

Lezione XLI-XLII

martedì 17-1-2012

corso di genomica

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

Esami 31- gennaio 2012

7- febbraio 2012

28 - febbraio 2012

D. Frezza

Esercitazione II

martedì 17-1-2012

Con il DNA estratto dalle cellule della mucosa buccale si fanno le amplificazioni dal DNA genomico per osservare i polimorfismi dell'enhancer hs1.2 della Regione Regolativa del cluster dei geni della catena pesante delle Ig.

Metodo PCR:

Come si fa la PCR, in cosa consiste

Reazione a Catena di Polimerizzazione RCP $\leftrightarrow$ PCR

- amplificazione tramite sintesi de-novo di nuovi filamenti di DNA da parte della DNA polimerasi di *Thermophilus aquaticus*
- definizione: reazione ad amplificazione esponenziale con un raddoppio teorico della quantità di DNA ad ogni ciclo di sintesi.

La DNA polimerasi di cosa ha bisogno ?

- del template denaturato a singolo filamento (forza replicativa?)
- dei primers (inneschi)
- dei nucleotidi per la sintesi
- del tampone
- del Magnesio

Tre fasi e tre temperature

1 denaturazione del DNA a 94°C

2 appaiamento (“annealing”) dei primers al ssDNA template, temperatura misurata sulla t° di denaturazione dei primers

3 temperatura ottimale di sintesi della Taq polimerase 72°C che eviti rinaturazione e amplificaz. aspecifiche

alla fine del ciclo prima si doveva riaggiungere la polimerasi

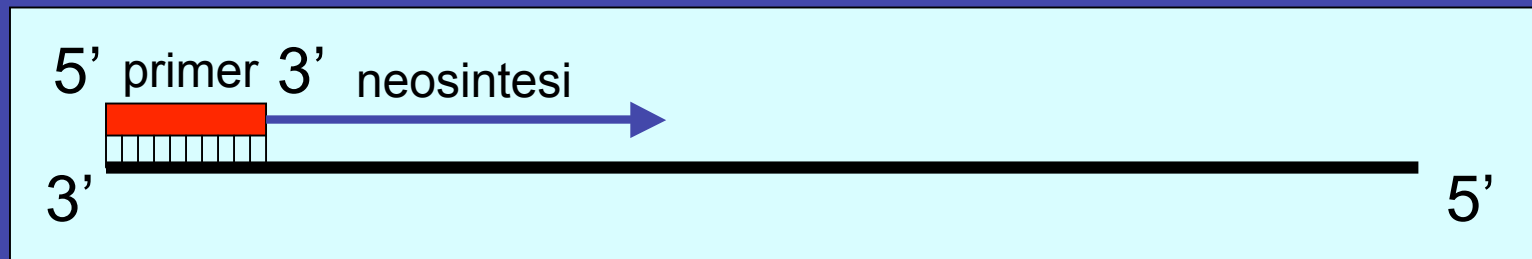
ogni fase del ciclo può durare da 30” ad 1’ o più minuti secondo la lunghezza del frammento da amplificare (oltre 1’ per più di 2 kb fino a 10’ per 10 kb)

applicazione del sistema naturale

la sintesi del DNA è semiconservativa (duplicazione)

le DNA polimerasi e anche le RNA pol sintetizzano tutte sullo stesso modello di funzionamento:

con il verso 5' - 3' su uno stampo (templato) antiparallelo 3'-5' partendo dal 3' libero di un innesco (primer) appaiato sul templato

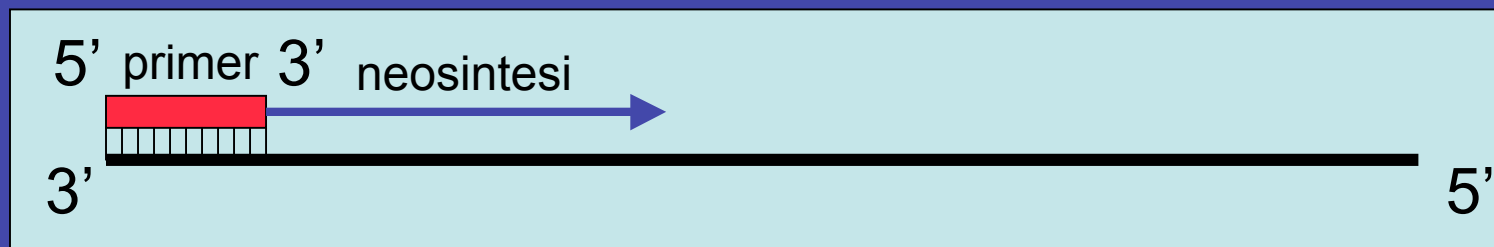


anche in vitro si può sfruttare il metodo naturale di sintesi

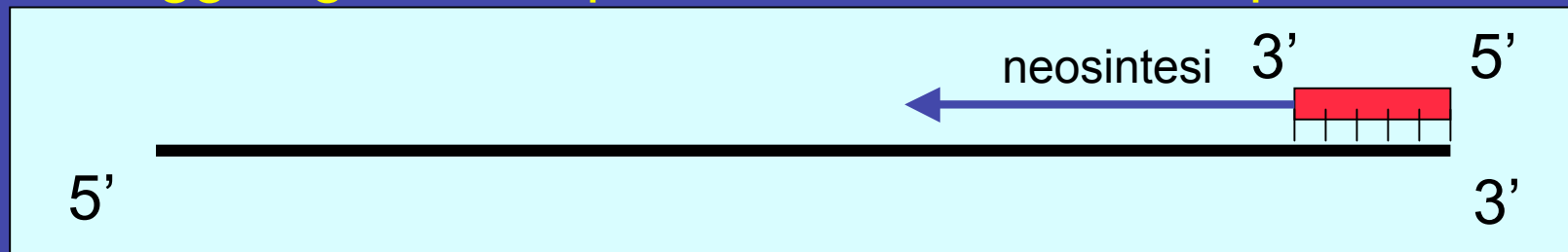
l'invenzione geniale

dalla amplificazione lineare a quella esponenziale:

la sintesi in vitro di DNA già era stata usata anche per le reazioni di sequenziamento, ma solo per una delle due eliche



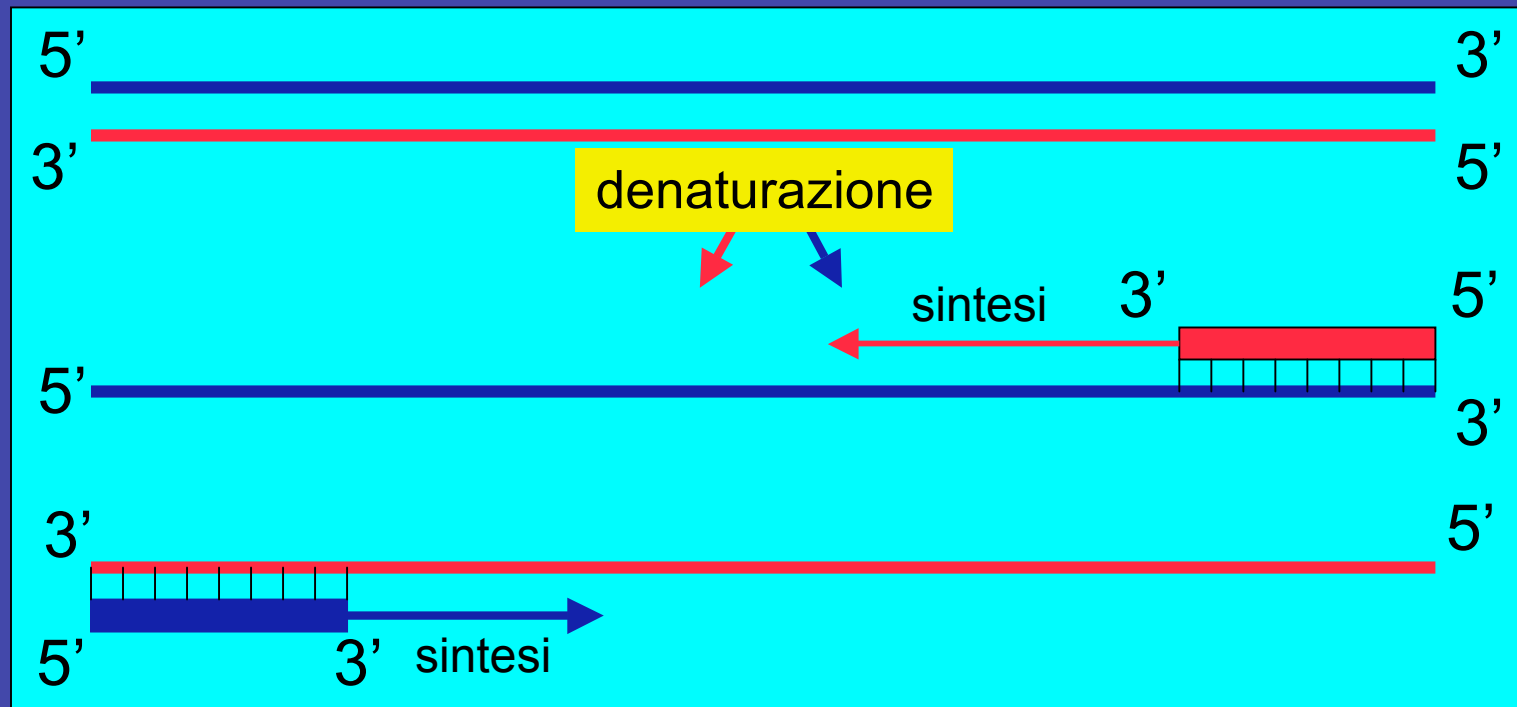
se aggiungiamo un primer sulla catena complementare:



otteniamo una amplificazione di tutte e due le eliche,
e poi ? se la reazione continua è esponenziale !

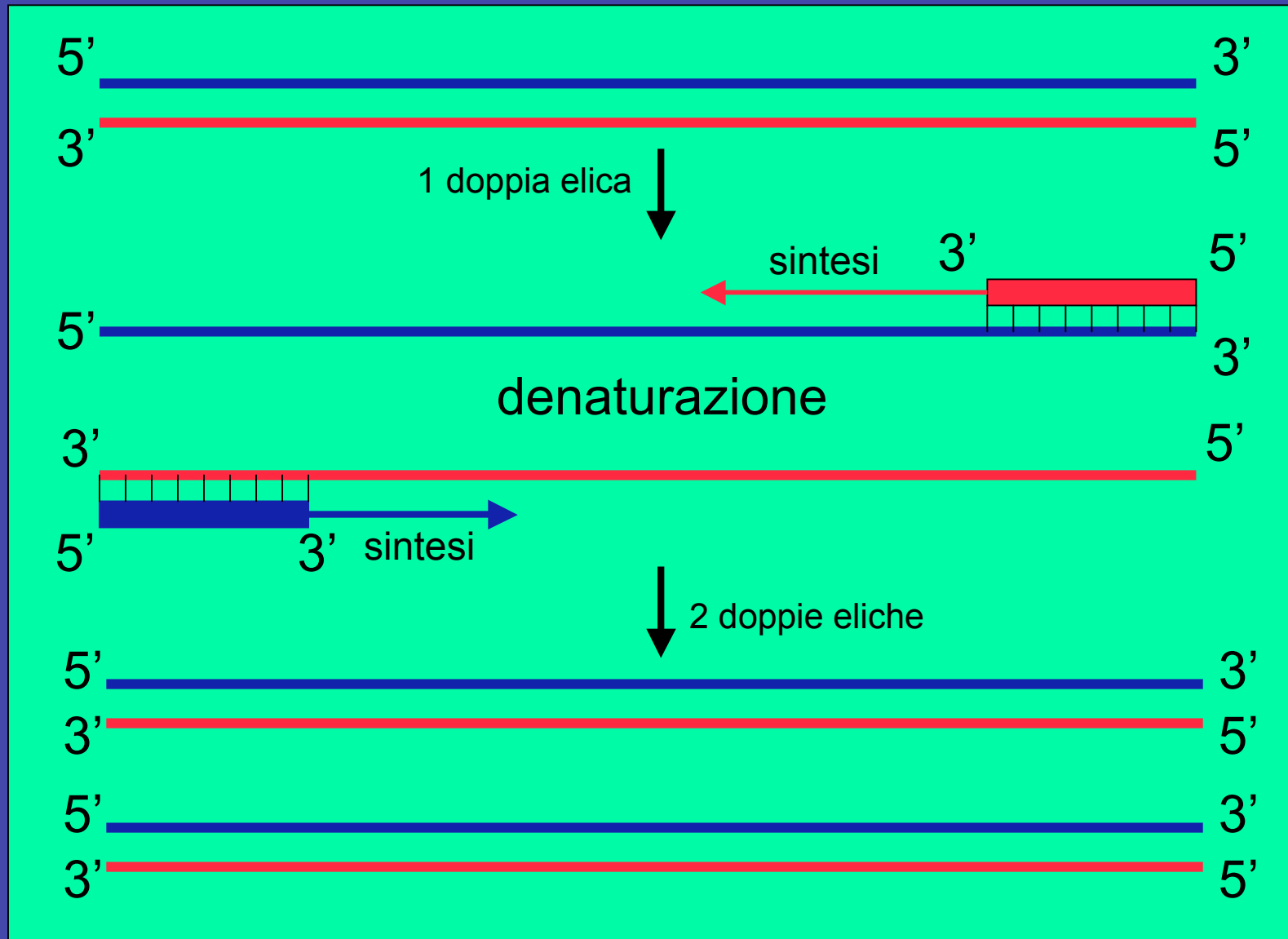
attenzione al verso dei primers

la doppia elica di DNA ha i due filamenti antiparalleli dovuti al sistema che è stato selezionato in origine con le polimerasi degli acidi nucleici che sintetizzano tutte nello stesso verso $5' \rightarrow 3'$ da un $3'$ libero e su un template $5' \rightarrow 3'$

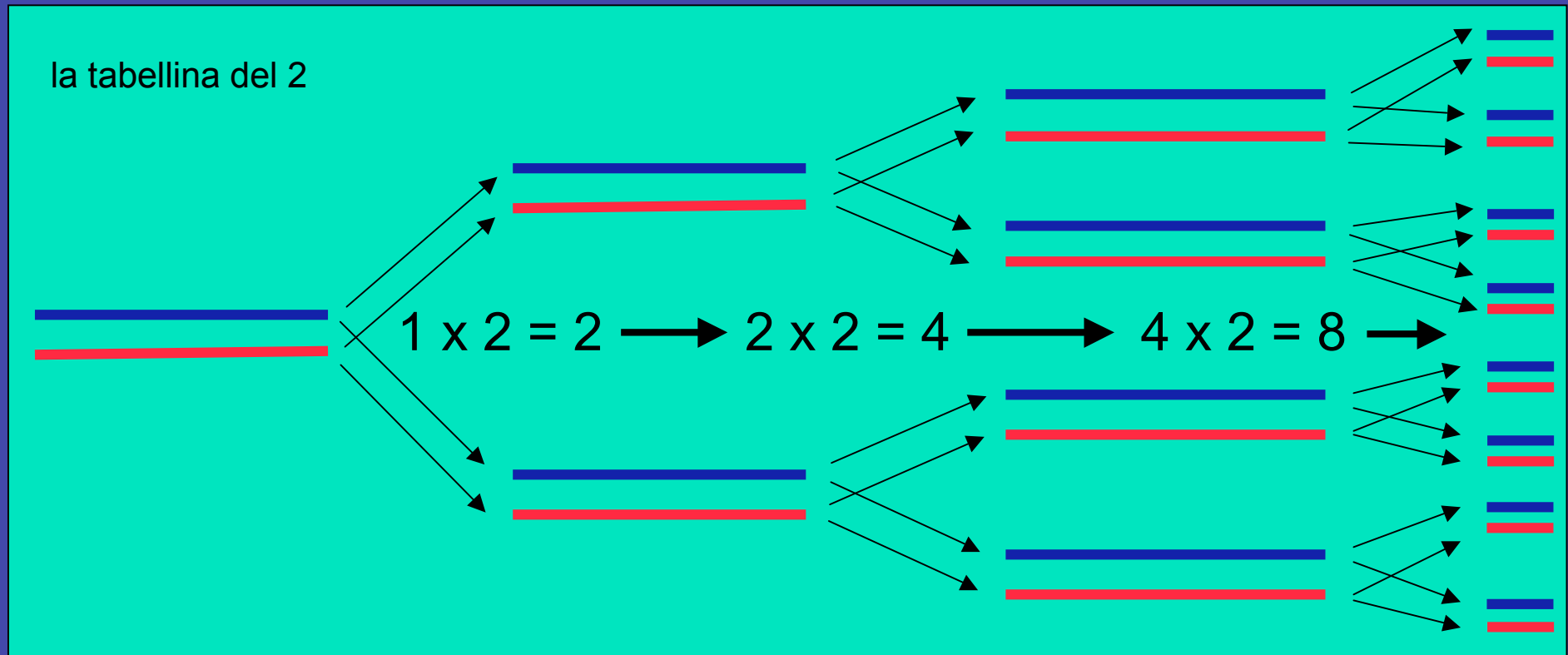


dopo la sintesi si otterranno 2 doppie eliche identiche alla prima

se la reazione in vitro continua

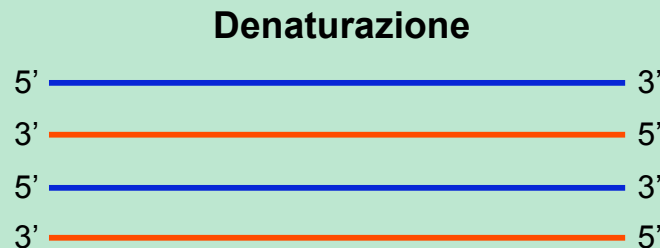
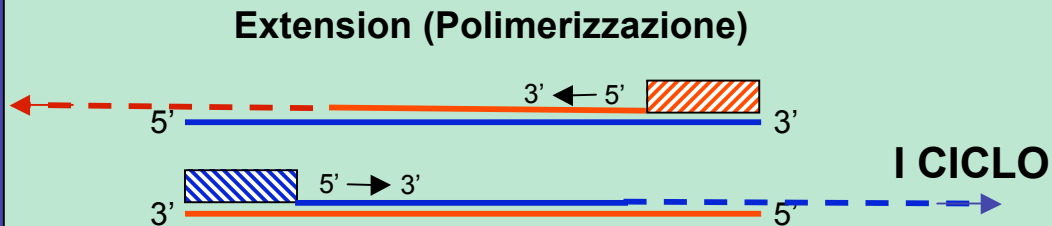
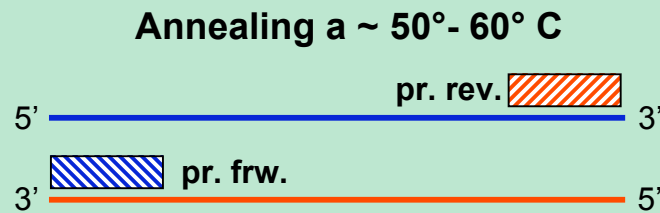
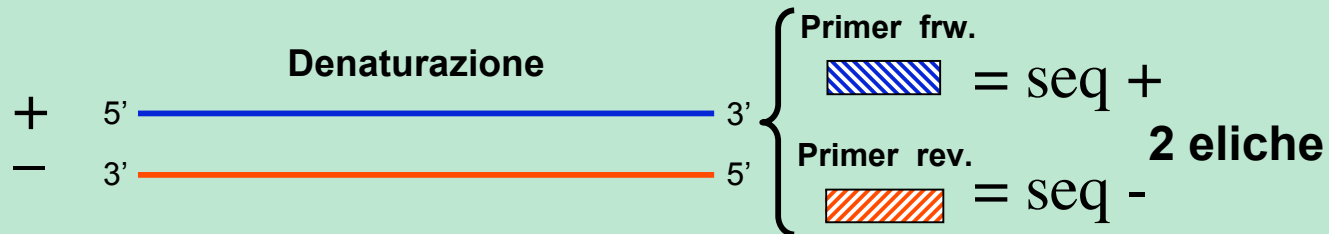


diventa una reazione esponenziale



ma come è possibile fare avvenire la reazione senza farla fermare ? da sola una doppia elica non si duplica se non si ha la separazione (denaturazione) delle due eliche neosintetizzate !

Il ciclo (non il velocipede)

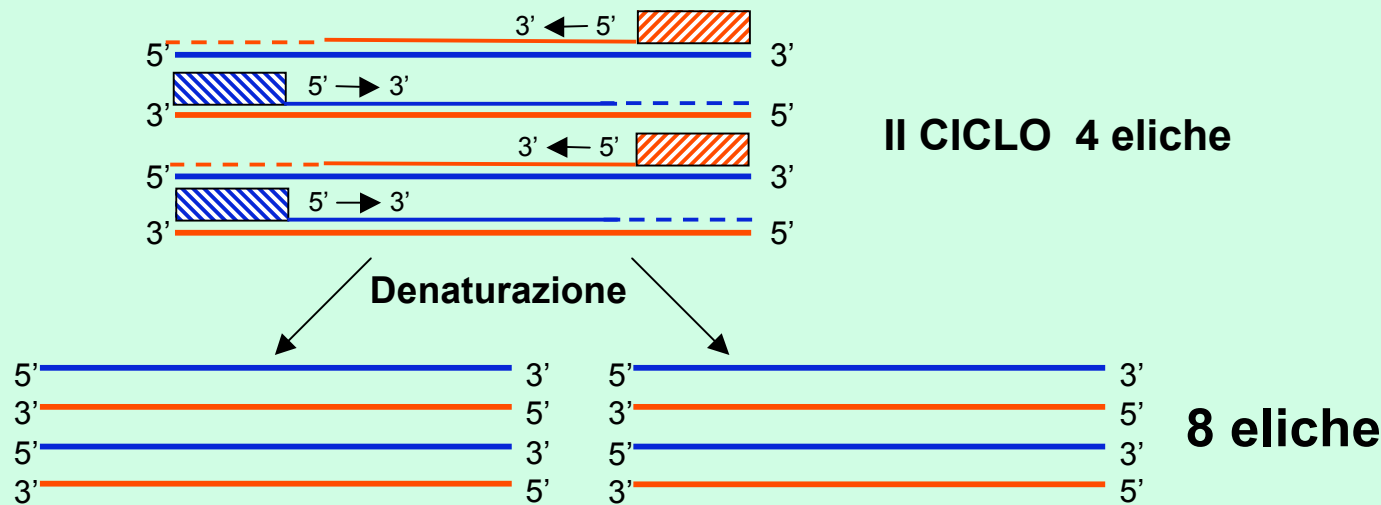


4 eliche



Ciclo continuo

Annealing Extension (Polimerizzazione)



III CICLO → **16 eliche** → **IV ciclo** → **32 eliche.....**

La crescita e' esponenziale : teoricamente ad ogni ciclo un raddoppio di DNA, ma dipende dalla messa a punto del protocollo di reazione, molte variabili da ottimizzare

- senza contaminazioni amplificazione da quantita' minime di DNA (famtogrammi o singole cellule)

- genoma diploide → 2 doppie eliche di templatato in interfase

Le condizioni di reazione di ogni passaggio

vanno determinate per i tempi, temperature e quantita' (conc.) ogni ciclo = 3 passaggi (fasi)

I passaggio denaturazione (5-10 min. quella iniz. della reazione)

II passaggio appaiamento dei primers (annealing)

III passaggio di sintesi del DNA,
estensione del filamento di DNA a partire dai primers (inneschi)

Fine del ciclo

Alla fine dei cicli programmati viene fatta una estensione di 5 -10 min. per assicurare il completamento della sintesi di tutti i nuovi frammenti iniziati e non terminati

i reagenti della reazione enzimatica

l'enzima sarà una Taq polimerasi (ne esistono diverse ottenute da mutanti che aumentano la specificità, efficienza e lunghezza del frammento amplificato)

il DNA template sufficientemente purificato se genomico ad alto peso molecolare

i primers di sintesi prodotti da ditte specializzate (15-25 bp)

la concentrazione del Mg di solito 1,5 mM

il Buffer ottimale per la polimerasi

H₂O per portare al volume finale di reazione ~ 50 microlitri

Le componenti per la reazione:

Volume di reazione: da 10 a 50 μl (max 100 μl) per una preparativa.

Il DNA (templato), abbastanza pulito, non deve essere purissimo, la quantità può essere molto poca, normalmente si usano 10-100 ng di un genoma eucariotico, più di 500 ng possono inibire la reazione

La Taq polimerasi, DNA polimerasi di “thermophilic eubacterium thermus aquaticus” resiste a 95°, frequenza di errore superiore a quelle di eucarioti, 26×10^{-6} , ora ce ne sono per diverse finalità, a basso tasso di errore = high fidelity 8.5×10^{-6} , e per frammenti lunghi genomici. Se ne usa da meno di 1U fino a 5 U, ma se si fanno molti cicli conviene spezzare la reazione in due fasi e riaggiungerla

dNTPs: conc. standard 100 μM per ognuno

Il tampone: sale di Tris, il Mg concentrazione empirica tra 0.5 mM e 4.5 mM, ogni Taq pol. ha un tampone con concentrazioni saline (buffer) ideali

I primers: scelti per funzionare in coppia, evitare GC ed AT finali, palindromi, sequenze complementari, devono avere T_m (melting) simili,

H₂O q.b. sterile incontaminata per arrivare al volume finale

applicazioni della PCR

RT-PCR, nested PCR

RACE 3' e RACE 5'

PCR inversa

Mutagenesi

Pcr quantitativa e semiquantitativa competitiva

variazioni sul tema PCR multiplex

Real Time PCR abbreviata = RT-PCR da non confondere

AFLPs

(uso di adapters anche col random sequencing e PCR)

3C = chromosome conformational capture e varianti

i controlli essenziali

Controlli, negativi, positivi,
(i controlli ci fanno capire se l'esperimento è venuto bene)

Cosa è il controllo negativo? E quello positivo?
A cosa servono?

Rischio contaminazione (il DNA templato potrebbe essere
presente nell'ambiente dove si esegue l'esperimento)

Perché si ha contaminazione ?

Precauzioni e controlli

Contaminazione a livello di estrazione del DNA,
- controllo bianco dei reagenti che deve restare negativo

Contaminazione della amplificazione,
- controllo bianco dei reagenti della amplificazione
- controllo positivo della amplificazione con un DNA genomico di riferimento per verificare l'efficienza dei reagenti

Protocollo di amplificazione

PCR genomica selettiva della regione regolativa 3'RR1
Long PCR 5.4 Kb Taq platinum High Fidelity

primer A2R	1.5 μ l
primer SA2.5	1.5 μ l
Mg (50 mM)	1.5 μ l
d NTPs (10 mM)	1.0 μ l
buffer 10x	5.0 μ l
taq high fidel	<u>0.3 μl</u>
	10.8
water	<u>37.2 μl</u>
tot	48.0 μ l
DNA	2.0 μ l
<u>volume finale</u>	<u>50.0 μl</u>

preparazione di una mix di reazione

Se si devono amplificare diversi campioni si prepara una soluzione di reagenti unica che comprenda anche il controllo negativo e positivo mix x 1 campione x n. campioni

primer A2R	1.5 μ l		15 μ l
primer SA2.5	1.5 μ l		15 μ l
Mg (50 mM)	1.5 μ l		15 μ l
d NTPs (10 mM)	1.0 μ l		10 μ l
buffer 10x	5.0 μ l	x 10 campioni	50 μ l
taq high fidel	<u>0.3 μl</u>		3 μ l
tot	10.8		108 μ l
water	<u>37.2 μl</u>		<u>372 μl</u>
tot	48.0 μ l		480 μ l
DNA	2.0 μ l		20 μ l
<u>volume finale</u>	<u>50.0 μl</u>	<u>dispensare</u>	50 μ l x reaz.

condizione dei cicli di amplificazione

conditions for thermo-cycler PCR reaction

94 °C 2 minutes

94 °C 30 sec

59 °C 30 sec

68 °C 5 minutes

x 10 cycles

+

94 °C 30 sec

57 °C 30 sec

67 °C 5 minutes

x 20 cycles

72 °C 10 minutes

buffer per la PCR nested

Short PCR (nested)

PCR conditions for HS1,2 A x 25 samples

primer	D3	1.5 μ l	x 25 samples	37.5 μ l
"	P3	1.5		37.5
Mg (50mM)		1.5		37.5
dNTPs		1.0		25.0
Buffer 10x		5.0		125.0
Taq Platinum		<u>0.3</u>		<u>7.5</u>
		10.8		270.0
Water		<u>37.2</u>		<u>930.0</u>
tot		48.0		1200.0 μ l
DNA		2.0		50.0
TOT		50.0 μ l		1250.0

aliquot 48 μ l for reaction and add 2 μ l of DNA

cicli per la PCR nested

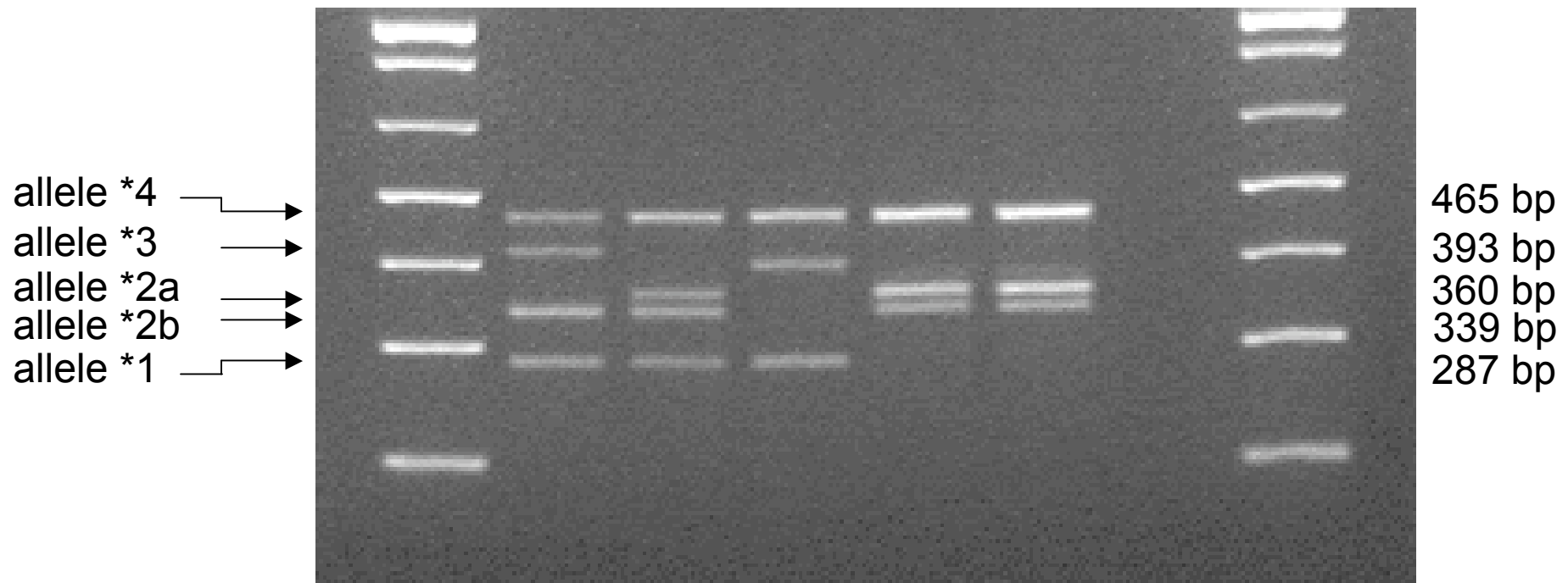
Thermocycler conditions for nested PCR (short)

94° C	2 min	
94° C	30 sec	
56° C	30 sec	30 cycles
72° C	1 min	
72° C	5 min	final extenction

Amplificazione dei 4 alleli di lunghezza tra 465 e 287 bp

i due alleli *2a, *2b e *3a, *3B

amplificazioni da DNA genomico dalle due 3'RR senza selezione



avevamo visto che nel locus 3'RR-B l'allele *3 aveva l'elemento 31mer rispetto al 17mer del locus 3'RR-A adesso abbiamo (ho) visto che anche l'allele *2 esiste nelle due forme con il 17mer ed il 31mer, cambiano le consensus!