

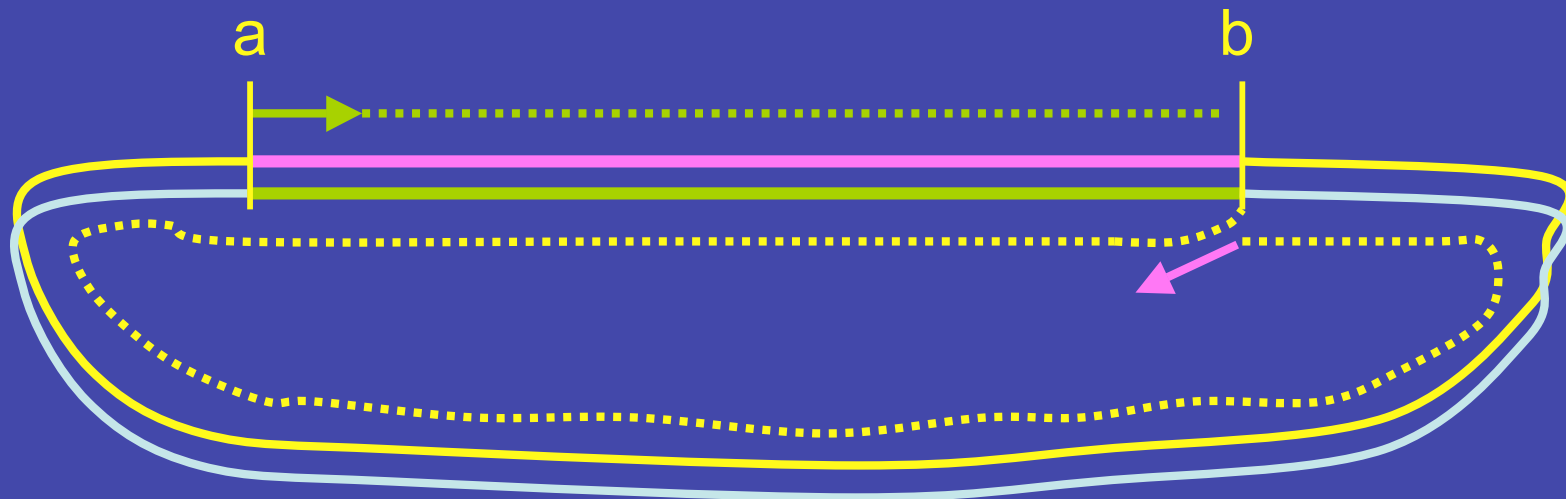
lezione 17 - 18

giovedì 8 aprile 2010

aula 2 ore 9:00

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

il prodotto di PCR è sempre lineare

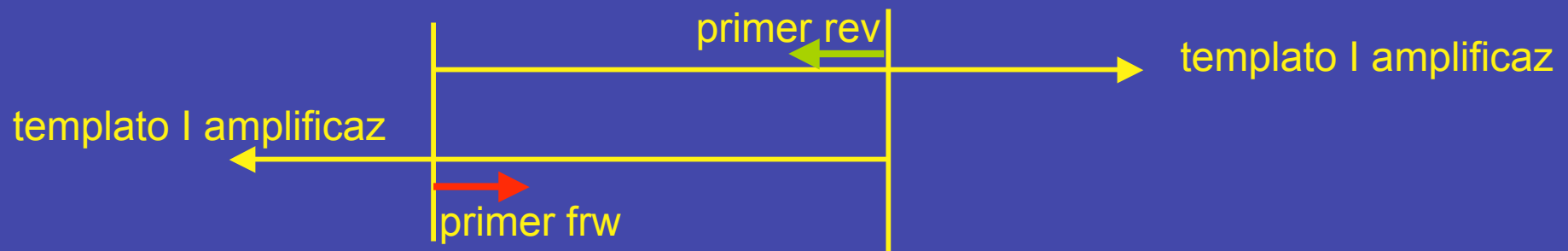


..... solo al primo ciclo il template è solo circolare; dal secondo ciclo abbiamo il template del primer reverse (viola) che inizia dal sito "b"; la stessa cosa vale per il primer forward (verde) che produce un template che inizia dal sito "a". Il template "a-b" cresce esponenzialmente, quello circolare ha sempre lo stesso numero di copie, rapporto che diminuisce a svantaggio della forma circolare

si amplifica solo l'amplicone

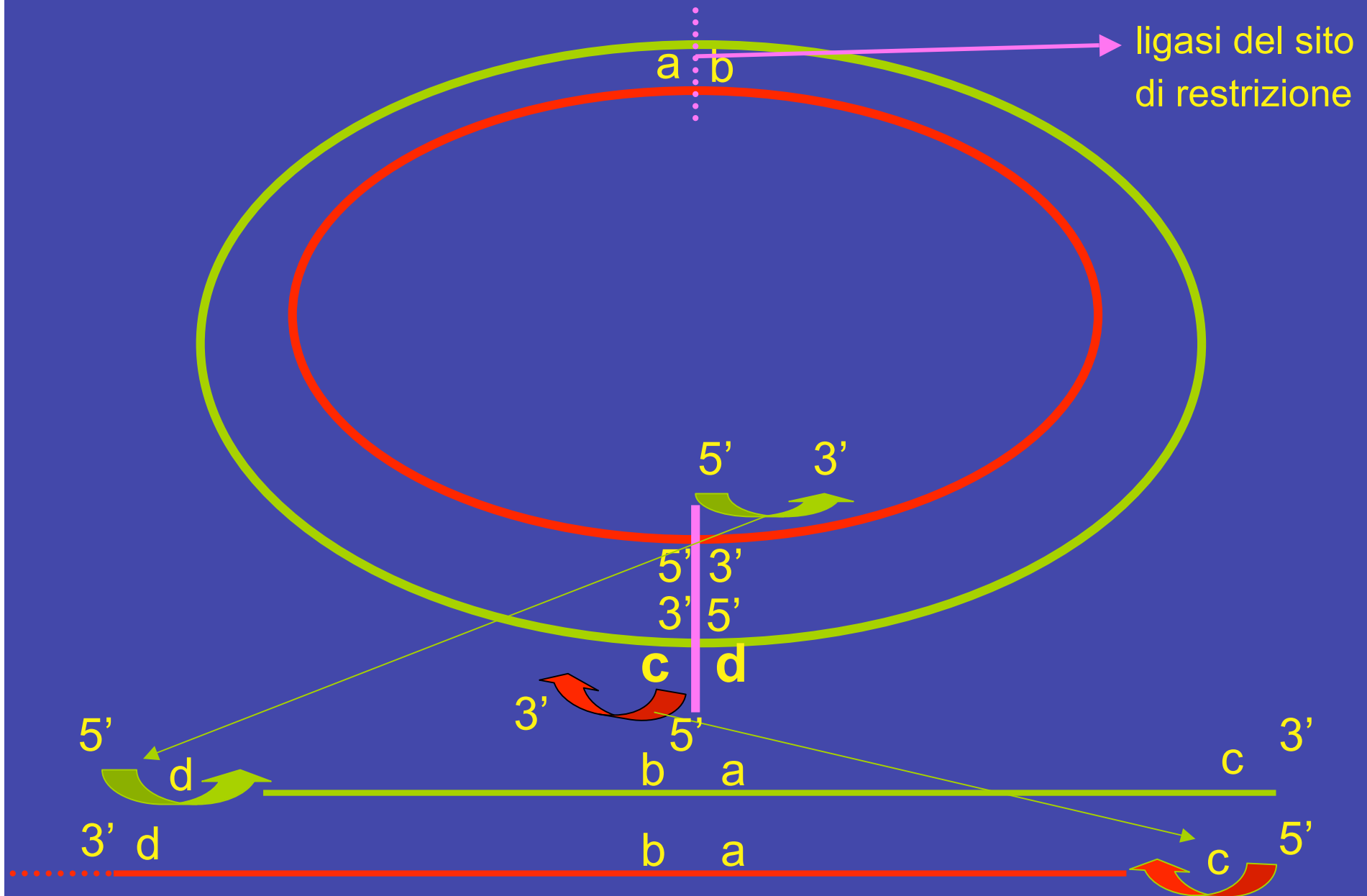


dal II ciclo compare il frammento con le estremità corrispondenti al 5' dei due primers:



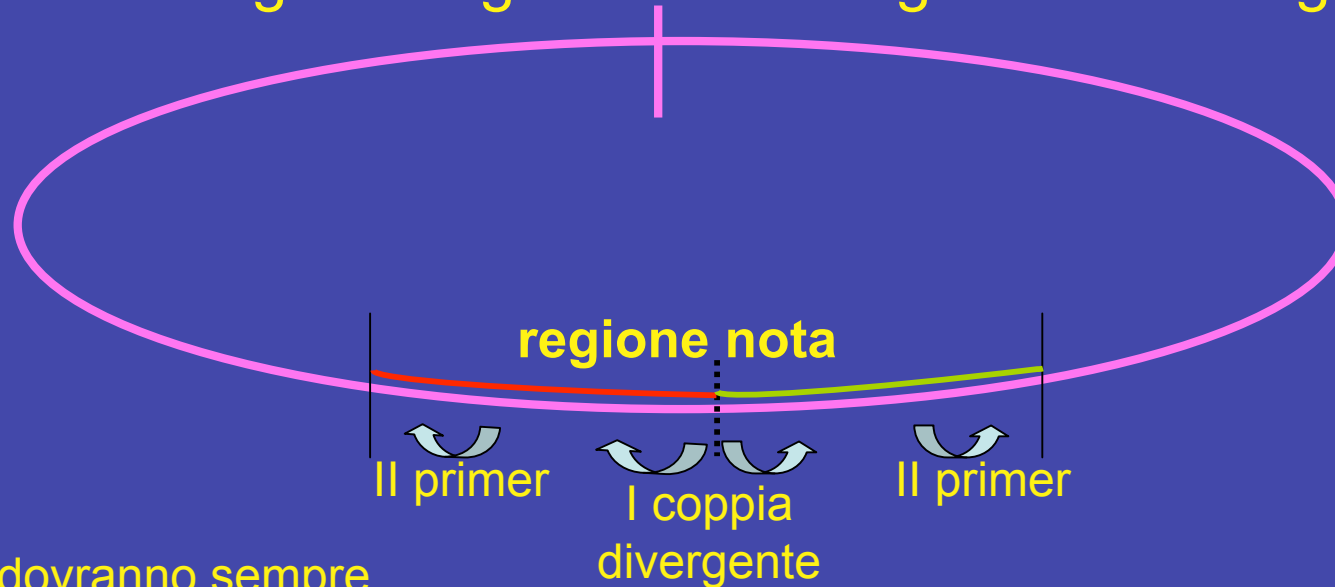
la polimerase non può proseguire perchè il template si interrompe al 5' dei primers da cui parte la sintesi

Orientamento primers PCR inversa



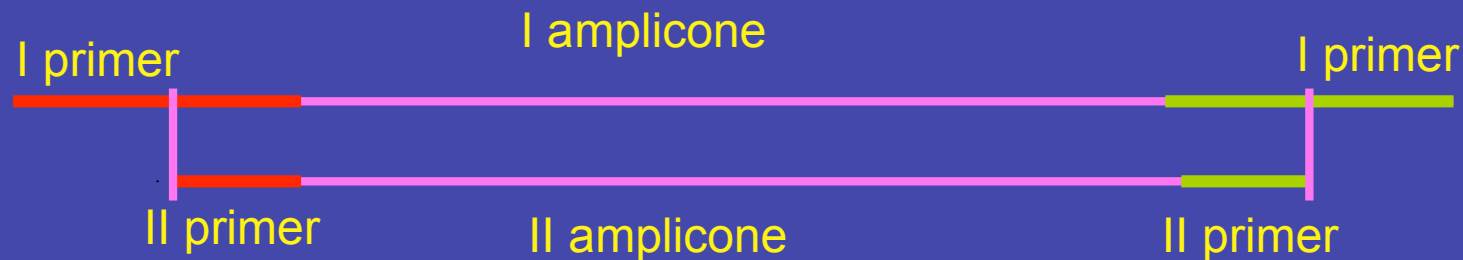
PCR nested per PCR inversa

estremità ignote digerite su DNA genomico e legate



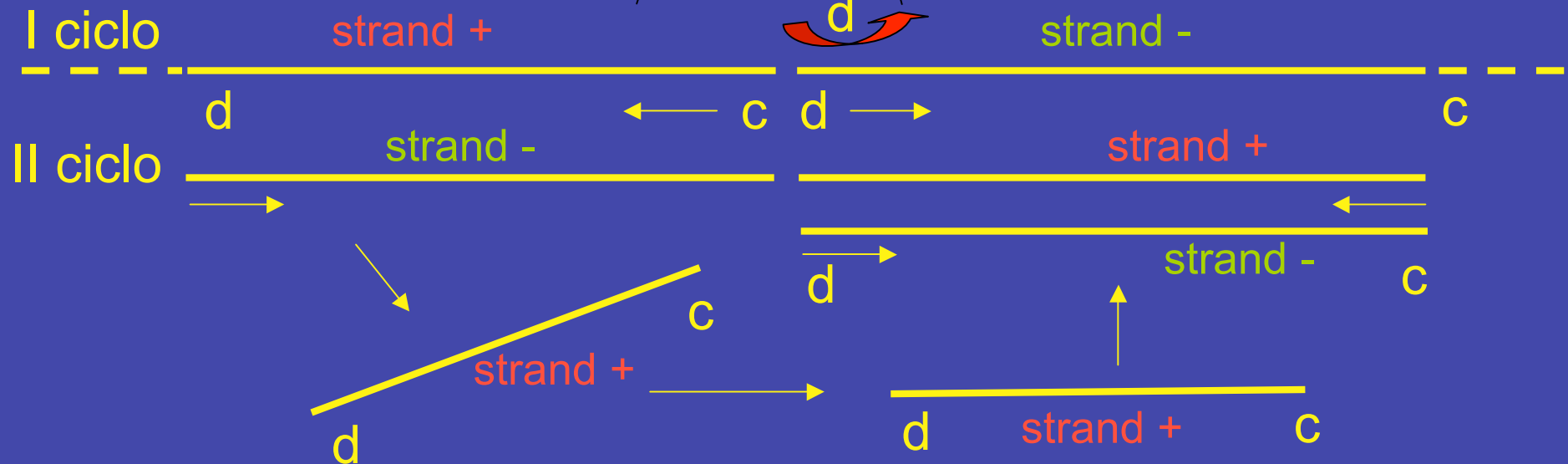
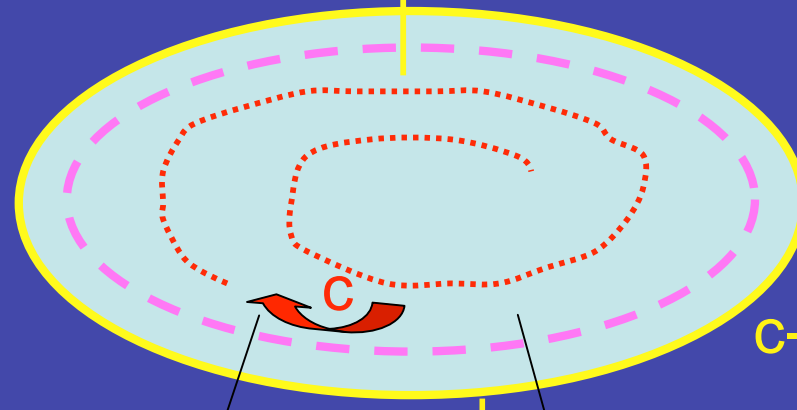
I primers dovranno sempre essere complementari ai due diversi filamenti

PCR nested quando si vuole ottenere maggiore specificità



Primo ciclo frgm + lungo

frammento di restriz legato



possibilità di concatenamento se la taq prosegue

altre applicazioni della PCR

variazioni sul tema PCR multiplex

AFLPs = amplified fragment length polymorphisms

SNPS, single nucleotides polymorphisms analysis

Screening di “libraries” in provetta con colture anziché su piastra

Pcr quantitativa e semiquantitativa competitiva

Real Time PCR abbreviata = RT- PCR da non confondere

ricostruzione di frammenti con PCR overlapping

criteri per PCR multiplex

I criteri principali sono la compatibilità dei primers:

- TM omogenea
- assenza di annealing spuri combinati tra coppie diverse
- assenza di annealing tra primers
- controllo delle amplificazioni desiderate

Le PCR Multiplex Vanno messe a punto e dosati i primers per ottenere quantità omogenee di amplificati osservabili su gel, con Real-Time o LC

Vantaggi: - risparmio di tempo e materiali;
- con una PCR se ne fanno molte, purchè si distinguano i prodotti

Che cosa e' un polimorfismo

La differenza tra una mutazione ed un polimorfismo e' data dalla frequenza di quella data mutazione nella popolazione.

Se la frequenza nella popolazione e' superiore della frequenza di mutazione spontanea si tratta di polimorfismo.

Due alleli di uno stesso gene sono gia' descritti per le leggi di Mendel, pero' un allele polimorfico e' presente in una data popolazione con una certa frequenza.

Mendel aveva selezionato dei ceppi puri omozigoti per alleli diversi di uno stesso gene, quindi non si puo' parlare di polimorfismo in quanto non sappiamo nella popolazione spontanea quali fossero le frequenze di quegli alleli. Sarebbero potuti essere anche mutanti (ma non e' rilevante ai fini delle leggi). In agricoltura si selezionano i ceppi o meglio i "cultivar" e le razze degli animali da allevamento per ottenere miglioramento nella resa del prodotto, semplificando il concetto, da questo e' nata la genetica quantitativa.

i polimorfismi

a cosa serve studiare i polimorfismi

stanno alla base dei fenomeni che conservano la variabilità delle specie

la variabilità essenziale contro effetti di “*inbreeding*”
per mantenere alta la “*fitness*”
per evitare “*genetic load*” o alta omozigosità

sono i marcatori genetici che servono per costruire mappe genetiche, per studiare la genetica di popolazioni

come si possono studiare i polimorfismi

sembrava un sogno poter studiare direttamente i polimorfismi sul DNA, inizialmente si studiava la variabilità di un enzima, non era possibile fare studi a livello genomico, praticamente erano studi mediati dalla biochimica (peso M, pH, funzionalità con colorazione del metabolita)

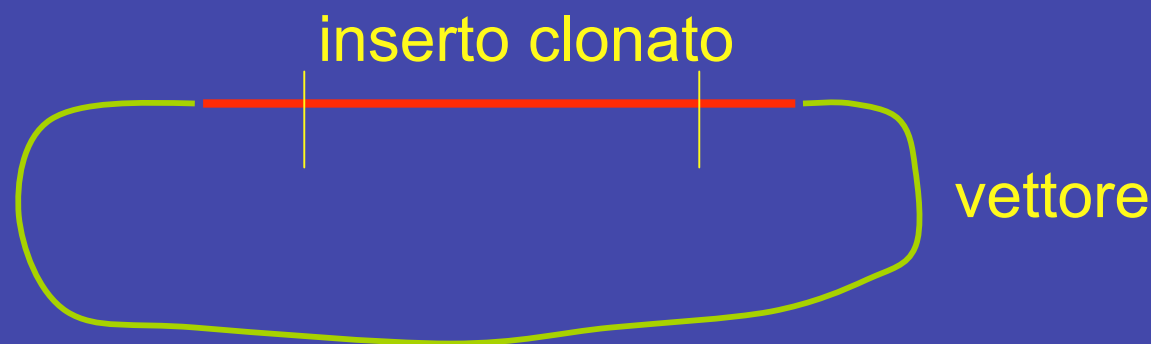
Con la tecnica Southern è stato possibile studiare la variazione dei siti di restrizione e cioè qualunque variazione che portasse alla alterazione della sequenza di “consensus”

niente dal punto di vista funzionale, è necessaria una sonda per poter fare l'ibridazione, i frammenti genomici venivano clonati e subclonati da libraries e con il walking

cosa è il genomic walking ?

pescare in una library genomica cloni con frammenti contigui,

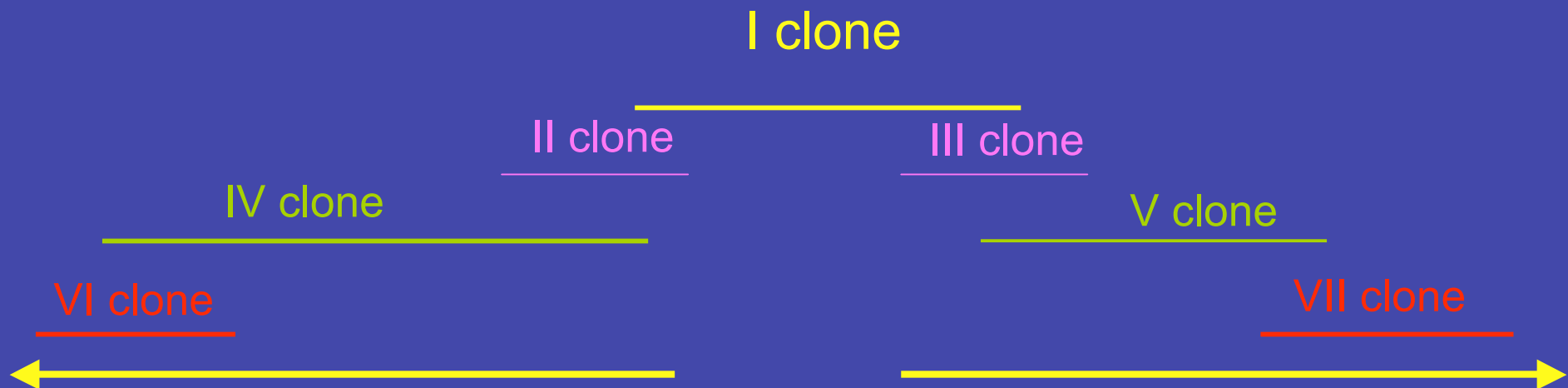
con una sonda (nota) si effettua il primo screening; il clone ottenuto si subclona e si mappa la regione estrema tramite southern (i frgm contigui al plasmide)



su Southern la sonda vettore (verde) identifica i frgm rossi dell'inserto : Il "step" si subclonano le estremità

Il passaggio (step = passo/scalino)

i frammenti subclonati si usano come sonde per uno screening successivo della library con successiva analisi Southern.



ecc.....step by step, walking !

si può utilizzare un sistema meno laborioso con PCR e sequenziamento

walking tramite PCR

- lo screening di libraries si può fare anche per PCR con diluizioni successive dei cloni della library escludendo le provette con cloni che non si amplificano e arrivando alla diluizione in cui è presente un unico clone,
- i primers sono quelli per il gene di interesse,
- i cloni sono rappresentati dal DNA plasmidico presente nei vari cloni della library

come si passa da un clone all'altro: invece che con il Southern si usa PCR con un primer sul vettore e l'altro sulla sequenza estrema del clone pescato le cui estremità vengono sequenziate

I polimorfismi si analizzano con PCR ?

Cosa sono i polimorfismi

A cosa può servire analizzarli

Cosa possono causare ?

Differenze funzionali ?

Perché non sono eliminati ?

Le mutazioni cosa causano ?

Se non sono negative o neutrali ?

Se sono neutrali possono non esserlo in condizioni diverse ?

i polimorfismi come marcatori genetici

per la genetica umana (e per gli animali da reddito) nelle analisi di linkage per trovare i geni responsabili di malattie genetiche

i polimorfismi possono corrispondere ad un diverso funzionamento del locus

negli studi genomici più recenti si cerca di tener conto della variabilità soggettiva individuale (p.es. diversa risposta ai farmaci)



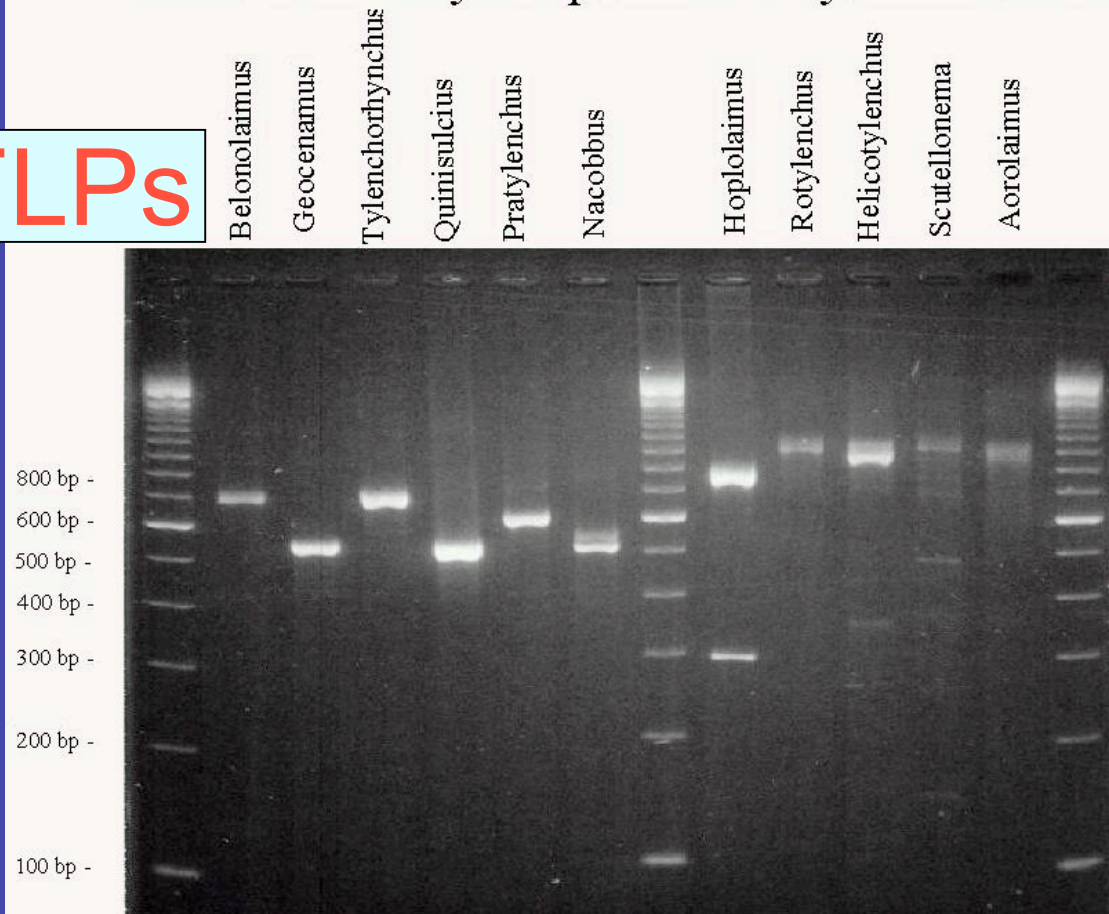
RFLPs

restriction fragment
length polymorphisms



Photo by Hori (2004)

ITS1 Size Polymorphism 11 Tylenchid Genera



Nematodi parassiti di piante
ITS internal transcribed spacer
di rRNA tra 18S e 5.8S

cosa determina i polimorfismi

i polimorfismi sono la prova dell'instabilità del genoma
derivano da mutazioni che si sono fissate nella popolazione
per i motivi più diversi

sono causa di diversità e motivo di diversa "fitness"

la variabilità permette l'adattamento ad ambienti diversi

ai cambiamenti di ambiente l'adattabilità è importante

la diversità intra-specie è vantaggiosa, genera eterozigosità
contro inbreeding e genetic load

i caratteri monofattoriali

come quelli di Mendel sono forse una minoranza

la maggior parte dei geni codifica per enzimi che interagiscono e partecipano con molti altri ad un fenotipo

ma contemporaneamente può partecipare a più pathways causando variazione su piani diversi

i polimorfismi influenzano creando una modulazione sulla efficienza/efficacia di un enzima, accelerando o rallentando l'effetto nel metabolismo coinvolto, nell'efficienza di trasmissione di un segnale o di legame per un effettore o di trasporto di un fattore

i polimorfismi sono di ogni tipo

trattandosi di mutazioni i polimorfismi possono essere di ogni tipo come le mutazioni, la limitazione è data dalla tollerabilità a livello fenotipico,

le più semplici ed abbondanti sono le mutazioni di singole basi nucleotidiche, (possono generare cambiamento di un sito di restrizione)

variazione del numero di ripetizioni tandem
e poi inserzioni e delezioni e a livello cromosomico,
tollerabili finché non provocano non disgiunzioni o altri problemi alle meiosi

AFLP Amplified restriction fragment length polymorphisms

Ogni genoma ha un certo numero di siti di restrizione per tipo di enzima di restrizione (dovuti al numero di copie di consensus che casualmente sono presenti in quel genoma). Si usano per analizzare la variabilità genetica e per fare tipizzazione:

- si digerisce il genoma e ci si legano degli adapters
- si disegnano dei primers che contengono l'adapter ed una sequenza random al 3' con due, tre, quattro, cinque, sei... nucleotidi secondo quanto si vuole essere selettivi; da migliaia di frammenti si passa a meno di cento
- Gli oligonucleotidi verso il 3' oltre l'adapter possono contenere solo certi nucleotidi e allora sono piu' selettivi e diminuiscono il numero di frammenti specifici rendendo il pattern piu' semplice da analizzare.