

lezione 19 - 20

martedì 13 aprile 2010

aula 2 ore 9:00

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

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.

A cosa servono gli AFLP

Gli AFLP servono per fare una tipizzazione di genomi di specie diverse, razze, individui polimorfici.

Quanto piu' sono specifici i primers nella sequenza oltre il sito di restrizione e tanti meno frammenti si amplificano.

A seconda del numero ottimale che si sceglie si deve usare un metodo di rilevazione piu' fine che separa piu' bande: concentrazione e lunghezza del gel.

Il numero ottimale scelto di solito e' di circa 100 bande ed il tipo di selezione cambia col tipo di enzima di restrizione, di solito si usa un enzima che taglia molto (sito a 4 basi) per avere un range di frammenti abbastanza corti (range 100-1000 basi).

Questo metodo e' utilizzato per studiare la variabilita' genetica di una specie per analizzare la biodiversita' nel caso di inbreeding di sementi o di specie animali. Non interessa quale sia il sito o l'informazione genetica del locus, ma solo se è polimorfico.

da RFLPs ad AFLPs

con i polimorfismi di restrizione l'analisi era ristretta a pochi frammenti

gli AFLPs sono frammenti di restrizione random
se ne studiano secondo il metodo di analisi
generalmente gels di poliacrilamide

i frammenti studiati sono sempre di restrizione:
Amplified Fragment Length Polymorphisms

AFLP Amplified restriction fragment length polymorphisms

Ogni genoma ha un certo numero di siti di restrizione per tipo di enzima di restrizione

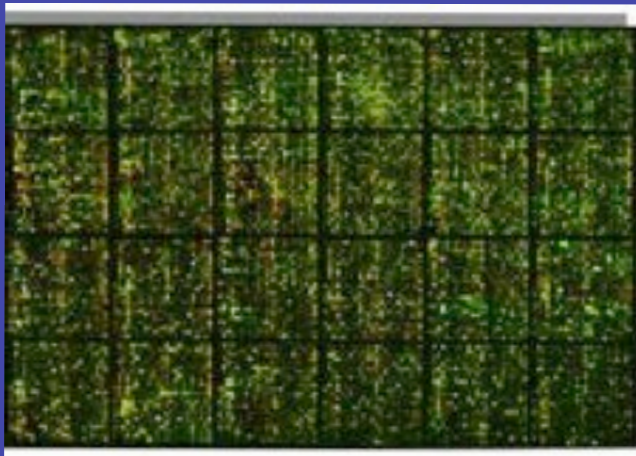
- si digerisce il genoma e ci si legano degli adapters
- si disegnano dei primers che contengono l'adapter ed una sequenza random al 3' con due, tre, quattro, cinque, sei... nucleotidi secondo quanto si vuole essere selettivi; da migliaia di frammenti si passa a meno di cento
- Gli oligonucleotidi verso 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.

Dagli RFLPs agli AFLPs

Nuovo metodo di studio dei polimorfismi con approccio globale genomico

Studio dei polimorfismi di frammenti di restrizione non conosciuti con amplificazione tramite PCR selettiva dei frammenti genomici

http://www.dea.gov/programs/forensicsci/microgram/journal071203/mj071203_pg7.html



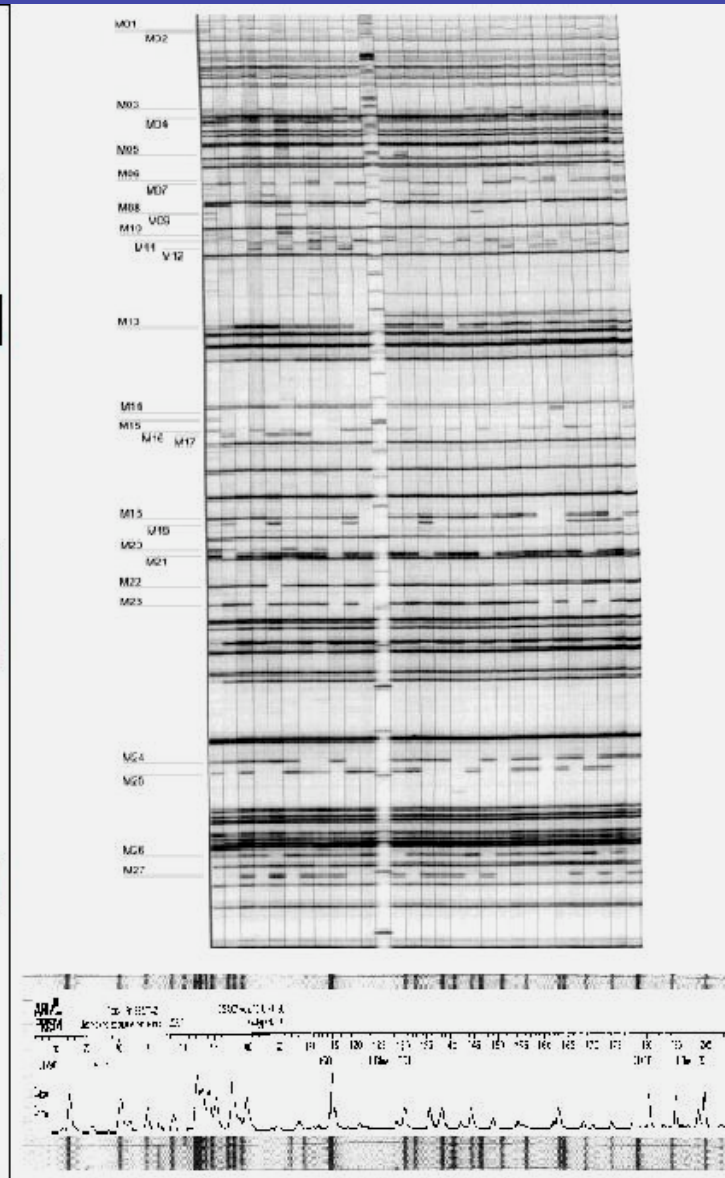
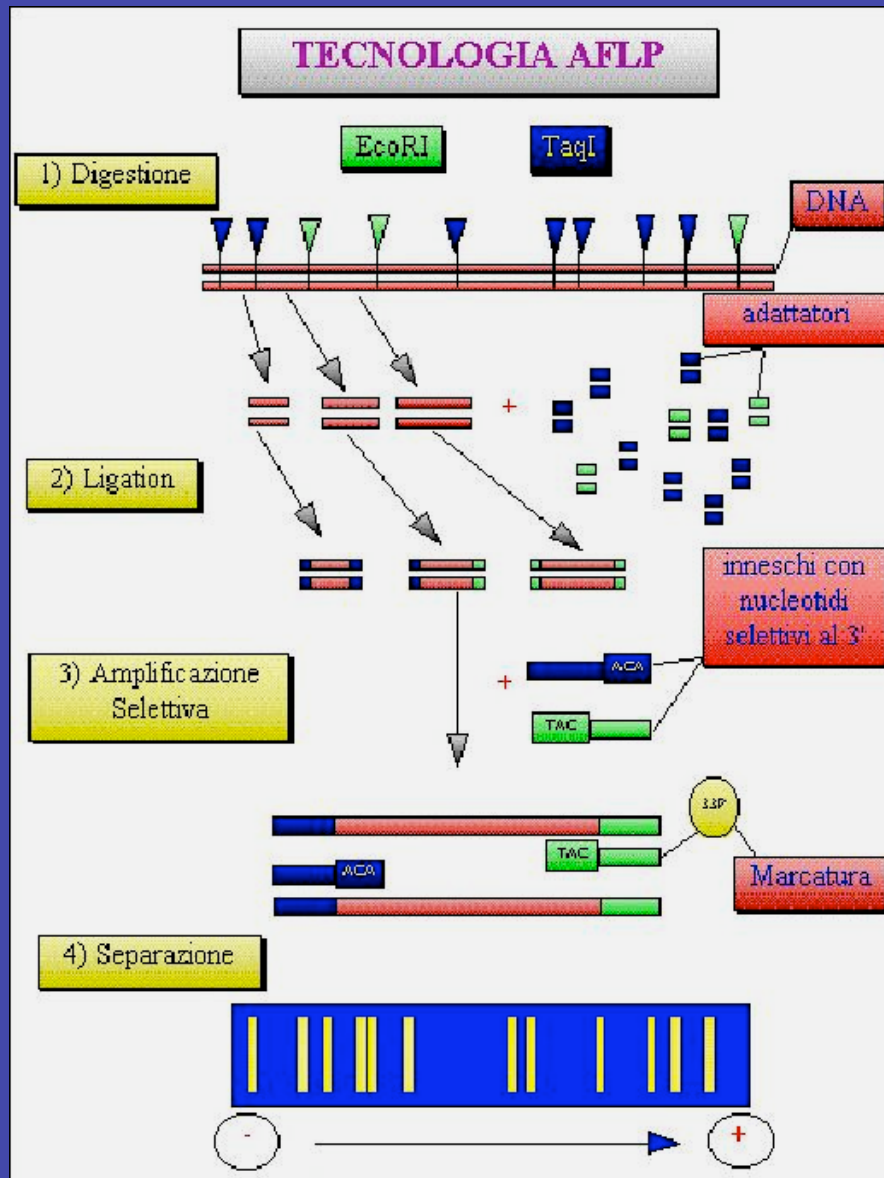
Approccio globale
con micro-cips

schema del metodo AFLPs

Principle of the AFLP Method

The AFLP® technique is based on the amplification of subsets of genomic restriction fragments using PCR. DNA is cut with restriction enzymes, and double-stranded (ds) adapters are ligated to the ends of the DNA-fragments to generate template DNA for amplification. The sequence of the adapters and the adjacent restriction site serve as primer binding sites for subsequent amplification of the restriction fragments. Selective nucleotides are included at the 3' ends of the PCR primers, which therefore can only prime DNA synthesis from a subset of the restriction sites. Only restriction fragments in which the nucleotides flanking the restriction site match the selective nucleotides will be amplified. (Vos, et al., 1995)

Polimorfismo dei frammenti di restrizione amplificati (AFLP)



Schema dei primers usati

AFLP polymorphisms



- Produzione in multiplex di 50-100 marcatori con un singolo esperimento.
- Produzione contemporanea di bande polimorfiche tra individui (DNA fingerprinting) e di monomorfiche entro e polimorfiche tra specie (identificazione di specie)
- Applicabili al genoma di qualsiasi specie senza bisogno di informazioni a priori sulle sequenze o di disponibilità di sonde

Fasi dell'esperimento

- ! digestione con Eco RI del genoma in analisi
- !! digestione della I reazione con Taq I (o altro enzima)
- !!! ligasi con la miscela dei due adattatori
- !!!! preamplificazione senza marcatura
- !!!!! amplificazione con primers marcati
- !!!!!! corsa su gel di acrilamide 4,5%
- !!!!!!! rivelazione con autoradiografia o elettroforesi capillare

in alternativa corsa elettroforetica capillare con fluorescenza

come sono scelti i primers

Core sequences for the primer sets (with selective nucleotides shown as N)

EcoRI 5'-GACTGCGTACCAAATTCNNN-3'

MseI 5'-GATGAGTCCTGAGTANNN-3'

PstI 5'-GACTGCGTACATGCAGNNN-3'

TaqI 5'-GACGATGAGTCCTGACCGNNN-3'

adapter - consensus sticky + 1/2/3 or 4 nucleotides that produces the stringency of the selective amplification

Adattatori e Primers

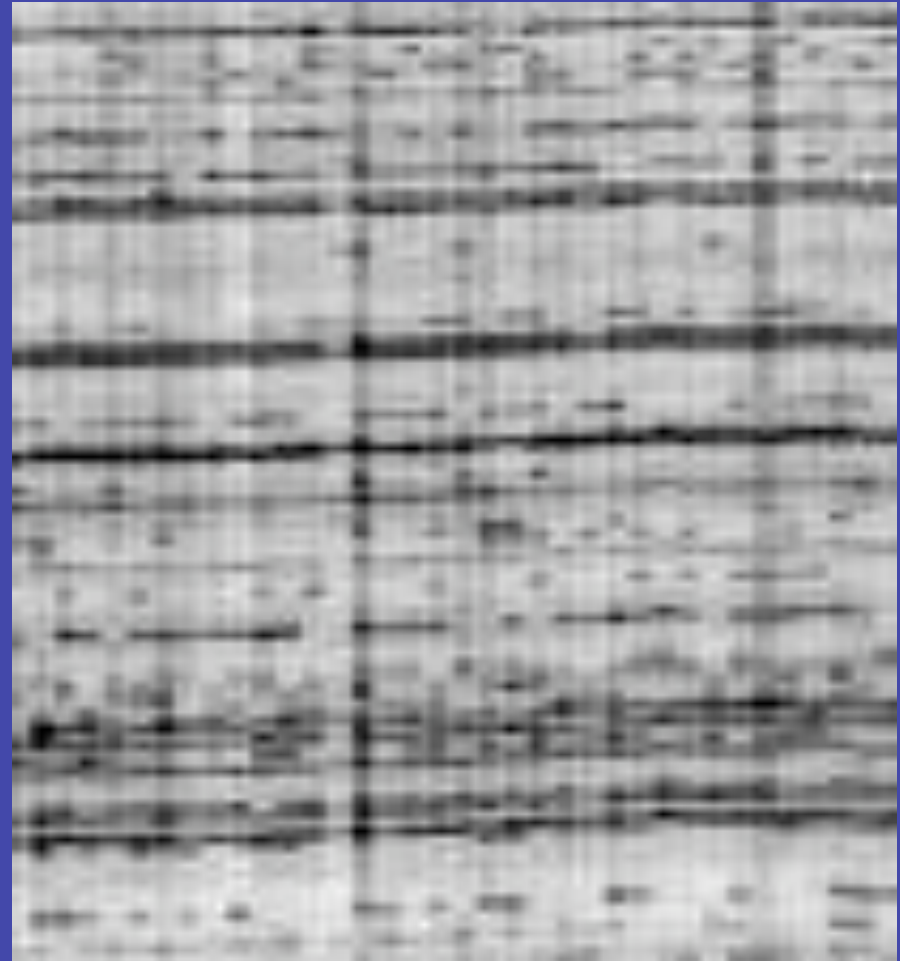
Adattatori secondo il metodo pubblicato da Pieter Vos et al. Nucl. Acid Res. 1995, 23 n.21, 4407-4414 e Paolo Ajmone-Marsan et al. Animal Genetics 1997, 28, 418-426.



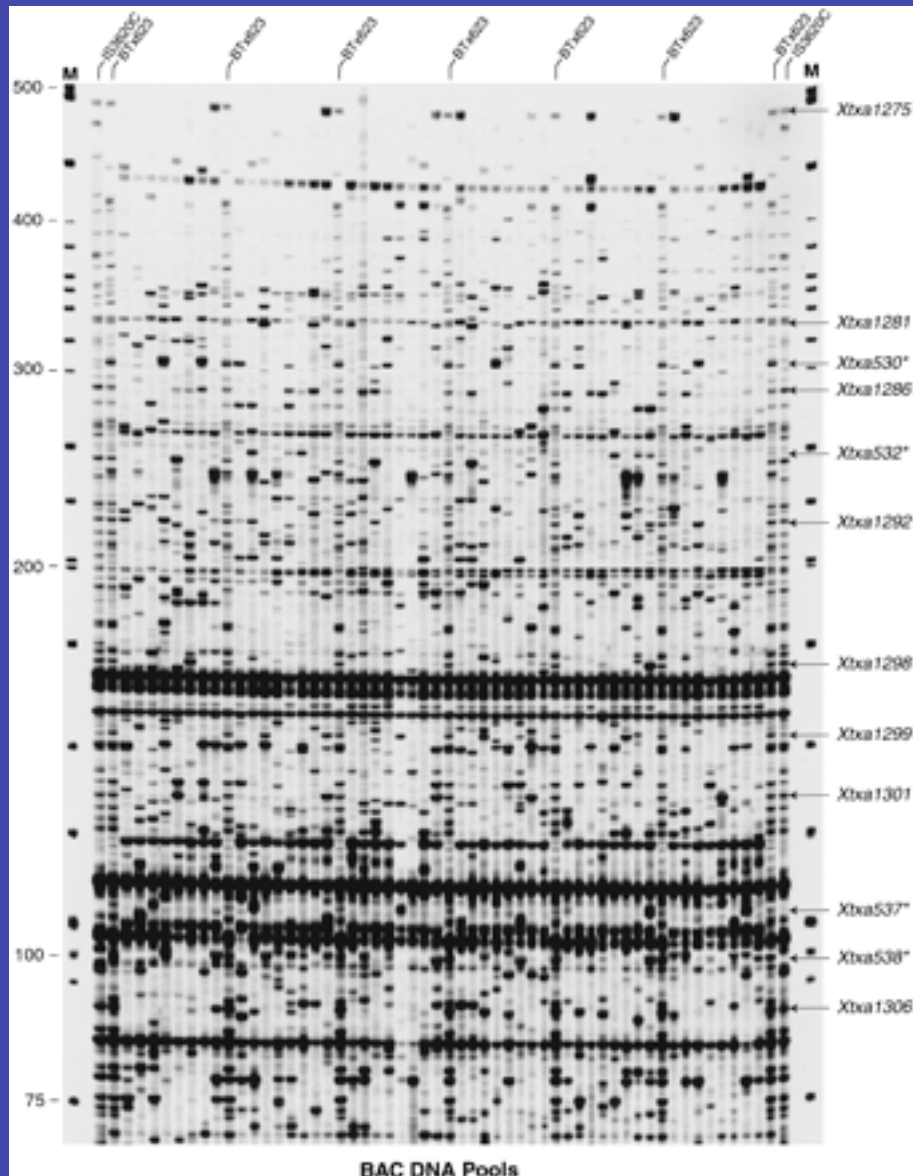
e terza combinazione con adattatori Eco e Taq sui frammenti tagliati regolarmente

Elettroforesi su acrilamide

Ogni lane è un soggetto
Il n. di bande presenti
costituisce il pattern allelico
Alcuni alleli sono molto
frequenti (strisce orizzontali)
possono caratterizzare la
razza animale



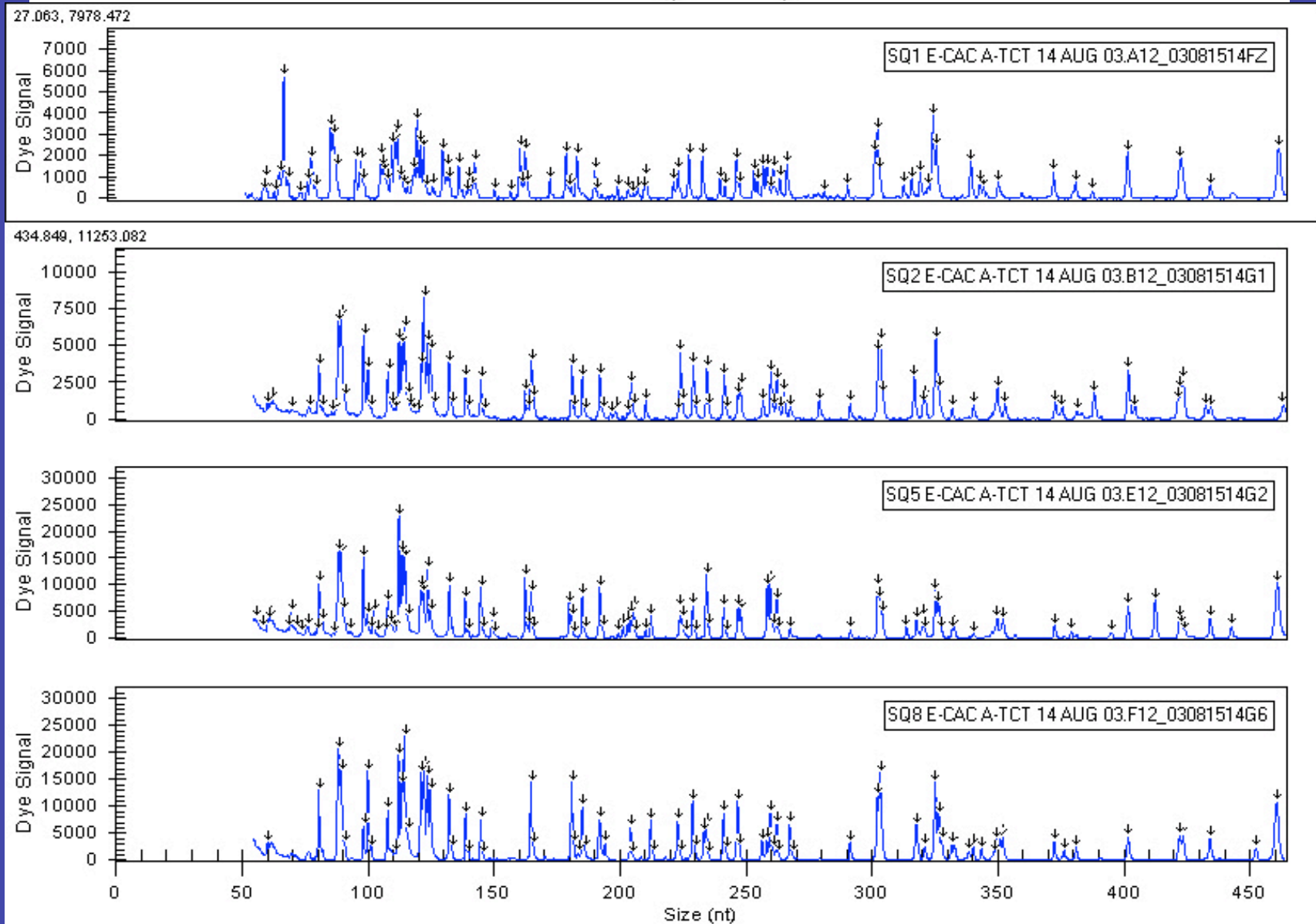
AFLPs gel acrilamide



PCR-based screening of BAC DNA pools for SAS-DNA markers using AFLP technology. AFLP templates were prepared from BAC DNA PP_s (1-32) and SP_s (1-16) and selectively amplified with fluorescent-labeled EcoRI + TGA and MseI + CGG. Labeled products were analyzed on a LI-COR DNA sequencer. AFLP template from genomic DNAs (IS3620C and BTx623) were run as controls and are indicated above the respective lanes. Arrows to the right of the gel show selected SAS DNA markers that were analyzed in the DNA pools. Asterisks to the right of a subset of the markers indicate those SAS DNAs that revealed polymorphisms between BTx623 and IS3620C and could be mapped as AFLPs on the sorghum genetic map. Fluorescent-labeled molecular weight markers (LI-COR) were run in lanes marked M and their sizes (bp) are shown to the left of the gel.

Elettroforesi capillare

Size (Bases) →



Metodi rapidi di analisi dei polimorfismi

- A) amplificazioni con primers fluorescenti polim. single nucleotide appaiamento incompleto del primer fluor. al 3'. - ELISA
- B) incorporazione di dideoossi marcato corrispondente al nucleotide polimorfico fluor. al 3' - ELISA

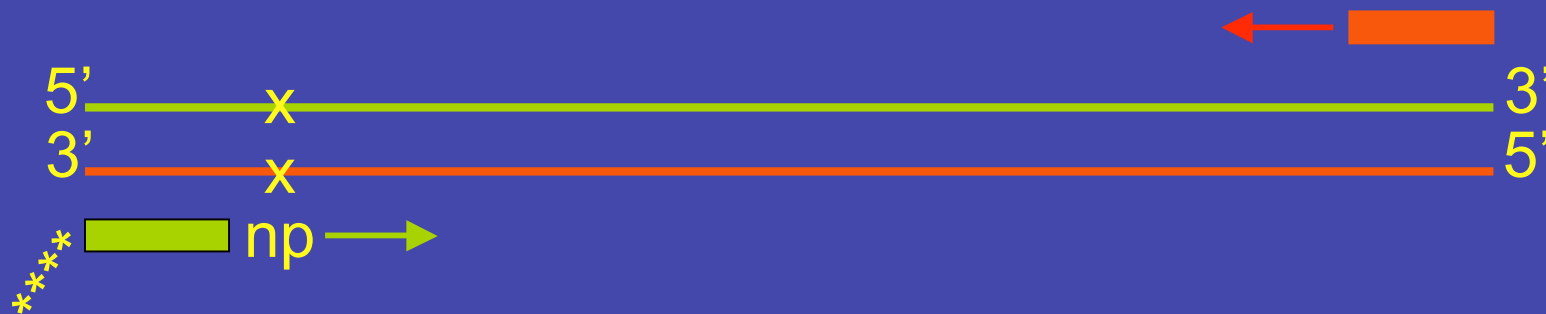
Analisi di restrizione dopo amplificazione PCR

Metodi con macchina “real time” che analizza l’incorporazione (stesso dell’analisi ELISA):

stesso tipo di analisi A e B non “end point” e quantitativa
non c’è bisogno di purificazione dai primers
o dei dideoossi e di un lettore ELISA, basta la
macchina real-time

Primer + nucl.polimorf.- Incorporazione dideossi

1 primer fluorescente, l'ultimo nucleotide = polimorfismo SNP
appaiamento incompleto



Come sarà il controllo ?

Terminazione elongation con dideossi fluorescente 1 colore
per nucleotide



Che controllo si farà ?

controlli

1 controllo positivo-negativo ed eterozigote

- sia per l'amplificazione con il nucleotide al 3' polimorfico

- sia per l'incorporazione del dideossi marcato al nucleotide polimorfico

Metodo real time

Differenza con PCR standard “end point”

“end point” si intende reazione a termine

Analisi dell'amplificazione in tempo reale dal superamento della soglia background (threshold = t_c°)

Tramite fluorescenza dei prodotti amplificati

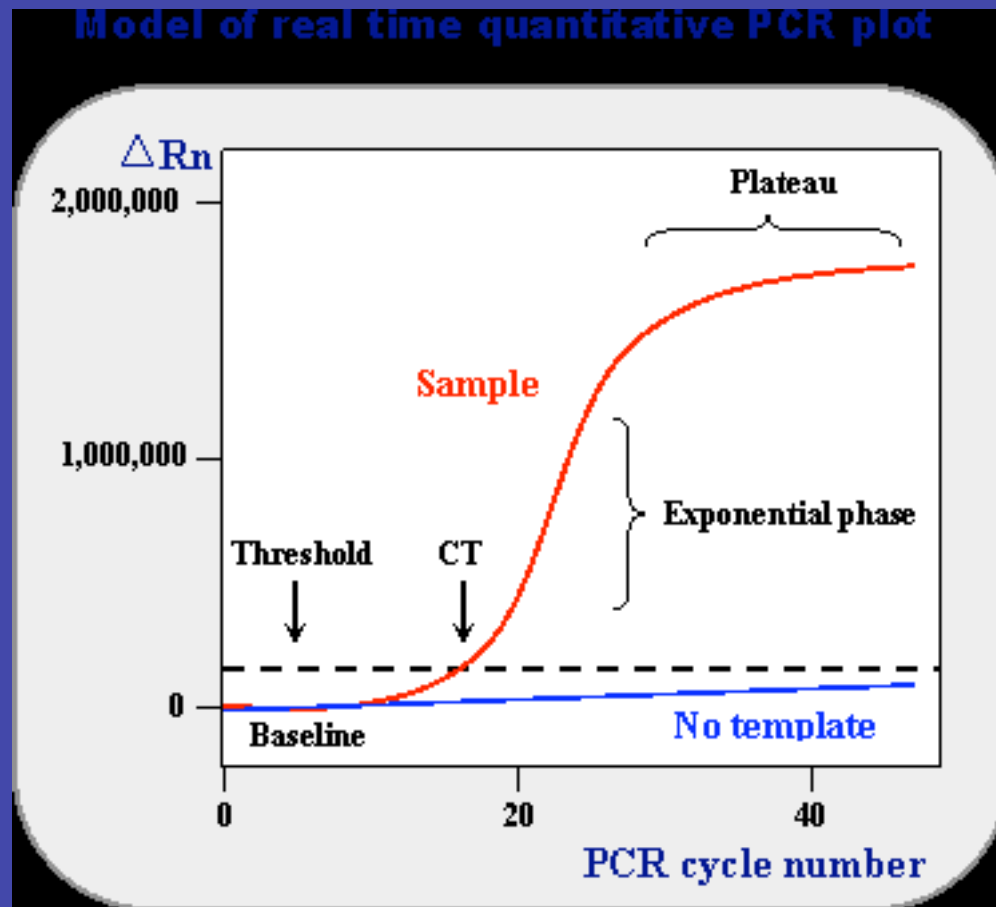
Colorante fluorescente del DNA intercalante CYBRgreen

Marcatura dei primers o doppia sonda:

“FRET”; “TaqMan”; “amplifluor”

schematica del sistema

model of real time quntitative PCR plot



ct = cycle threshold

Principio del funzionamento real-time

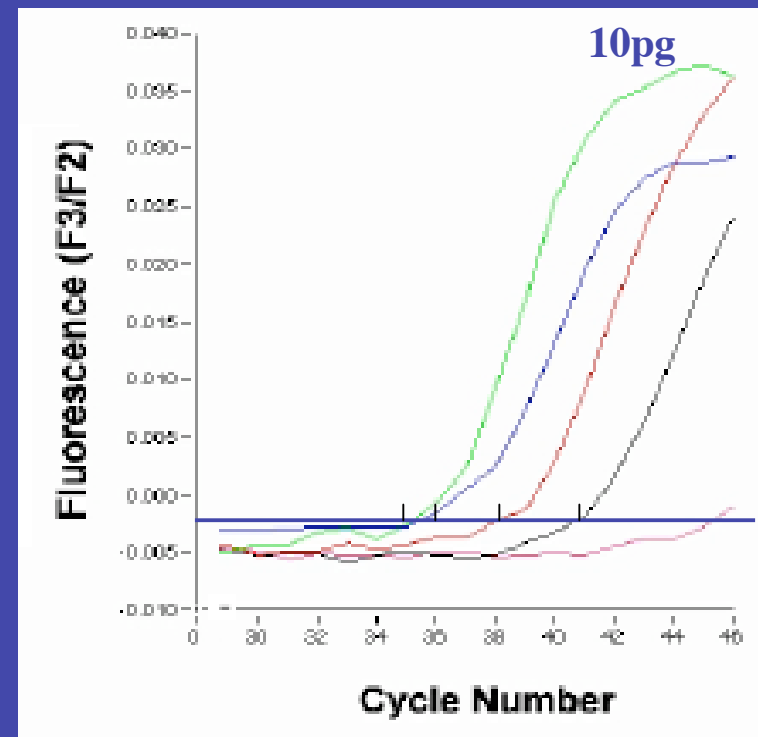
Analisi dell'amplificazione ad ogni ciclo
lettura laser della fluorescenza (qualunque metodo)

Soglia di superamento rumore di fondo

Inizio crescita log macchina
tra 35-40 cicli

Curva sigmoide
Effetto inibiz.

determinazione
di sensibilità
del metodo



1pg

5pg

0.5pg

no DNA

ct

crescita logaritmica

2-4-8-16-32-64-128-256-512-1024-

10-20-40-80-160-320-640-1280-2560-5120

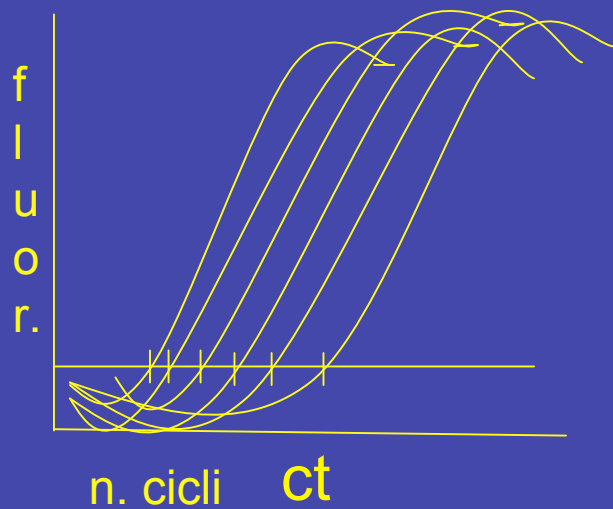
in 10 cicli da 2 ng a 1 microgrammo

da 10 ng a 5 microgrammi

} “teorici”

1 log per ~3.3 cicli

Crescita a esponente 2 ogni tre,tre cicli 10 x incremento



Intercetta col “cut off” background =
punto inizio log phase determinabile

La conc. Misurata con una curva standard
di riferimento $x =$ condizioni

Ascissa n. cicli / ordinata fluorescenza

PCR quantitativa

Come si può quantificare ? Si possono determinare dei valori assoluti ?

Che metodologie si possono utilizzare ?

- PCR classica chiamata “end point” o terminale o meglio di fine* reazione (fine* inteso come finale senza giustificazione dei mezzi).

- analisi dell'amplicone dopo i cicli di fine* reazione, gel elettroforesi colorazione con Bromuro di Etidio o Cybrsafe (intercalante fluorescente del DNA, si rileva con UV) quantificazione comparativa, relativa.

- PCR “real time” o “light cycler” automatizzata con lettura del prodotto della PCR direttamente durante i cicli di amplificazione tramite lettura laser della fluorescenza corrispondente alla quantità di DNA prodotto.