

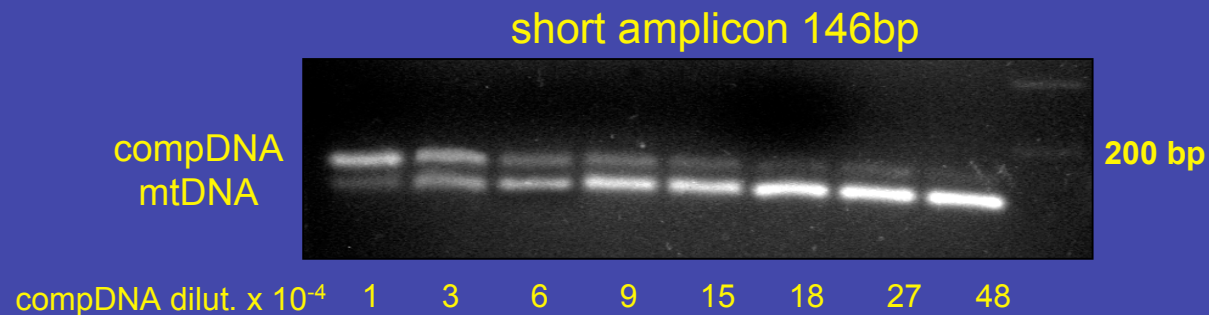
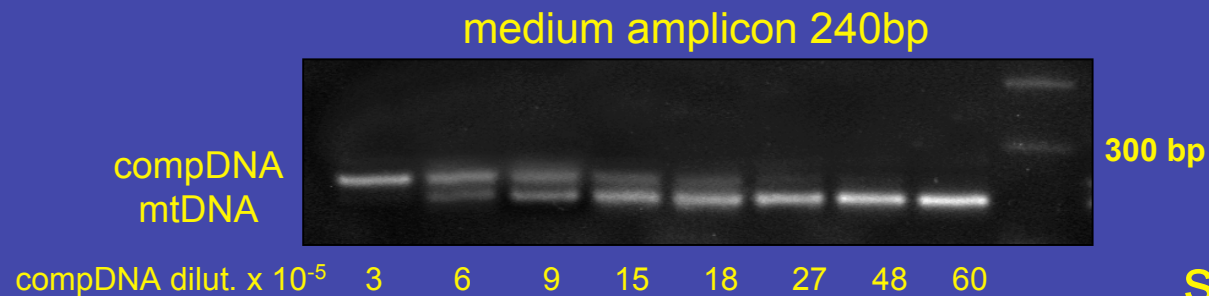
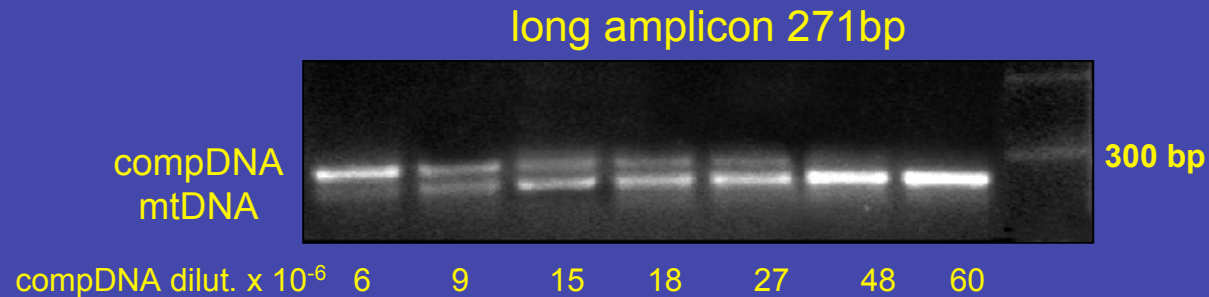
Lezione 25 - 26

Giovedì 22 Aprile 2010

corso integrato di Biologia Applicata BU
e Ingegneria Genetica BCM

Venerdì 21 Maggio ore 11:00 aula 18
la Professoressa Francesca Dalpero terrà la lezione
sul metodo 454 shot-gun sequencing

gel PCR competitiva end point



Confronta le
concentrazioni del
competitore nei tre
diversi esempi.
Come si interpreta?

si tratta di PCR nested

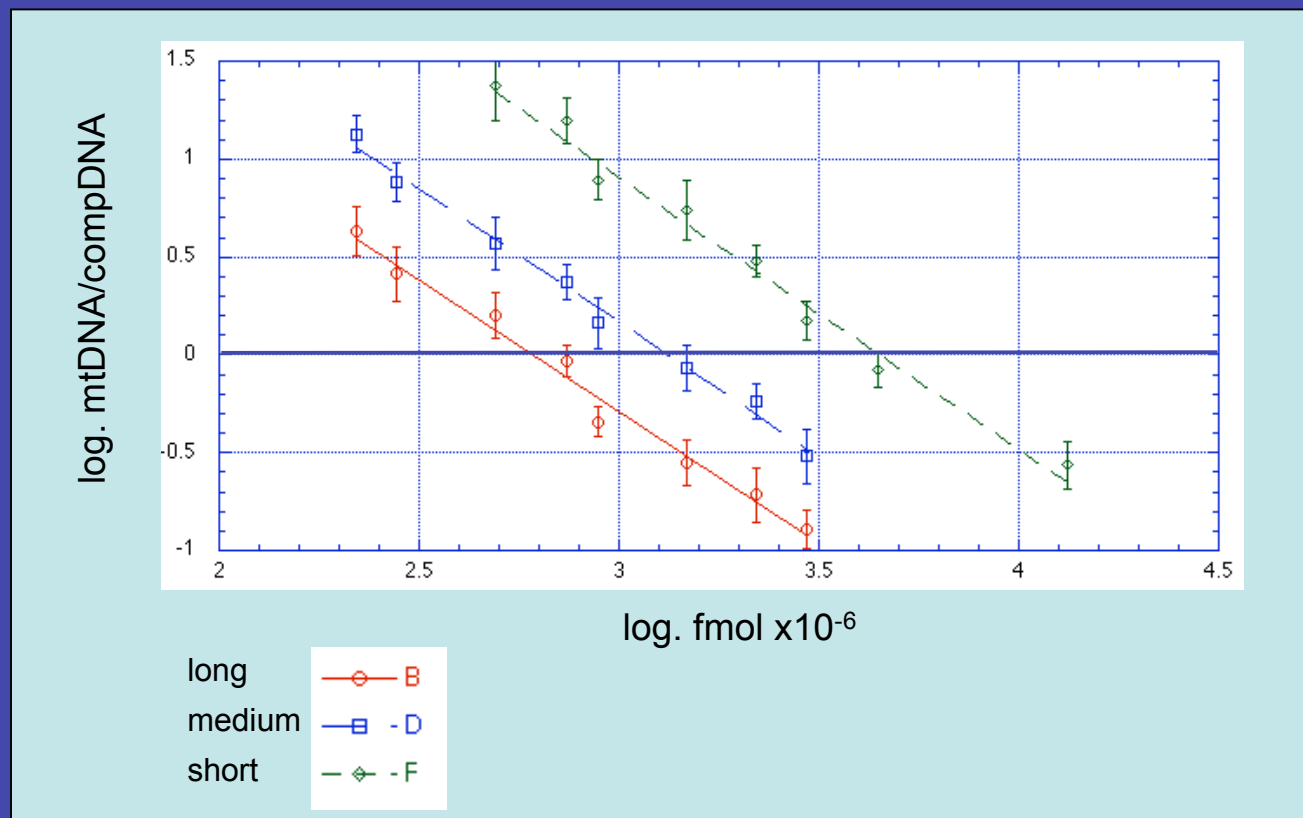
Come mai cambia il peso
anche del competitore ?

Plot valori di fluorescenza gel PCR competitiva

Come si ottengono i valori:

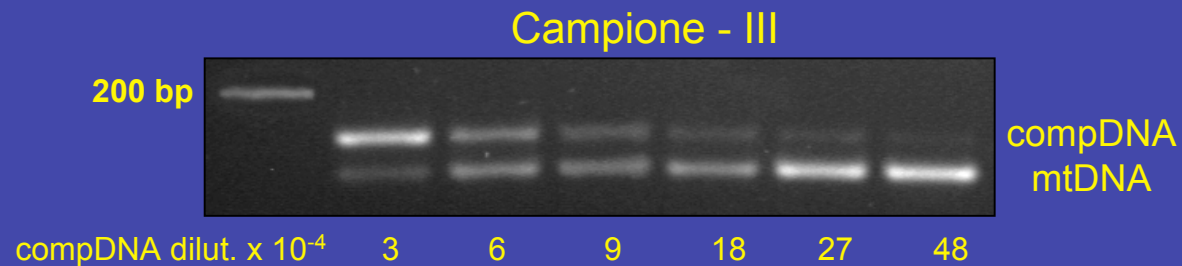
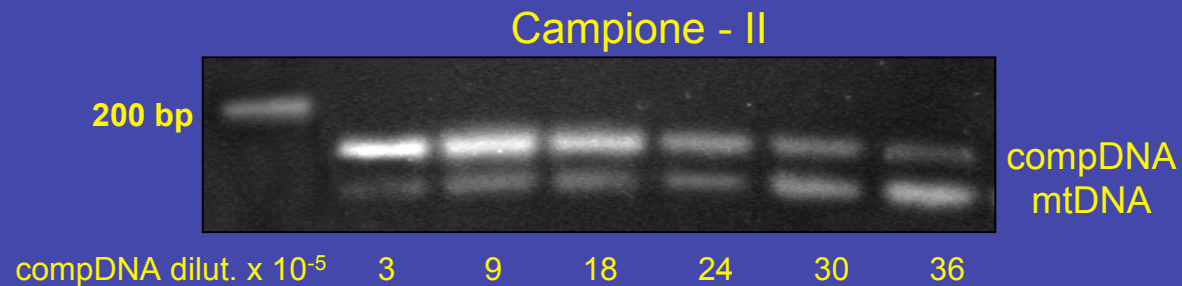
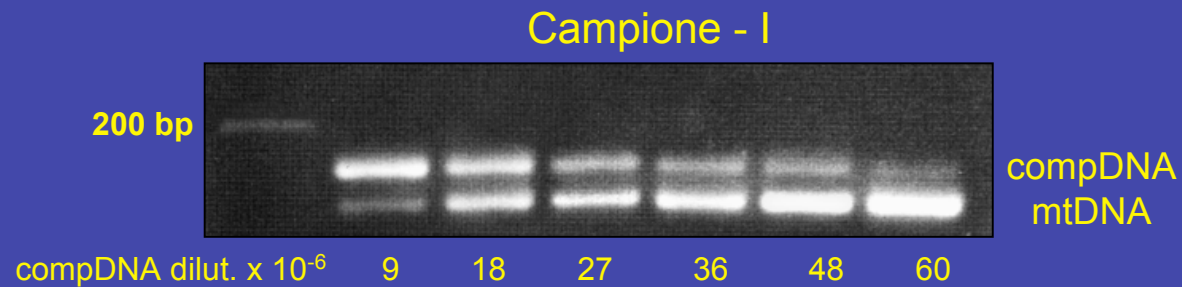
ascissa = log conc in peso

ordinata = log rapporto fluoresc corretto



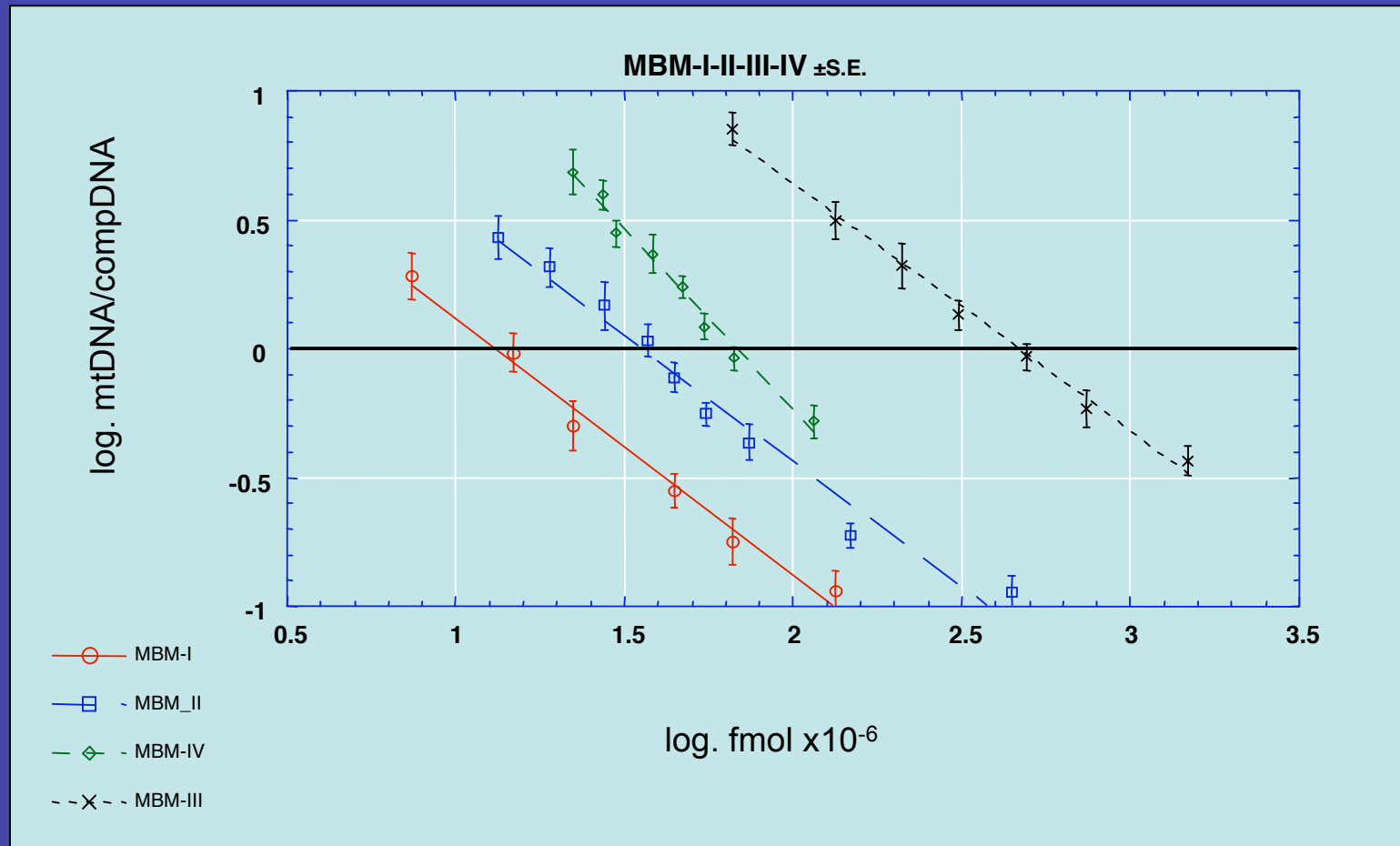
gel di PCR competitiva Il caso

amplicone primers 146 bp



Confronta le concentrazioni del competitore nei tre esempi. Come si può spiegare ?

Plot valori del II esempio



La concentrazione del competitore è stata determinata per
assorbanza allo spettrofotometro a 260 nm lunghezza d'onda,
1 OD a 260 nm = 50 γ DNA / ml; γ = microgrammi

Determinazione dei valori

Analisi del gel PCR “end point” con transilluminatore ad UV

- ogni banda letta con telecamera per luminanza
- si determina l'area di una singola banda e si riporta su tutte le bande.
- si sottrae dalla luminanza di ogni singola banda la luminanza di una regione uguale ma senza DNA per determinare il valore di sottofondo (background che non è underground).
- si normalizza il valore della fluorescenza per la lunghezza del frammento dovuto al fatto che il competitore è più lungo dell'amplicone w.t. (si fa una proporzione)
- la fluorescenza è data da un intercalante e quindi a parità di concentrazione è proporzionale alla lunghezza del frammento,
- il competitore più lungo del frammento da quantificare avrà anche maggiore fluorescenza a parità di molecole.

determinazione dei valori II

dopo i valori di fluorescenza di ogni singola banda

- determinare rapporto tra i valori del DNA dell'amplicone wt (in questo caso mtDNA bovino) e del competitore.
- frazione maggiore o minore di 1 se il mtDNA > competitore.
- il punto di uguale luminanza tra i due DNA avrà il rapporto uguale ad 1.
- valore del rapporto dato come log in base 10 e quindi il punto di isomolarità (num. = denom.) sarà 0
- un numero sufficiente di valori di diluizione del competitore può determinare una retta che passerà per il valore 0 quando le diluizioni hanno il competitore con la concentrazione che si inverte rispetto al campione in analisi.
- $\text{comp} > \text{mtDNA}$ / $\text{comp} < \text{mtDNA}$

Cosa si deduce

Dal primo esempio che abbiamo fatto si può dedurre che un DNA estratto da una matrice trattata ad alta temperatura 120°C è parzialmente degradato. La lunghezza media dei frammenti di DNA è intorno ai 150 nucleotidi e infatti si amplifica circa 10 volte meno un amplicone di lunghezza di 240 paia di basi e ancora 10 volte meno con 270 bp.

Dal secondo esempio si deduce che le matrici trattate a temperatura crescente hanno un'amplificabilità diversa dovuta al trattamento termico. Tra 110°C , 120°C e 133°C la misura media dei frammenti di DNA scende in maniera tale per cui tra la temperatura più bassa e la più alta la conc di frammenti di 146 bp amplificabili è circa 100 volte maggiore.

limiti del metodo

Il limite di questo metodo:

- conc. bande visibili su gel,
- rischio saturazione del lettore a livello di luminanza,
- rischio sottovalutazione della concentrazione.

1! calibrazione reazione per ottenere un “range” di intervallo in cui i valori non vadano a saturazione.

2! diluizioni del competitore con l'inversione di quantità tra le concentrazioni del comp. con quelle del frammento wt.

3! la quantificazione non si può fare per estrapolazione, ma solo per interpolazione.

Per intenderci bisogna che la retta dei valori del log.del rapporto wt / comp. passi per il valore 0.

Organismi Transgenici

- Alterazione del genoma tramite tecniche di manipolazione del DNA
- Metodo diverso rispetto all'induzione di mutazioni
- Le mutazioni indotte avvengono in maniera random
- Prime prove di organismi transgenici :
inserzione di un elemento esogeno nel genoma
- Preparazione di costrutti adatti per essere attivi in genomi di origine diversa,

Nei genomi eucariotici non esistono unità autonome autoreplicanti come i plasmidi nei batteri. Perché?

Meiosi e mitosi vogliono strutture cromosomiche con centromero

OGM e organismi transgenici

modi di dire e luoghi comuni

confusioni mediatiche

un OGM è anche un batterio che ha subito mutagenesi o in cui abbiamo inserito un plasmide o un vettore di espressione

adesso i giornali chiamano OGM gli organismi vegetali trasformati o “ricombinanti” per un gene esogeno

organismi transgenici e topi trnsg.

le tecniche per ottenere organismi transgenici variano molto da organismo ad organismo

metodologia:

- trasfezione del vettore

- transiente o per integrazione - ricombinazione

- uso di cellule staminali, zigoti, embrioni,

trapianti (drafts)

sono pseudo ricombinanti o pseudo transgenici

non c'è mescolamento di genomi

le piante si innestano comunemente

piante da frutto usano l'innesto da centinaia di anni o più

da quando è stato possibile usare il DNA e clonarlo è uscita la tecnica del DNA ricombinante

il salto dai batteri (metà anni '60) ai mammiferi (topo, anni '80) ha fatto un grande scalpore

esempio dei topi transgenici

non abbiamo tempo per poter vedere le differenti tecniche usate nei vari organismi eucariotici

negli organismi eucariotici non si possono usare plasmidi o regioni autonome di replicazione, solo cromosomi

si deve ottenere un evento di ricombinazione del vettore nel genoma e rendere l'integrazione del DNA eterologo stabile

il vettore deve essere veicolato nell'organismo (trasfezione)

il vettore si deve esprimere se vogliamo un fenotipo

il vettore deve entrare nella linea germinale per avere la linea transgenica: sarà monoclonale?

Topi transgenici per espressione e knock-out

Inserzione random

Ricombinaz. omologa (cellule ES)

Embrioni tetraploidi

Costrutti con BAC

Mutanti condizionali

Espressione inducibile

Topi transgenici per inserzione random nel genoma

Primi topi transgenici solo di espressione di marcatori, geni eterologhi, sovrannumerari,

- iniezione diretta del DNA nella blastocisti
- inserzione in una o più copie nel genoma ospite,
- inizialmente un marcatore carrier per il colore del mantello come controllo della ricombinazione ed espressione

Metodologia di base

- organismo transgenico

Come si ottiene: trasfezione batterica come modello

Trasfettare cellule eucariotiche animali e vegetali col DNA

Tecnica del DNA ricombinante per i vettori

Cellule vegetali hanno anche la parete di cellulosa: metodi di trasfezione più complessi

Cellule animali hanno solo la membrana meno resistente

Tecniche di trasfezione diverse e con efficienze diverse

Necessità della tecnica adeguata per veicolare il DNA

Organismi Transgenici

La selezione tramite incroci produce organismi “innaturali” ?
come gli organismi transgenici? Innaturale = manipolato ?

- la trasmissione orizzontale di informazione genetica per via naturale esiste: es MIRs (mamm. interspersed regions)
SINE (short interspersed nucl. Elements) Vipera-Bovini

- pericolo (soprattutto in agricoltura) per il passaggio di geni esogeni in altre specie che ne sono privi (batteri simbiotici).

- i geni che si usano possono creare rischio?

- uso del criterio di cautela

Le stesse preoccupazioni sono state poste quando iniziarono i clonaggi nei plasmidi e poi con vettori di espressione usando batteri e resistenze ad antibiotici.

Sono nati i laboratori a contenimento negativo da cui non possono uscire batteri ricombinanti.

Organismi trangenici II

Dopo i procarioti è stato possibile fare organismi transgenici con organismi eucariotici.

- fattore limitante la tecnica adatta.
- manipolazione del DNA è sempre la stessa,
- cambia la veicolazione e stabilità nei genomi.
- non ci sono plasmidi nelle cellule degli organismi complessi.

L'integrazione in un genoma può creare dei problemi sia al frammento da integrare sia al genoma ospite. C'è stata e c'è una notevole differenza tra i modi di produrre organismi transgenici vegetali o animali.

Per alcuni organismi vegetali si possono usare con facilità dei trasposoni che facilitano l'integrazione nel genoma.

Per integrarsi un costrutto deve comunque ricombinare. Finché non erano note molte sequenze la ricombinazione era esclusa anche perché è un evento raro ($\approx 10^{-6}$)

Organismi transgenici III

Organismi modello transgenici: Drosophila, Coenorabditis el. ed il Topo e tra i vegetali Arabidopsis e Nicotiana.

- sono stati usati organismi modello già usati in genetica con sufficienti informazioni.
- per gli organismi vegetali: come veicolare il DNA attraverso le protezioni esterne come la parete di cellulosa,
- sono stati usati virus o batteri trasformanti o micro sfere di metalli pesanti (oro) come proiettili adsorbiti col DNA.
- negli animali le cellule sono più facilmente penetrabili
- l'uso dei virus come veicolo è il metodo più efficiente, i virus devono essere non infettivi e non ricombinare per ridare origine al virus "wild type" infettivo.

Nel topo la tecnica iniziale è stata quella di utilizzare la blastocisti che era già utilizzata dai biologi dello sviluppo. Il primo successo è stato ottenuto generando un topo chimerico.

Topi chimerici e transgenici

- un organismo transgenico deve avere trasformate le cellule della linea germinale oppure il nucleo dello zigote. Nel topo in cui è problematico intervenire sugli uni e sull'altro è stato utilizzata la blastocisti su cui già veniva fatta sperimentazione. La topolina da accoppiare viene trattata con estrogeni per far avvenire l'ovulazione e per avere un buon numero di blastocisti.

La blastocisti si riconosce più facilmente da uno zigote (annessi) e si riesce a trovare facilmente nell'utero di una topolina accoppiata poco prima. Dopo l'accoppiamento in poche ore si forma un tappo vaginale che è il segno dell'avvenuta fecondazione. I primi topi chimerici sono stati ottenuti iniettando direttamente il DNA nella blastocisti che lo riassorbe e con buona probabilità riesce a trasformare le cellule.

Dal chimerico al transgenico

Iniettando il DNA nella blastocisti qualche cellula potrà assorbire il DNA, ma non tutte e quindi si otterrà un topo chimerico in cui non tutti i tessuti hanno nel genoma il DNA iniettato (con un costrutto adatto per essere funzionale ed esprimersi, cioè un gene completo e più spesso artificiale, recante un promotore forte costitutivo come quello di un virus). Questo tipo di vettore se porta un gene per una resistenza ad un antibiotico non deve essere diffuso fuori dal laboratorio.

Tra i topi chimerici ci potrebbe essere quello che ha assorbito e ricombinato nella linea germinale e che può dare origine ad una linea transgenica. - un incrocio con un topo della linea isogenica per poter riconoscere eventualmente dal pelo se si è trasmesso il gene marcatore.

Quindi se si ottiene una F1 transgenica si reincrocerà sempre con topi isogenici a quelli utilizzati per fare il topo chimerico.

Si ottiene sempre un eterozigote! 1 allele resta wt!