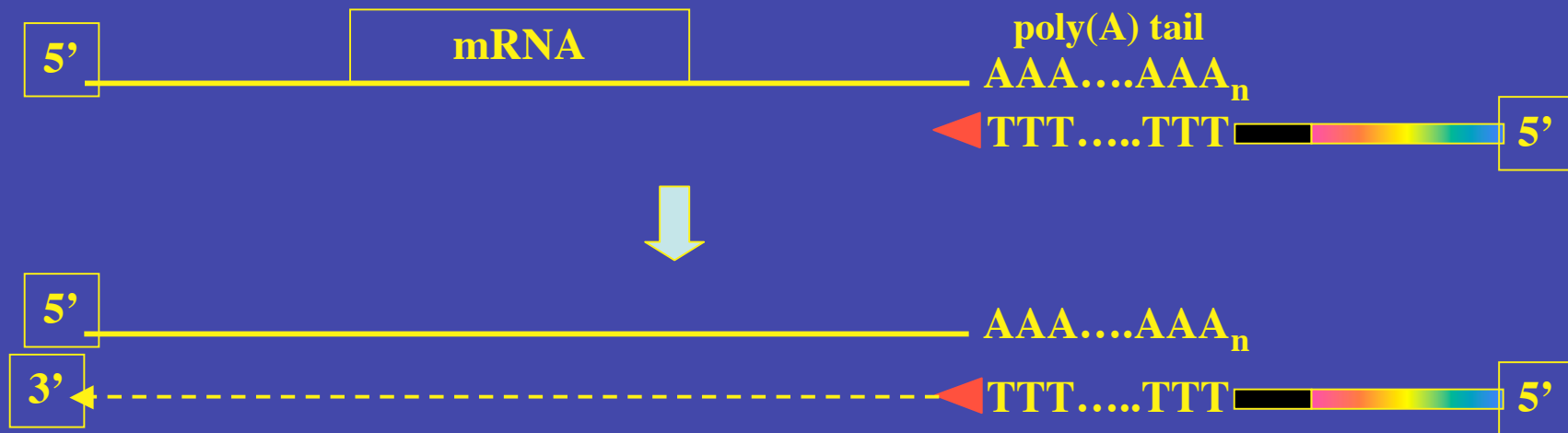


Una amplificazione con un solo primer specifico potrebbe dare dei prodotti anche aspecifici.

Quale strategia si può adottare ? Esiste una possibilità per aumentare la specificità di reazione, per ottenere il prodotto specifico corrispondente a ciò che sto cercando ?

RACE 3'

1 - Annealing tra la coda di polyA dell'mRNA e un primer contenente una coda di oligo(dT) all'estremità 3' e retrotrascrizione



ATTENZIONE!!!

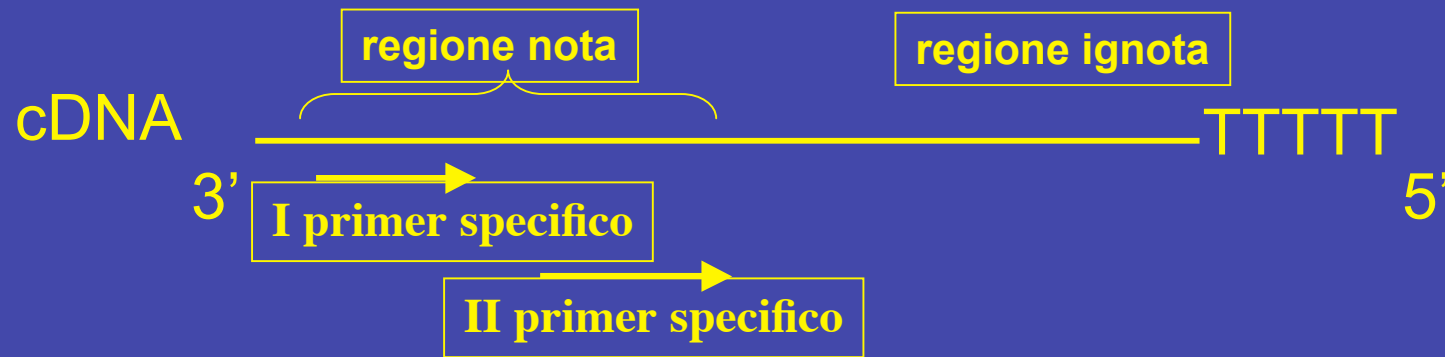


Alla facile **degradabilità** dell'RNA;

All'alta probabilità di avere un RNA con **strutture secondarie**;

Alla bassa specificità di questa fase;

Nested PCR o PCR interna

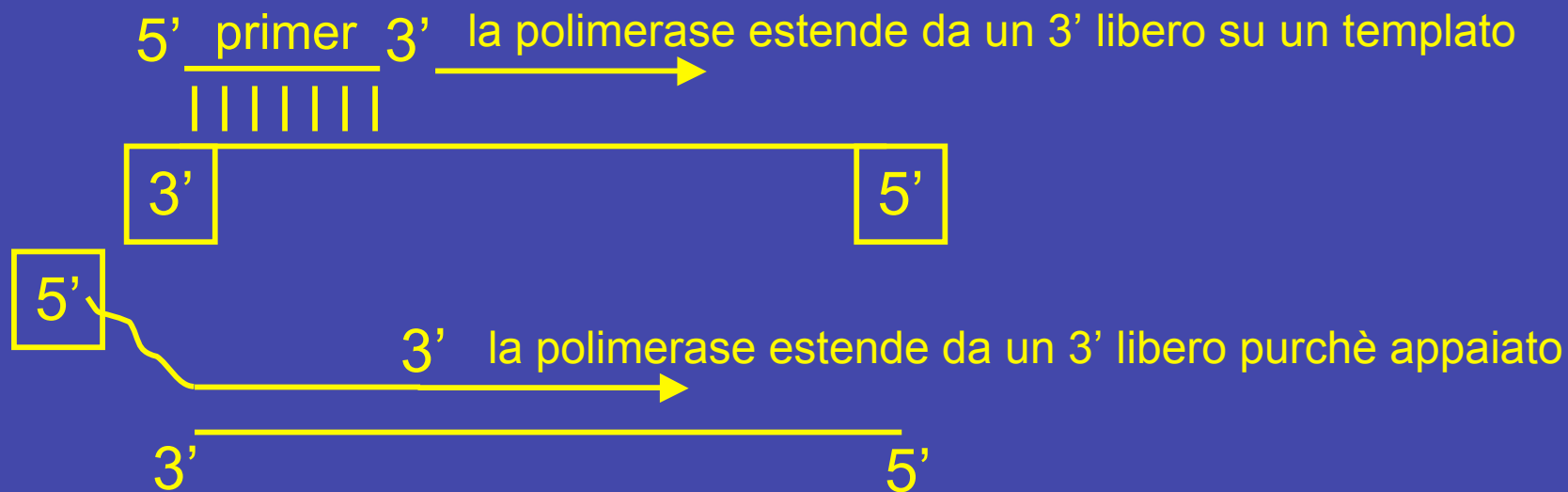


Il secondo primer specifico dovrà corrispondere ad una regione interna a quella nota e più al 5' del cDNA e cioè più al 3' nella regione nota dell' mRNA (coding sequence)

La seconda amplificazione perderà la regione corrispondente al primo primer,

- si tratta di sequenza già nota e non si perde informazione,
- probabilità alta di avere un frammento specifico
- probabilità bassa che due sequenze omologhe siano limitrofe due volte nel genoma.
- in casi estremi si può ricorrere ad un terzo primer interno.

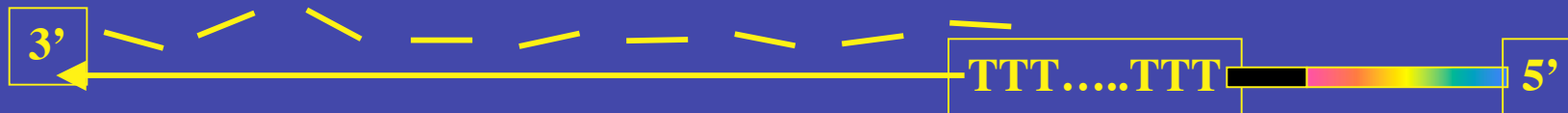
un trucco che inganna la polimerasi



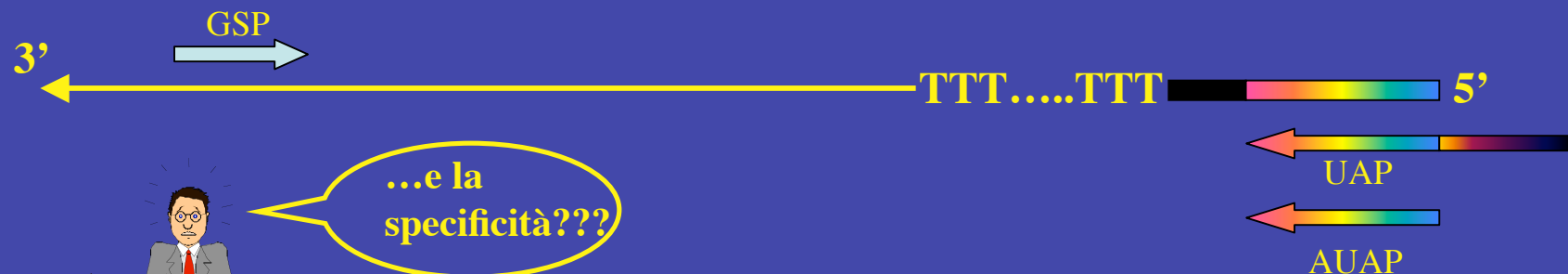
poco importa se ha una parte al 5' non appaiata, verrà inglobata lo stesso nell'amplicone e ne farà parte dalla amplificazione successiva in cui serve da template

Race fasi successive

2 - Degradazione del template di RNA



3 - Amplificazione per PCR usando un primer specifico del gene (GSP) ed uno specifico alla nuova estremità 5' (AUAP o UAP)



gsp = gene specific primer
Uap = universal amplification primer
Auap = abridget univ.ampl. primer

Specificità GSP2

La SPECIFICITA' può essere garantita da un'ulteriore amplificazione con un secondo primer gene specifico (GSP2)

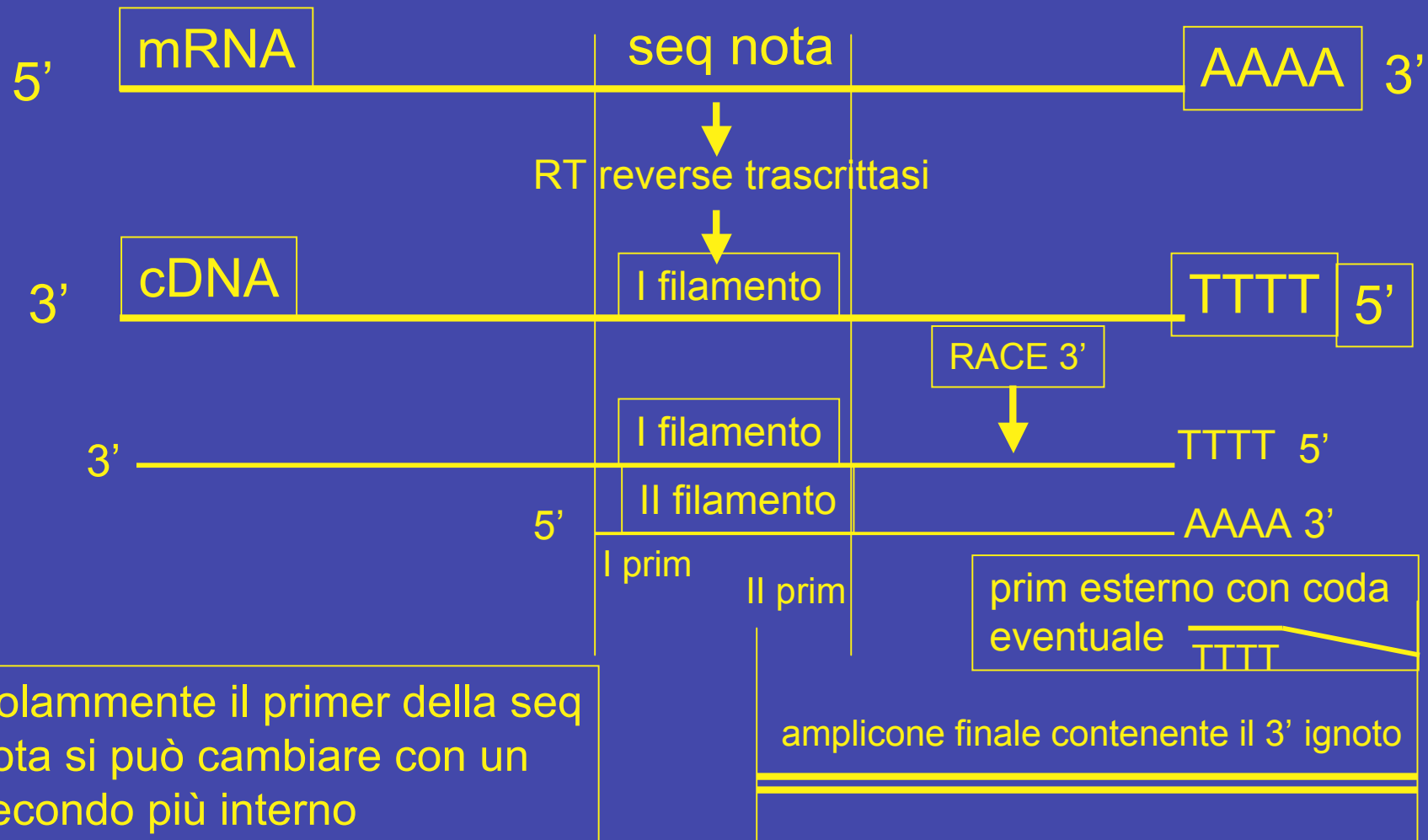


- SEQUENZIAMENTO DIRETTO;
- CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO;
- STUDI FUNZIONALI;

I primers UAP e AUAP servono per avere delle T melting su cui disegnare i GSP

PCR nested RACE 3'

Nel caso di una RACE 3' cambia solo il verso dei primers interni alla regione nota ed il primer del 3' ignoto può essere anche un poly T con una coda per avere una T° melting più consona ai primers interni



RACE 5' Cerchiamo il 5' ignoto

Dobbiamo comunque ottenere il cDNA ed utilizziamo gli stessi metodi utilizzati per ottenere il cDNA della ricerca del 3' ignoto. C'è anche la possibilità di fare la RT direttamente con un primer noto. L'unico problema è che pochi sono gli enzimi RT che funzionano ad alta temperatura per cui è possibile che il primer specifico non faccia una RT molto specifica. Per questo motivo si tende a fare una RT di tutti i messaggeri (retro-trascrittoma).

Dopodichè si deve fare una terminal transferasi come spiegato nelle diapositive successive, si preparano dei primers con una coda che possono aumentare l'efficienza rispetto al primer poly C. Si devono usare invece i primers interni specifici nested in maniera simile alla RACE 3'.

Race 5' fase I

1 - Annealing tra una regione interna dell'mRNA e un primer gene specifico (GSP1); oppure con poly T o random priming (esanucleotidi random).

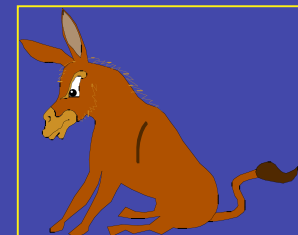


GSP1

NON deve essere interno o sovrapposto ad introni;

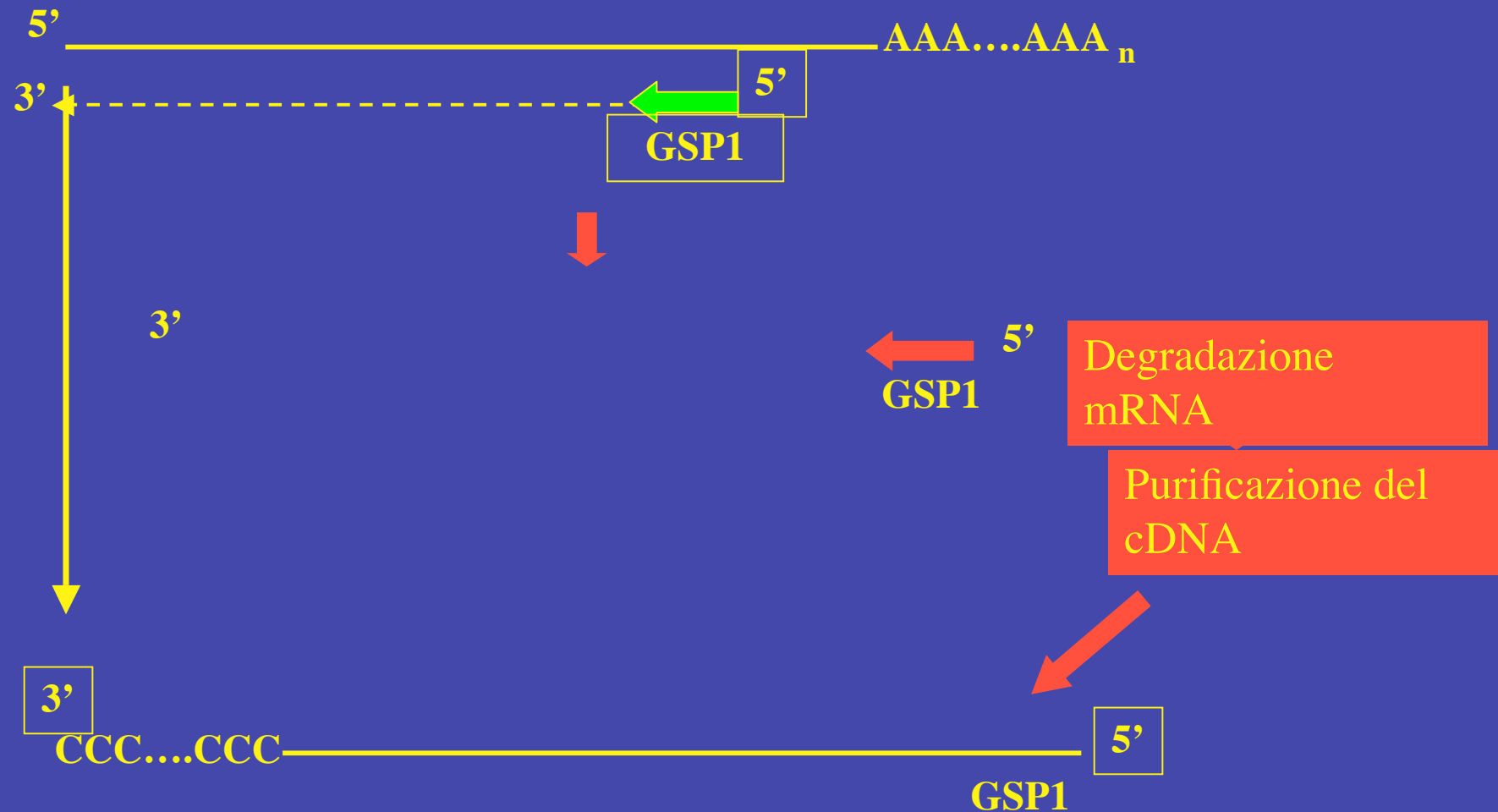
NON deve avere una T_m molto alta (lavora circa a 42°C);

NON deve avere una bassa specificità o omologia con altri geni;



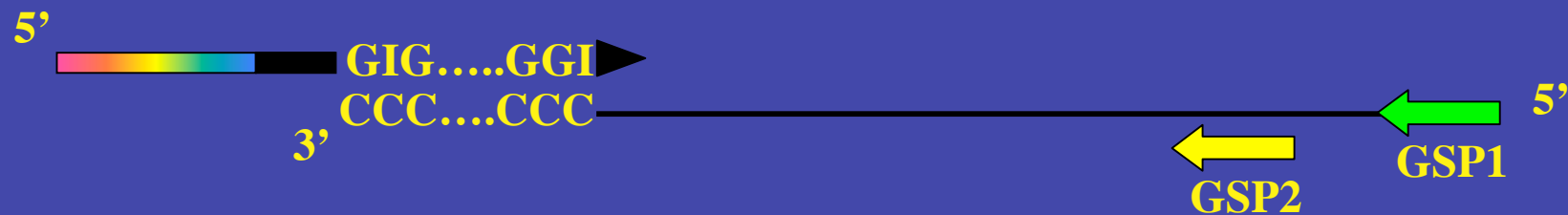
Race 5' fase II

2 - Retrotrascrizione e tailing all'estremità 3' del cDNA

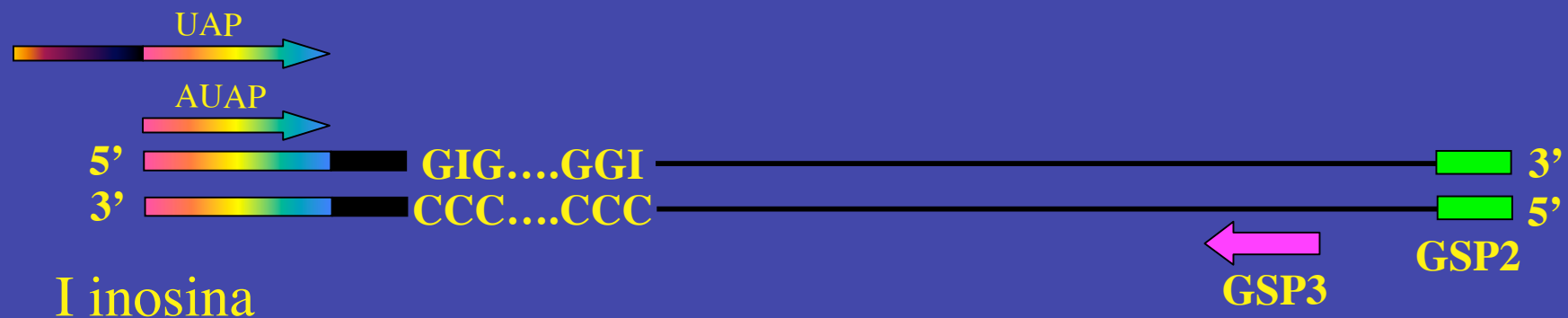


Race 5' fase III

3 - Amplificazione per PCR usando un secondo primer specifico al gene (GSP2) ed uno contenente una coda di oligo(dC) all'estremità 3'



La SPECIFICITA' può essere garantita da un'ulteriore amplificazione con un altro primer gene specifico (GSP2)



race 5'ignoto riepilogo

mRNA

poly A

Sintesi del I filamento di cDNA tramite rev.transcript.

5'

3'

primer rev. specifico

5'

rev. transcript. a temp. restrittiva con enzima mutante RH⁻

3'

3'

cDNA singolo filamento

5'

trattamento con RNase

trattamento con terminal transferase

CCCC

3'

cDNA singolo filamento

5'

primer frw di poly G

CCCC

3'

cDNA singolo filamento

5'

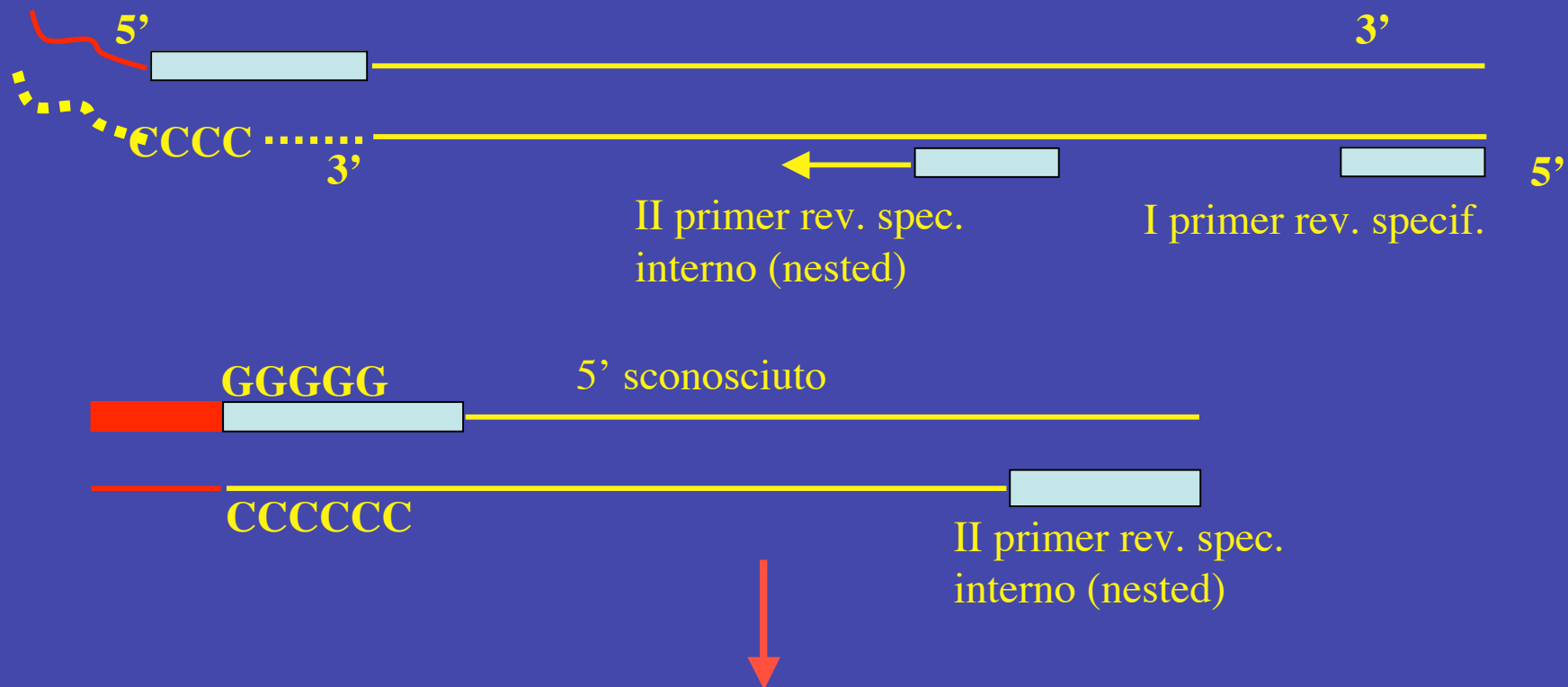
sintesi secondo filamento

primer rev. specif.

PCR selettiva

Race 5' ricapitolazione

dopo la sintesi del I filam. di cDNA e la terminal transferase, PCR selettiva con II primer rev. selettivo interno



Clonaggio in un vettore per inserzione con estremità coesive per restrizione dell'adattatore o con A-T

Clonaggio dei prodotti PCR

Clonaggio in plasmidi dedicati con prodotti PCR

con TAQ polymerase w.t. si hanno aggiunte di A terminali spuri
TAQ proof reading o altri producono ampliconi “blunt ends”
Secondo che enzima si usa, si sceglie un plasmide adeguato.

Esistono in vendita:

- plasmidi già linearizzati con coda di T terminale per facilitare la ligasi tra l'amplicone ed il plasmide
- plasmidi con topoisomerasi coniugata all'estremità del plasmide che attacca direttamente l'amplicone senza bisogno di ligasi

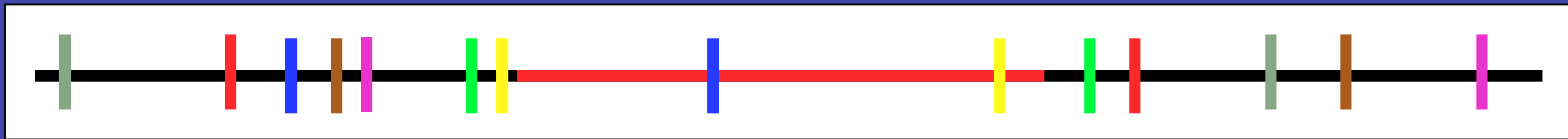
cerchiamo delle estremità ad un frammento di PCR intersperso all'interno di una sequenza ignota:

- se ho trovato da Southern un frammento di DNA a sequenza ignota,
- una inserzione di un frammento noto in un genoma,
- un vettore che si è integrato in una regione ignota,
- un virus integrato non sito specifico,
- una ricerca "gene trapping",
- la ricerca delle estremità genomiche di un gene noto solo come cDNA

analisi Southern del frgm

deve essere scelto il frammento da amplificare

sequenza genomica o di Bac o da cui si vuole recuperare la sequenza nota inserita o integrata



digestione con enzimi di restrizione

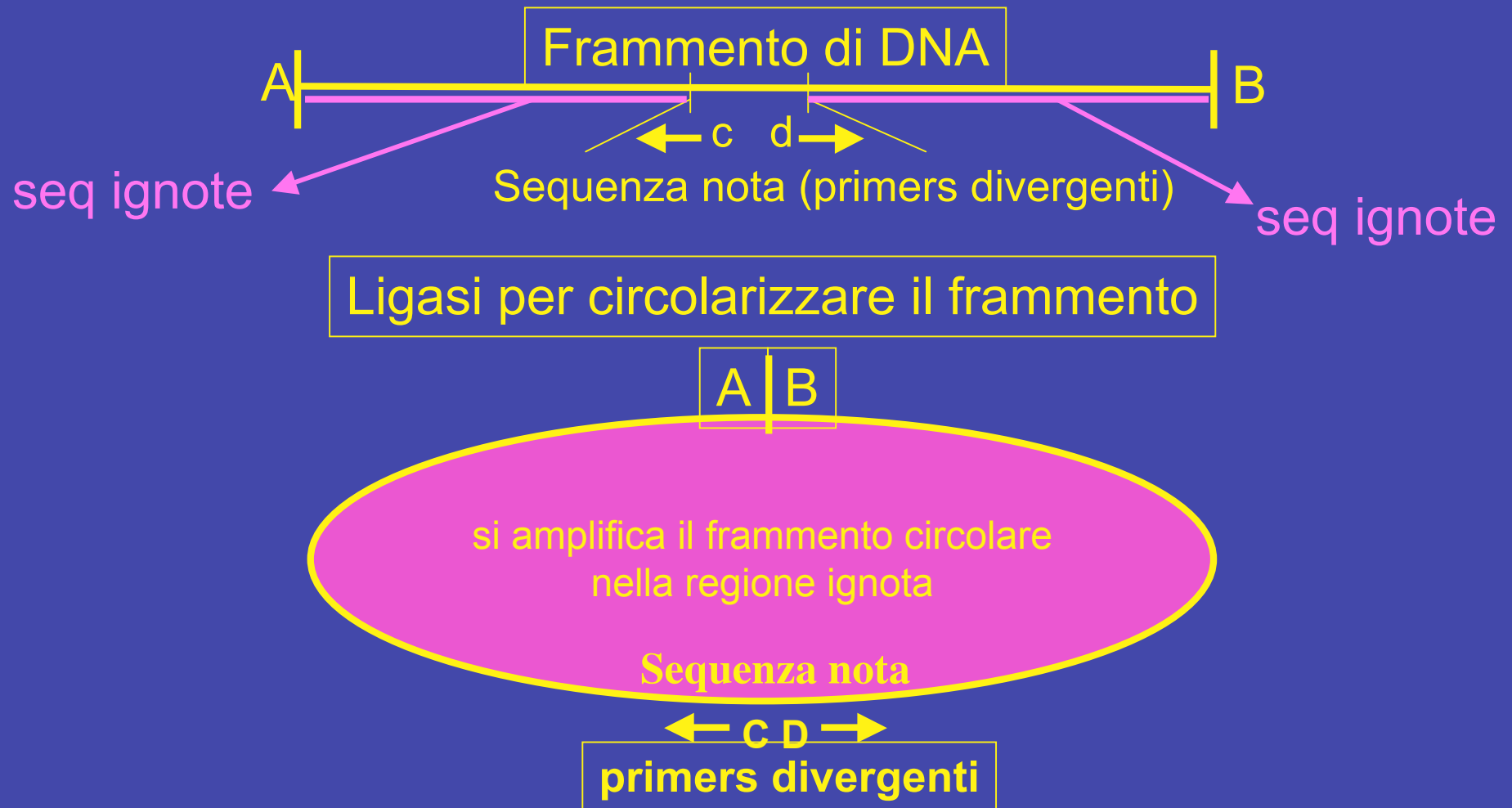
verde : no buono
bleu : no buono
giallo: no buono
viola: troppo lungo
marrò: buono
rosso: buono
grigio + viola: buono

- tra due buoni si sceglie quello con estremità coesive per la ligasi più efficiente
- si evita l'enzima che taglia all'interno del frgm, si otterrebbe solo una estremità (diversa strategia)

grigio + viola se dx troppo lungo, estremità compatibili

PCR inversa

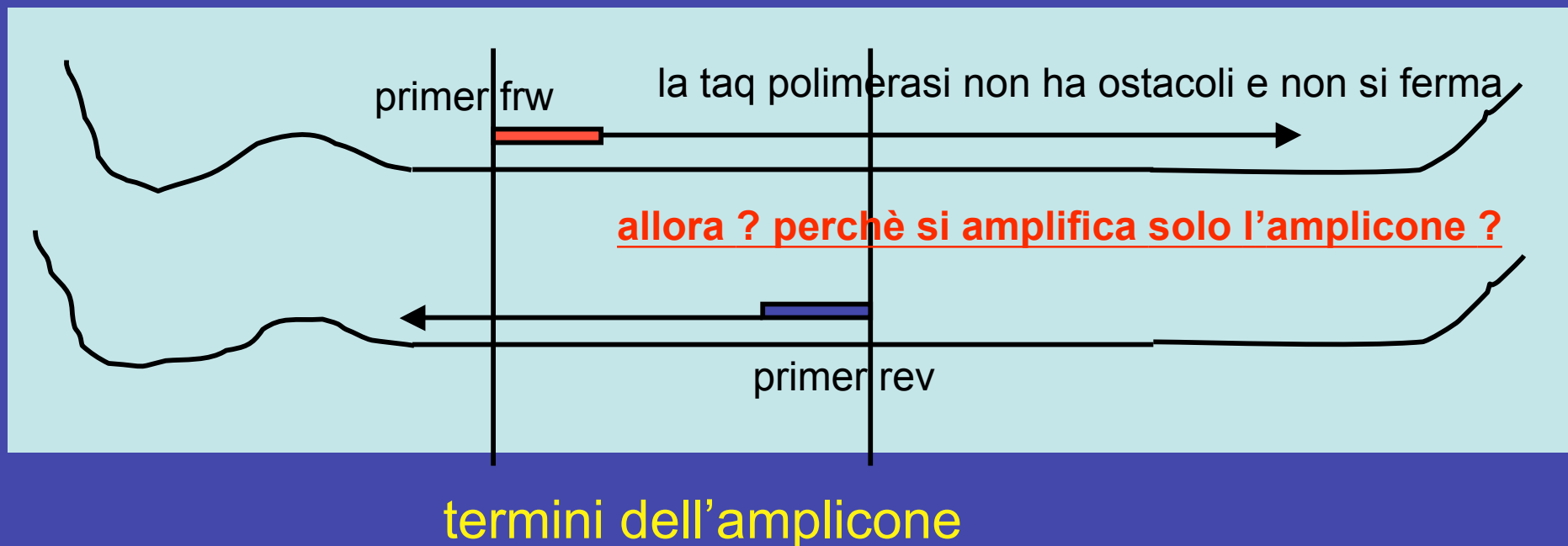
Il nome deriva dal fatto che si usano primers disegnati su una sequenza con direzione divergente, direzione di sequenza dei primers apparentemente non convergente. Analisi Southern



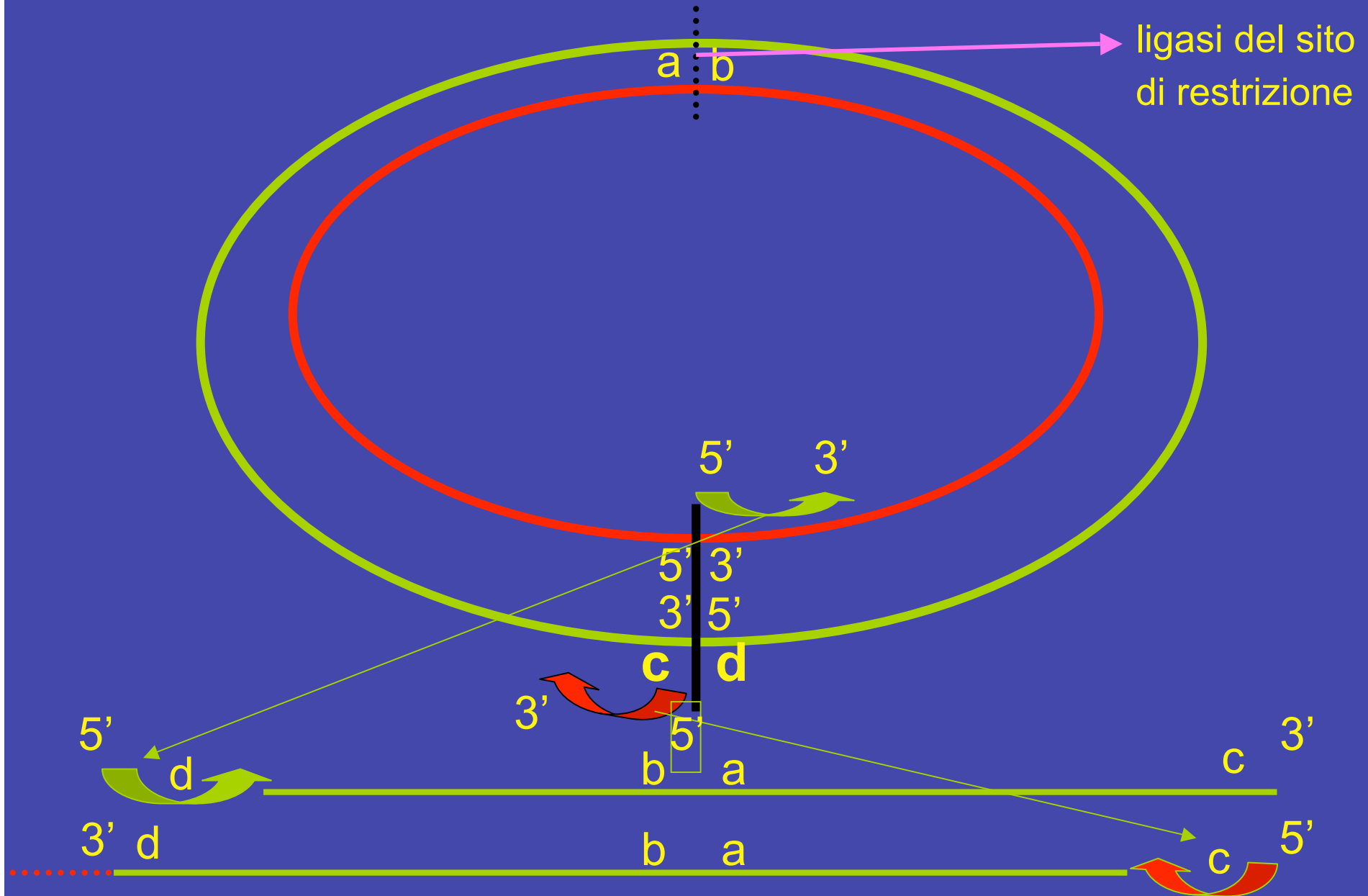
amplificazione di DNA genomico o clonato

al primo ciclo cosa si amplifica ?

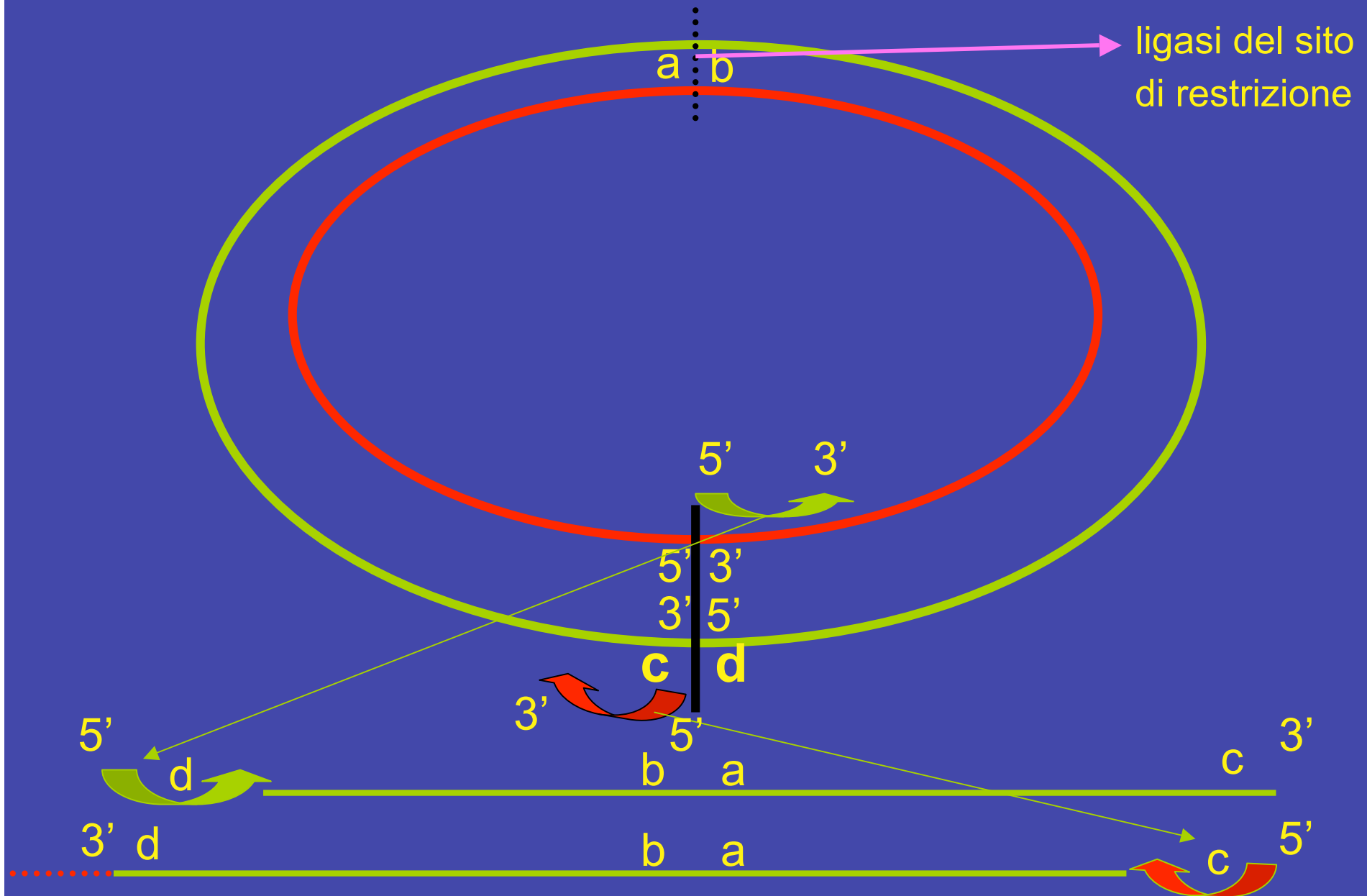
la Taq polimerase si ferma sull'amplicone ?



Orientamento primers PCR inversa



Orientamento primers PCR inversa



il prodotto di PCR è sempre
lineare

sia nella PCR diretta che inversa con un DNA circolare

provate a farvi uno schema!