

Lezione IX-X

martedì 25-X-2011

corso di genomica

laurea magistrale Biotecnologia
Industriale

aula 8

orario : Martedì ore 14.00 - 16.00

Giovedì ore 13.00 - 15.00

non ci sarà lezione martedì 1 e giovedì 3 Novembre

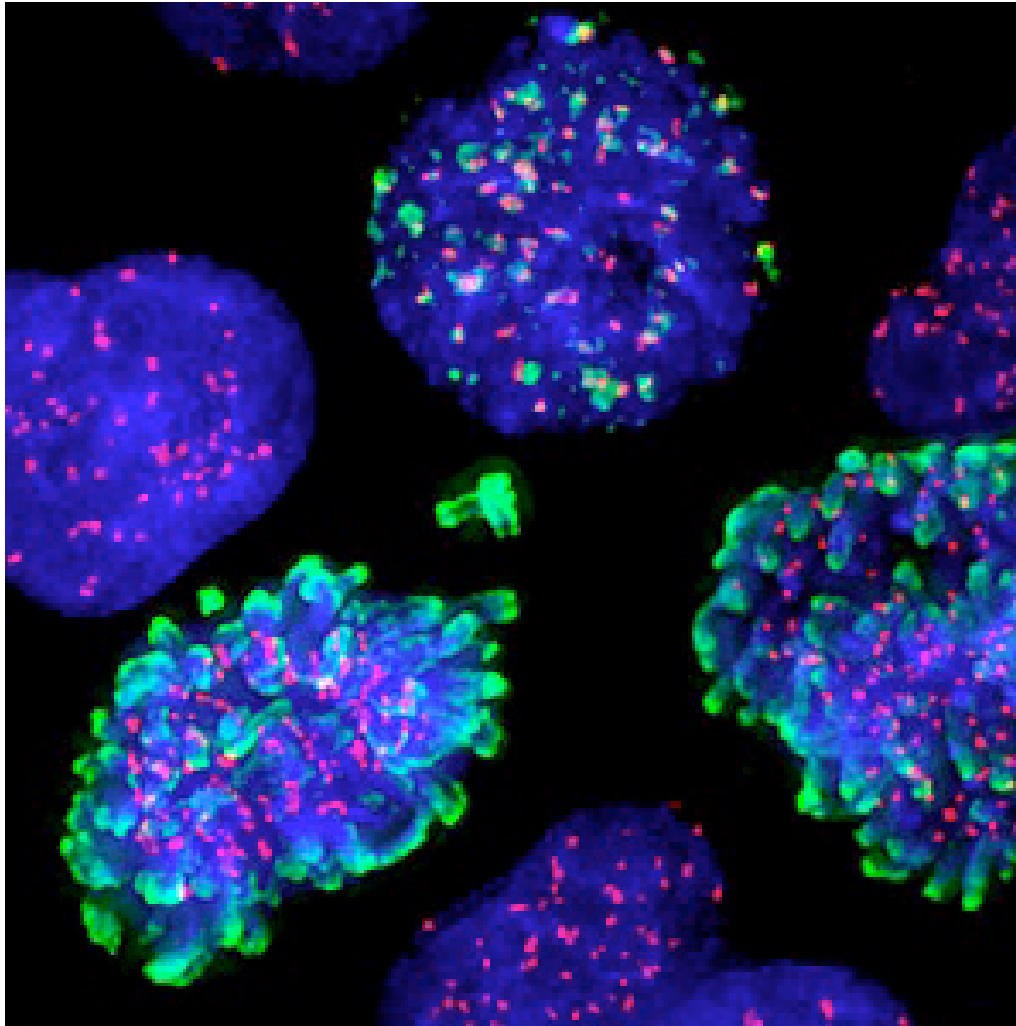
D. Frezza

le novità del 3C - 4C

si possono studiare attività cis e trans



tridimensionale



novità nella FISH

microscopi a
scansione

Chip chrms imm precipit.

Più semplice ed antica

Fissazione legame prot (transcript.factor) DNA

lavaggio per eliminare DNA non legato

Amplificazione PCR frgm ipotizzato

Si può dimostrare il legame tra una regione ed il TF e con altre regioni dopo digestione e ligasi, esempio: enhancer e promotore

metodologia

- 1) fissazione regioni con formaldeide “cross-linked” tra DNA e proteine; legami cis trans tra promotori ed enhancers
- 2) digestione con enz. di restrizione che separa i frammenti cross-linked da quelli liberi (scelta della lunghezza del frgm.)
- 3) ligasi intramolecolare a basse concentrazioni di DNA tra frammenti cross-linked
(evitare frammenti random meno abbondanti)
legami spuri per digestione incompleta 20-30%,
legami delle estremità dello stesso frammento 20-30%
- 4) liberazione del cross-link proteico, resta il frgm. ligato
1 sito di restriz. al centro e due liberi agli estremi = library 3C
- 5) PCR con primers esterni al sito di ligasi (quantificazione)

le tecniche

dal 3C a nuove possibilità

la strategia 4C = 3C con 1 passaggio in più al n.5

2) si preferisce restrict. enz. a 6bp

5a) seconda digestione con enz. a 4bp

5b) ligasi su se stesso per circularizzare il frgm. favorita
per assenza di link a proteine, il pool = library 4C

5c) PCR inversa su DNA circolari e quantificazione,
primers scelti sulla sequenza esca “bait” che
amplificano la regione sconosciuta

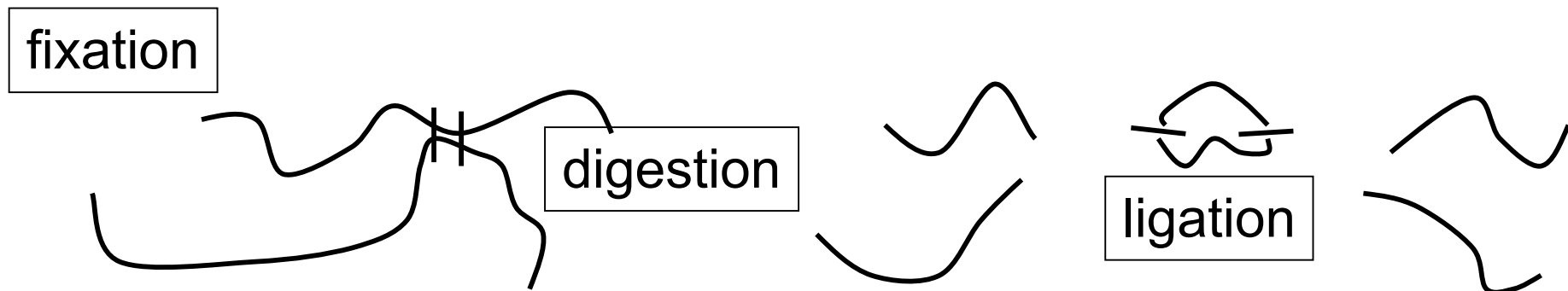
- sequenziamento della library
- ibridazione su microarrays con regioni
genomiche limitrofe ai siti di restrizione usati al 2)

studi dell'organizzazione del genoma

classic methods { FISH fluorescence in situ hybridization
3C chromosome conformation capture

Fish probes hybridization on nuclei fixed on glass slides, visualized by fluorescence microscopy

3C chromatine fragment fixation, restr.enz. digested, ligation, PCR amplification, only known seq.



invenzione della 4C

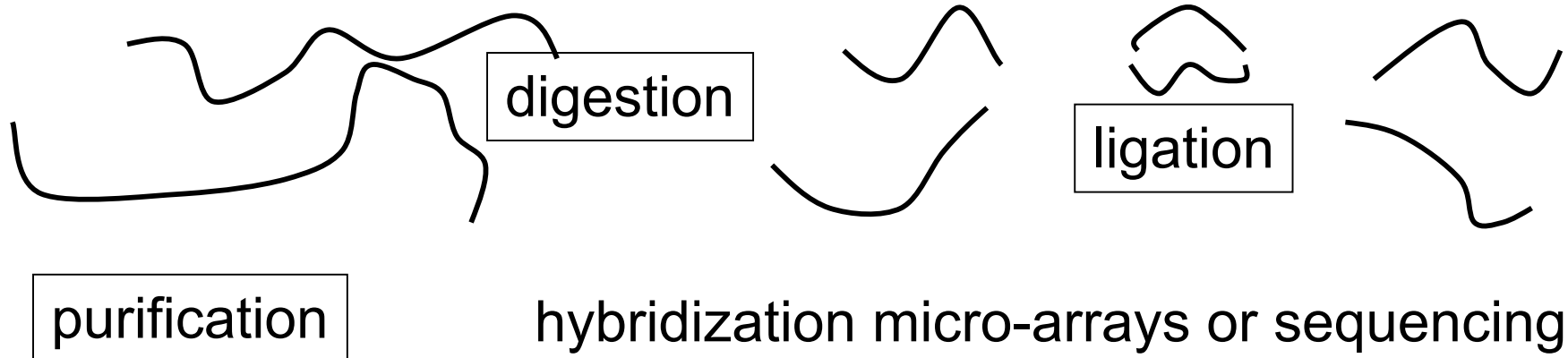
combined large scale sequencing
hybridization to microarrays

} captured fragments

unbiased search of interaction in cis & trans

genome spatial organization: key contribution to its function

fixation



evoluzione del 3C

5C = Carbon-copy chromosome conformation capture

5) amplificazione con primers multipli dopo la ligasi con adattatori con seq. di primers universali T7 e T3 utilizzabili per sequenziamento e microarrays

(a causa di possibili interazioni spurie, si confermano solo le interazioni ad alta frequenza)

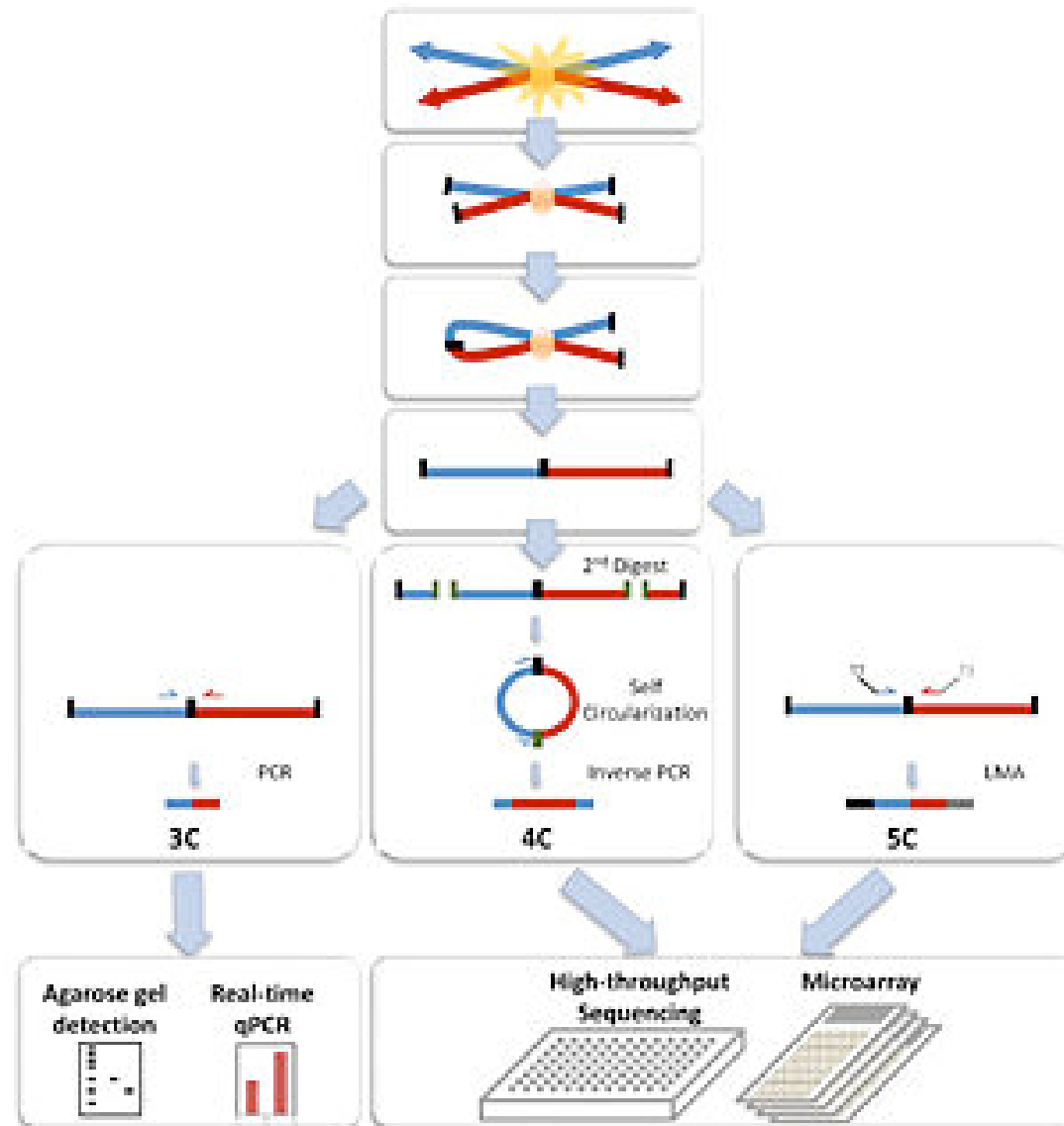
chromosome immunoprecipitation utile per interazioni distanti

5C è difficile per l'alto numero di primers su screenings di genoma intero.

4C si può fare su microarray senza conoscere il sito di interazione

localizzazioni non casuali

- step 1 Cross-link DNA
- step 2 Restriction Digest
- step 3 Intramolecular Ligation
- step 4 Reverse Cross-link
- step 5 Method Specific Processing



differenze tra metodi 3-4-5C

3C amplificazione PCR di regioni predette (verifica di una interazione con transcription factor e cis-regions)

4C amplificazione per trovare link tra regione nota e ignota (verifica di cross link tra una regione nota ed altre ignote con reverse PCR)

5C amplificazione di regioni non bias e ibridazione su micro-arrays (ricerca di regioni non note che interagiscono col FT ed altre sempre ignote)

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

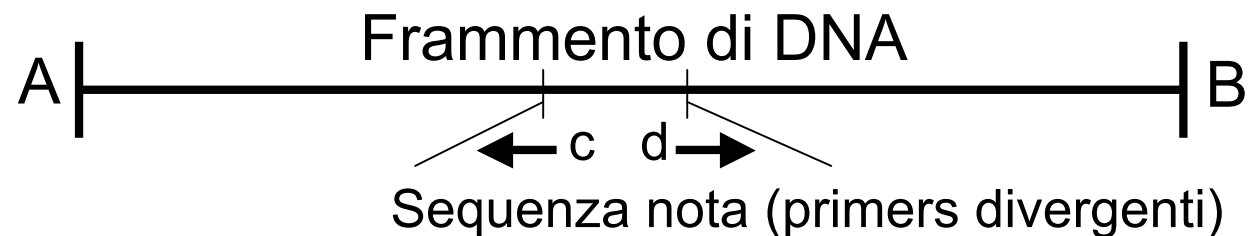
- tra due buoni si sceglie quello con estremità coesive per la ligasi più efficiente

- si evita l'enzima che taglia all'interno del frgm, si otterrebbe solo una estremità

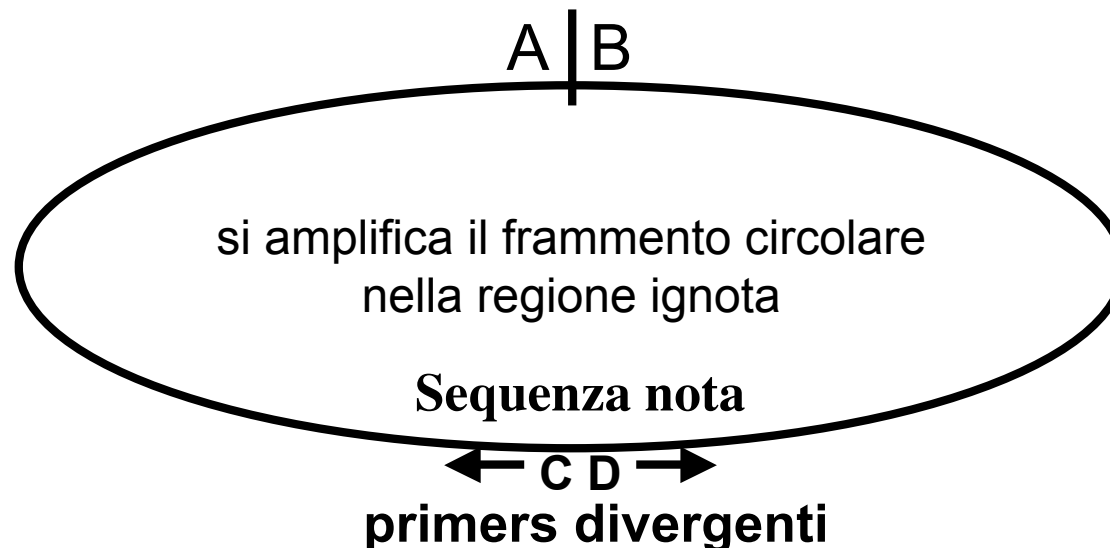
grigio + viola se dx troppo lungo, estremità compatibili

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



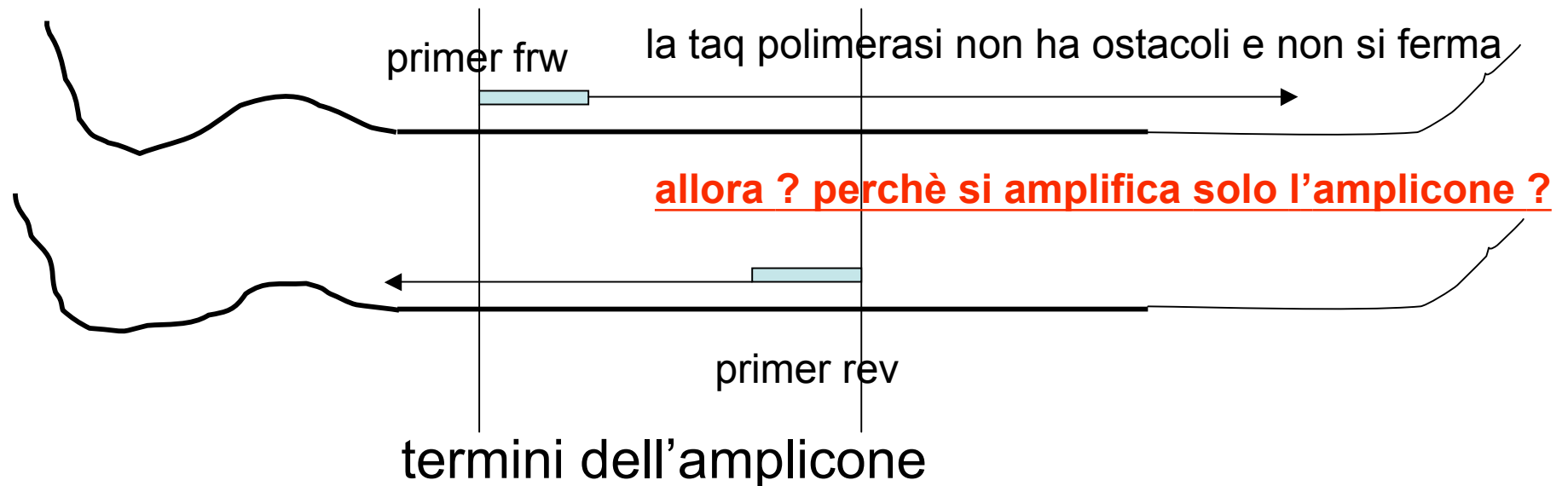
Ligasi per circularizzare il frammento



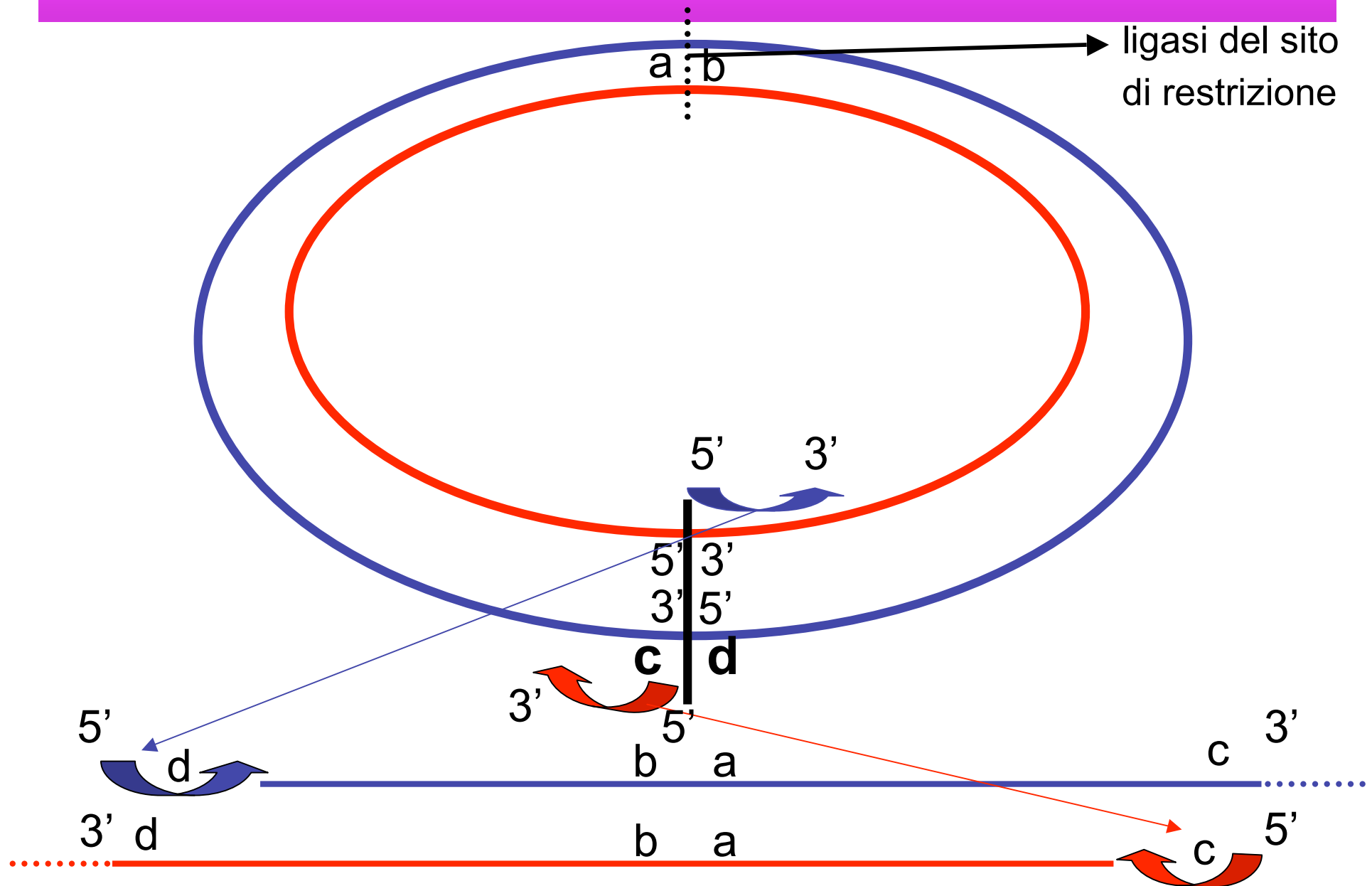
amplificazione di DNA genomico o clonato

al primo ciclo cosa si amplifica ?

la Taq polimerase si ferma sull'amplicone ?

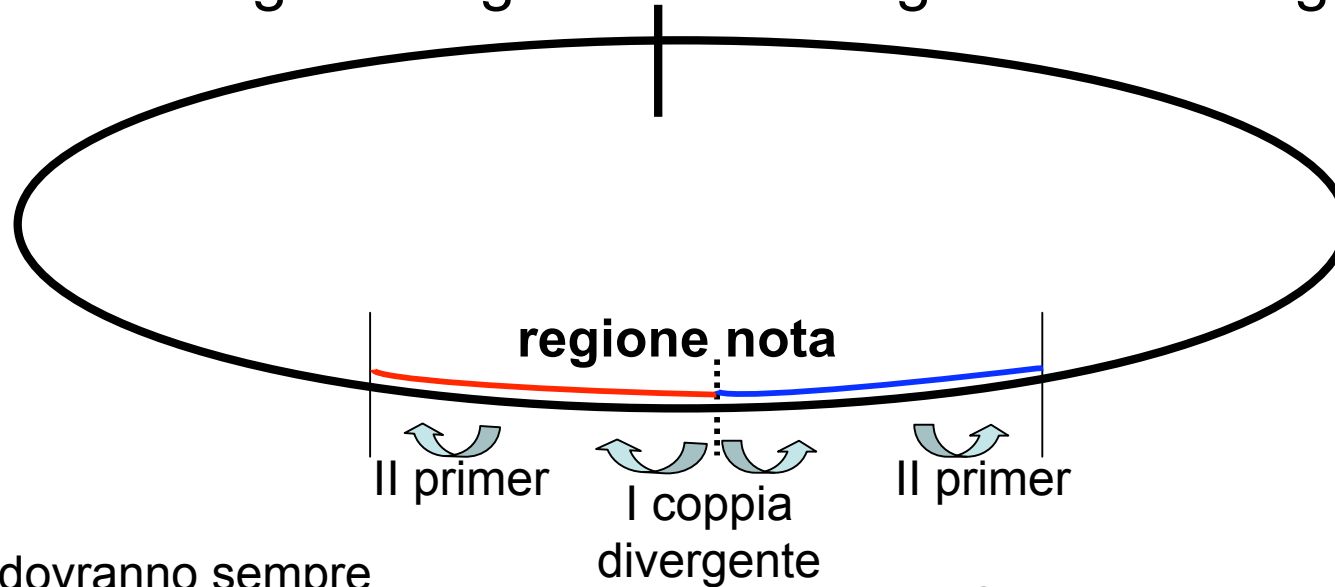


Orientamento primers PCR inversa



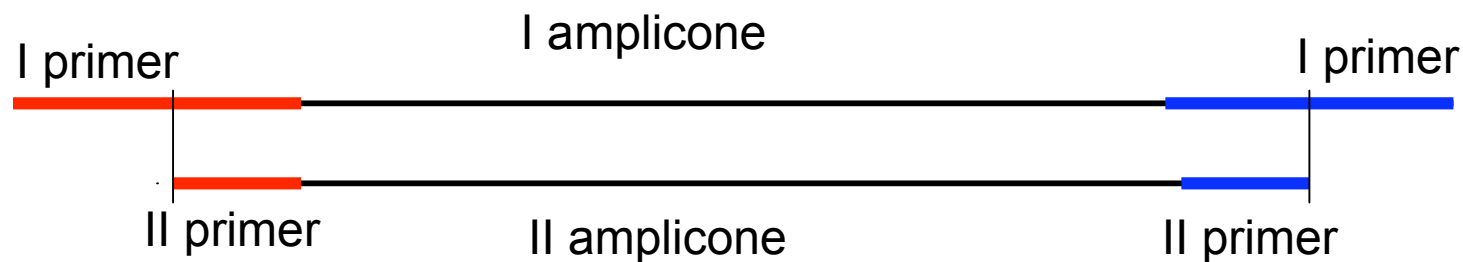
PCR nested per PCR inversa

estremità ignote digerite su DNA genomico e legate

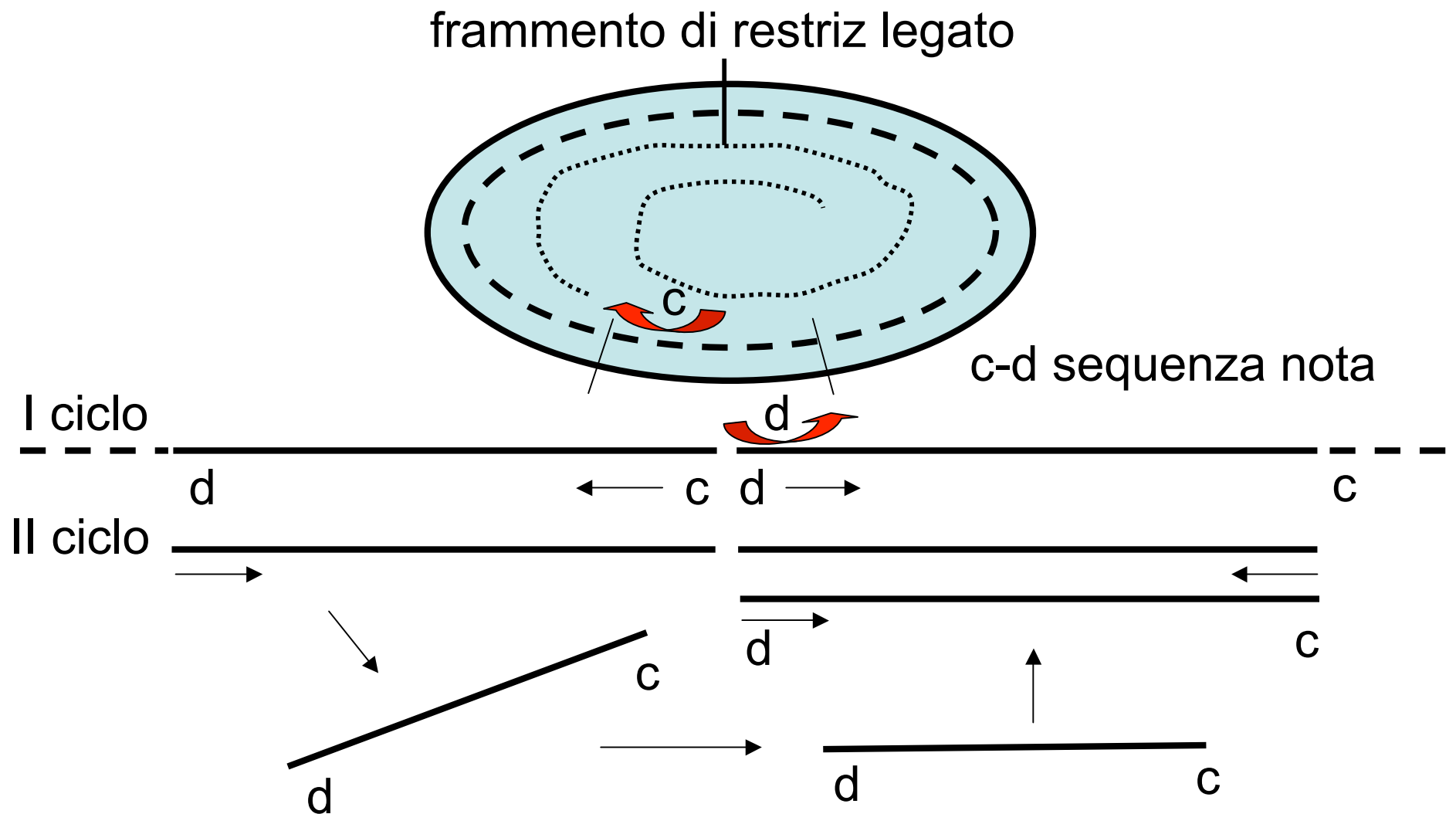


I primers dovranno sempre essere complementari ai due diversi filamenti

PCR nested quando si vuole ottenere maggiore specificità

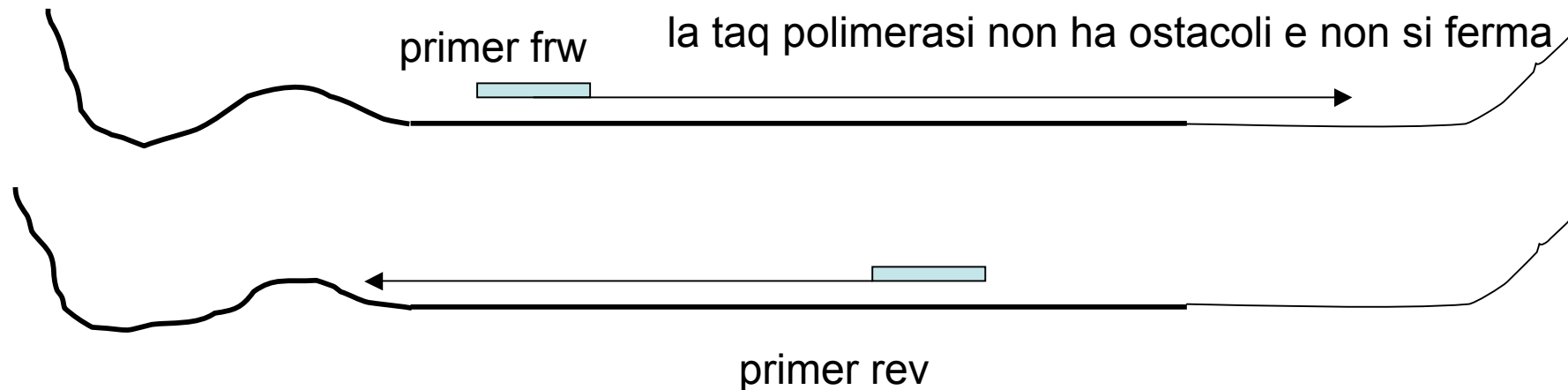


primo ciclo frgm + lungo



possibilità di concatenamento se la taq prosegue

si amplifica solo l'amplicone



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

