

## Isolamento e purificazione di DNA e RNA

- Rompere la membrana cellulare
- Separare gli acidi nucleici da altri componenti cellulari (lipidi e proteine)
- Separare gli acidi nucleici tra loro

## **-Rompere la membrana cellulare**

**-Omogeneizzazione in presenza di enzimi proteolitici (Tripsina..)  
(per tessuti)**

**-Omogeneizzazione in presenza di tamponi ipotonici o detergenti  
(per linee cellulari)**

**-Nel caso di cellule procariotiche e' necessario aggiungere a  
detergenti ionici anche lisozima per degradare il peptoglicano  
della parete batterica.**

# -Separare gli acidi nucleici da altri componenti cellulari

## -Separazione delle membrane

Sopranatante contiene gli acidi nucleici -->

Pellet contiene le membrane

---->



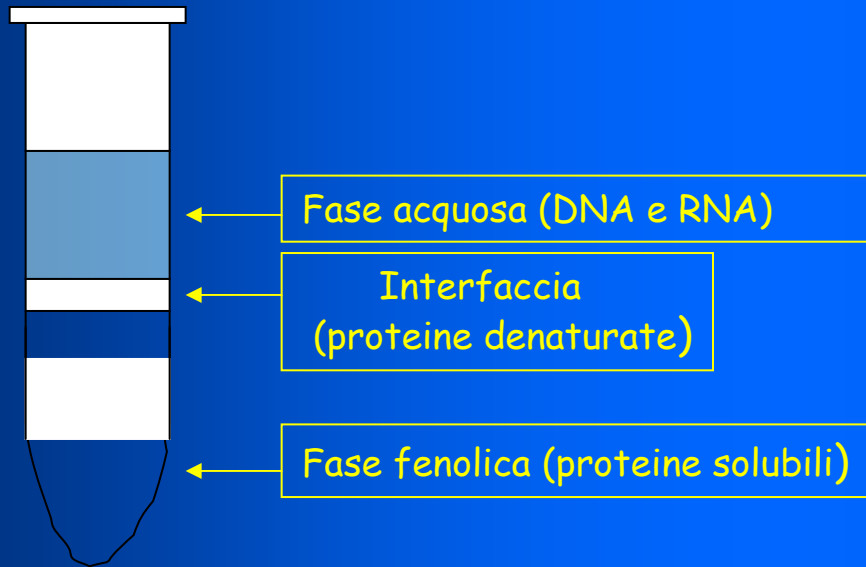
## -Separare gli acidi nucleici da altri componenti cellulari

### Eliminazione delle proteine

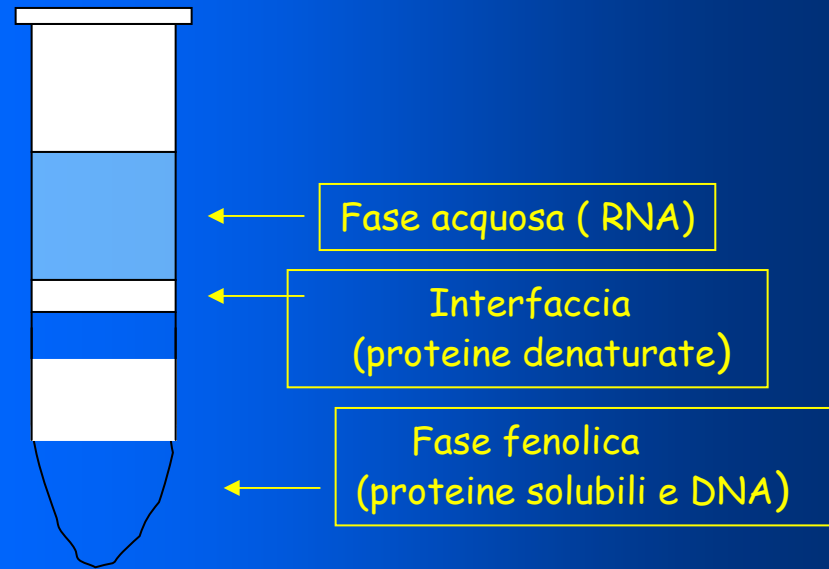
- Separazione mediante solventi organici
- Uso di detergenti quali SDS che alterano la struttura delle proteine
- Uso di enzimi proteolitici, in genere proteinasi K

# Estrazione con fenolo e cloroformio

pH neutro o alcalino



pH acido

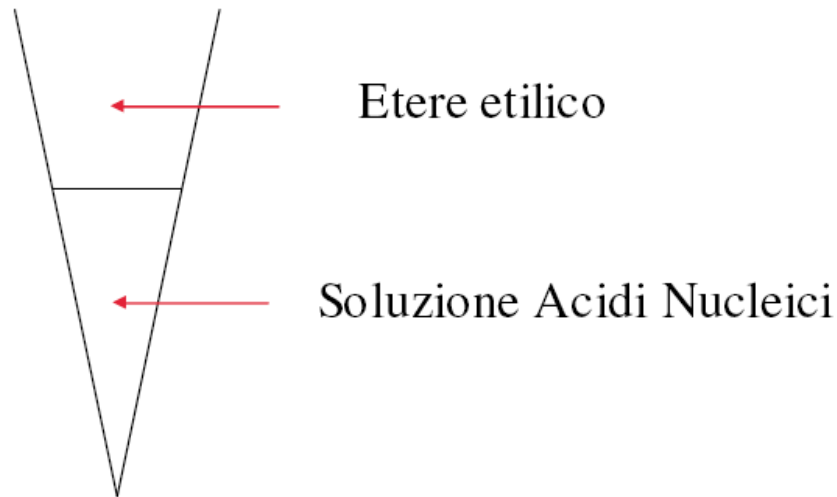


## 4. ESTRAZIONE ETEREA

Si preleva quindi la fase superiore che viene poi sottoposta ad estrazione eterea allo scopo di allontanare eventuali residui di fenolo.

Dopo centrifugazione l'etere localizzato nella parte superiore del tubo viene allontanato.

La soluzione risultante costituisce la miscela di acidi nucleici.



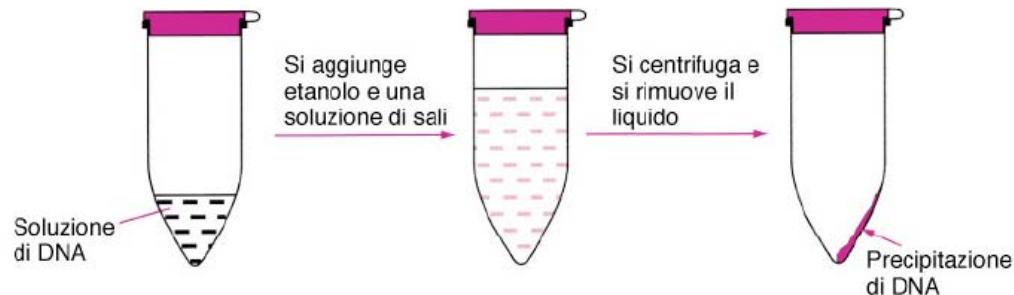
## PURIFICAZIONE A.N.

La fase finale dell'estrazione è costituita dalla precipitazione alcolica.

La preparazione del DNA deproteinizzato è miscelata con 2 volumi di *etanolo assoluto*, in presenza di cationi monovalenti (acetato di sodio, acetato d'ammonio, cloruro di sodio) e viene lasciata precipitare a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

L'alcool etilico determina modificazioni strutturali degli ac. nucleici che ne inducono l'aggregazione e quindi la precipitazione.

Tale precipitazione è fortemente dipendente dal raggiungimento di una *massa critica*. Per soluzioni a concentrazioni  $<10\mu\text{g/ml}$  è opportuno aggiungere un carrier: t-RNA di lievito, che non interferirà con le reazioni enzimatiche alle quali il DNA sarà sottoposto.



**Figura 4.2** Precipitazione in etanolo

## **-Separare gli acidi nucleici tra loro**

E' possibile a questo punto eliminare uno dei due componenti:

RNA previo trattamento con ribonucleasi (RNAsi)

DNA con l'uso di desossiribonucleasi (DNAsi)

La RNAsi viene usata per eliminare l'RNA in preparazioni di DNA;  
la DNAsi viene usata per eliminare il DNA che contamina le  
preparazioni di RNA.



**-Separare gli acidi nucleici tra loro. Separazione di DNA plasmidico**

**KIT di purificazione:**

**Si basano su modificazione dei metodi precedenti accoppiati a metodi con colonne cromatografiche:**

- **Resine a scambio ionico**

- **Matrici silicee**

- **Gel filtrazione**

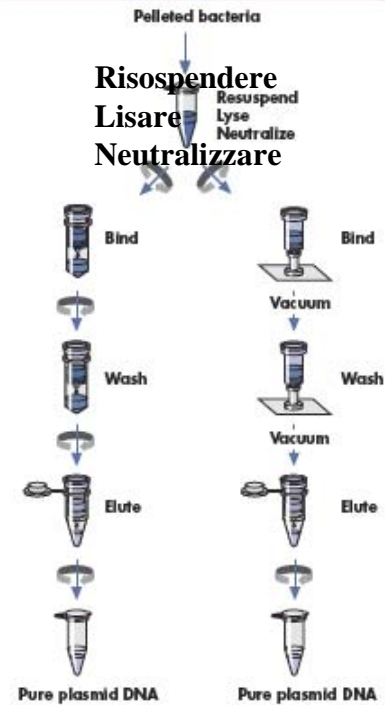
- **Ultrafiltrazione**

-Semplici

-Veloci

-Alta qualita'

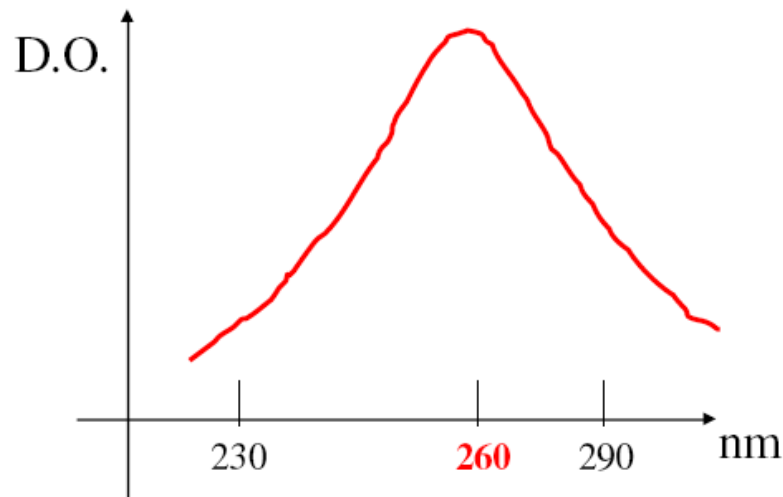
QIAprep Spin Procedure  
in microcentrifuges on vacuum manifolds



# Determinazione della concentrazione degli acidi nucleici

## METODO SPETTROFOTOMETRICO

Il metodo spettrofotometrico sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 260 nm, lo spettro di assorbimento varia da 230 nm a 280 nm.



Gli A.N. hanno il massimo di assorbimento a 260 nm

La misurazione dell'**assorbimento ottico** è uno strumento importante per l'analisi dei nucleotidi ed acidi nucleici.

La frazione della luce incidente ( $I^{\circ}$ ) assorbita da una soluzione ad una data lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) è correlata al cammino ottico ( $l$ ) ed alla concentrazione ( $c$ ) della specie assorbente.

Queste due relazioni sono combinate nella :

### LEGGE DI LAMBERT e BEER

$$\text{Log} \frac{I^{\circ}}{I} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

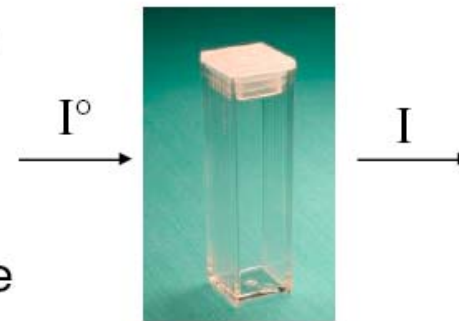
Dove  $I^{\circ}$  = luce incidente

$I$  = luce trasmessa

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare

$l$  = cammino ottico

$c$  = concentrazione



Quarzo per UV  
Plastica per visibile

La legge presuppone che la luce incidente sia parallela e monocromatica (di una sola lunghezza d'onda) e che le molecole di soluto e di solvente siano orientate in modo casuale.

L'espressione  $\log I_0/I$  viene detta **assorbanza** e indicata con **A**, o Densità ottica ed indicata con **D.O.**

$$\text{Log} \frac{I^{\circ}}{I} = \epsilon l c$$

$$A = \text{D.O.} = \epsilon l c$$

L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione del soluto che sta assorbendo la luce.

Il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  varia con:

- La natura chimica del composto
- Il solvente
- La lunghezza d'onda

$$\text{D.O.} = \epsilon l c$$

$$c = \text{D.O.} / \epsilon$$

Se  $l = 1\text{ cm}$  (di solito le cuvette hanno lati di  $1\text{ cm}$ )

$$c = 1\text{ M}$$

Allora:

$$\text{D.O.} = e$$

Il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  rappresenta l'assorbanza di una soluzione a concentrazione  $1\text{ M}$  e a cammino ottico unitario.

Per gli acidi nucleici si usa il :

coefficiente di estinzione specifico (**K**)

**K** è stato **determinato sperimentalmente** ed esprime l'assorbanza di una soluzione a concentrazione **1mg/1ml** alla lunghezza d'onda di **260 nm**

$K = 21$  (DNA nativo a doppia elica ds)

$K = 23$  (DNA denaturato a singola elica ss)

$K = 25$  RNA

Quindi:

$$c = D.O. / \mathbf{K}$$

# Polymerase chain reaction e sue applicazioni

La polymerase chain reaction o PCR è una tecnica relativamente recente che ha rivoluzionato la Biologia molecolare. Ideata da Kary Mullis intorno ai primi anni '80, è stata perfezionata e automatizzata al punto da sostituire molte tecniche di clonaggio tradizionali.

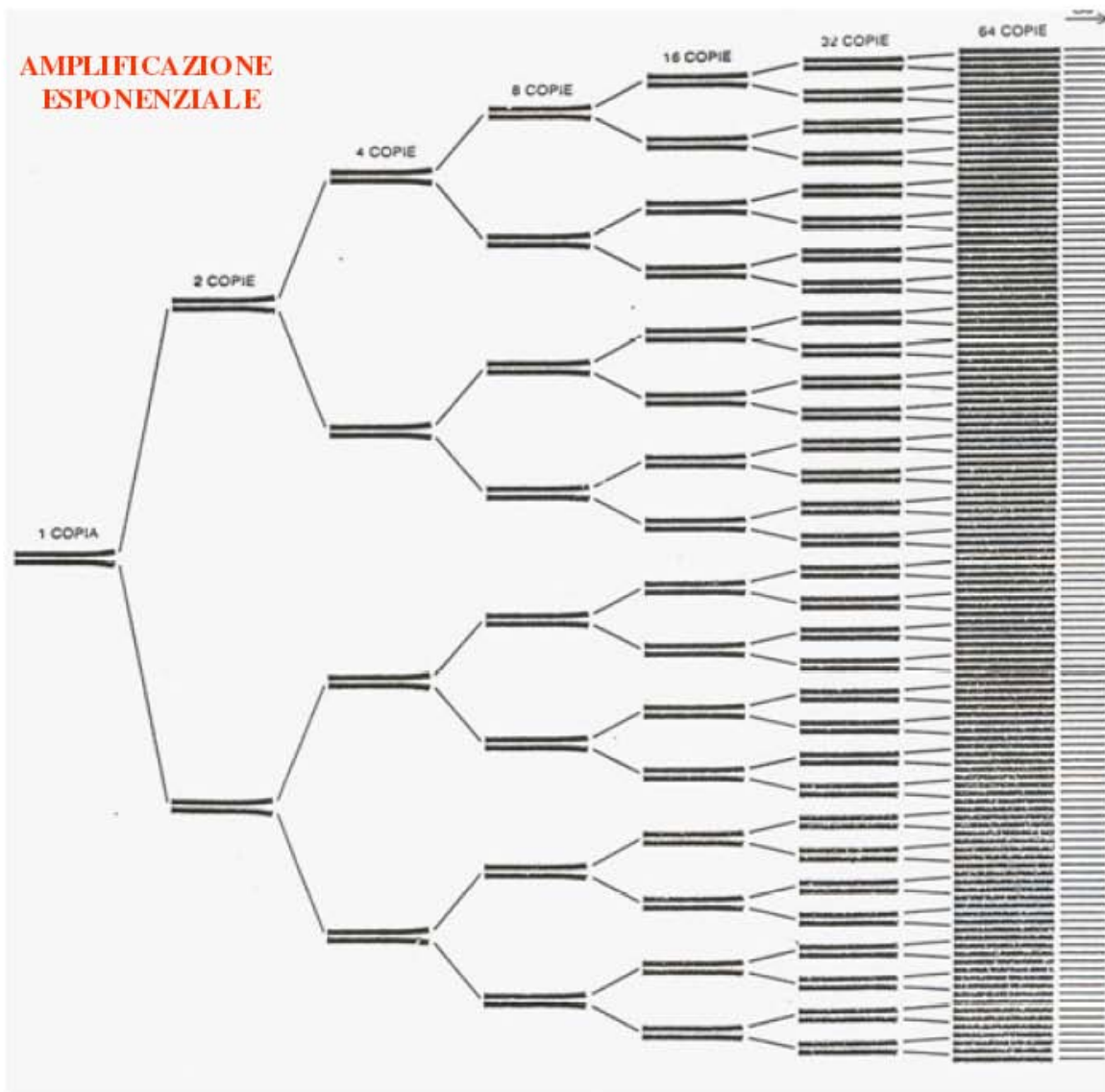
Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.



# Polymerase chain reaction e sue applicazioni

- La tecnica della PCR si basa sulla amplificazione di specifici frammenti compresi tra le estremità 5' di due primers definiti dallo sperimentatore, attraverso la reiterazione di n cicli, ciascuno dei quali include uno step di denaturazione, uno di appaiamento e uno di estensione.
- La reiterazione automatizzata della procedura, le alte temperature di esercizio e la possibilità di definire esattamente la sequenza da amplificare conferisce alla PCR grande sensibilità, specificità e versatilità.
- Considerando i primi due cicli, l'amplificazione della sequenza bersaglio è uguale a circa  $2^{n-2}$ . In pratica dopo 30 cicli di PCR la nostra sequenza bersaglio si sarà amplificata  $2^{28}$  volte, producendo più di 250 milioni di molecole.

# AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE



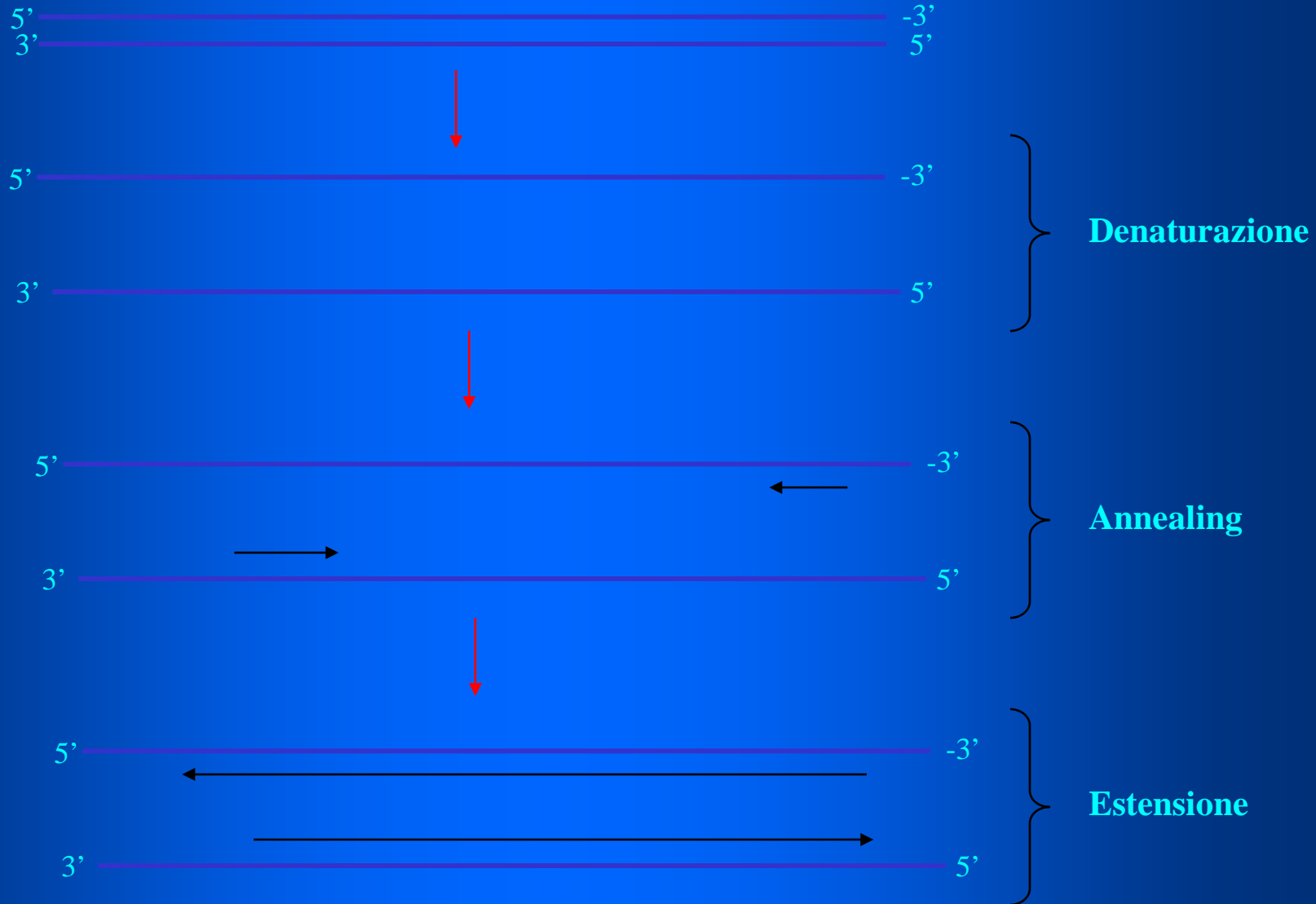
## **ELEMENTI NECESSARI ALLA REAZIONE:**

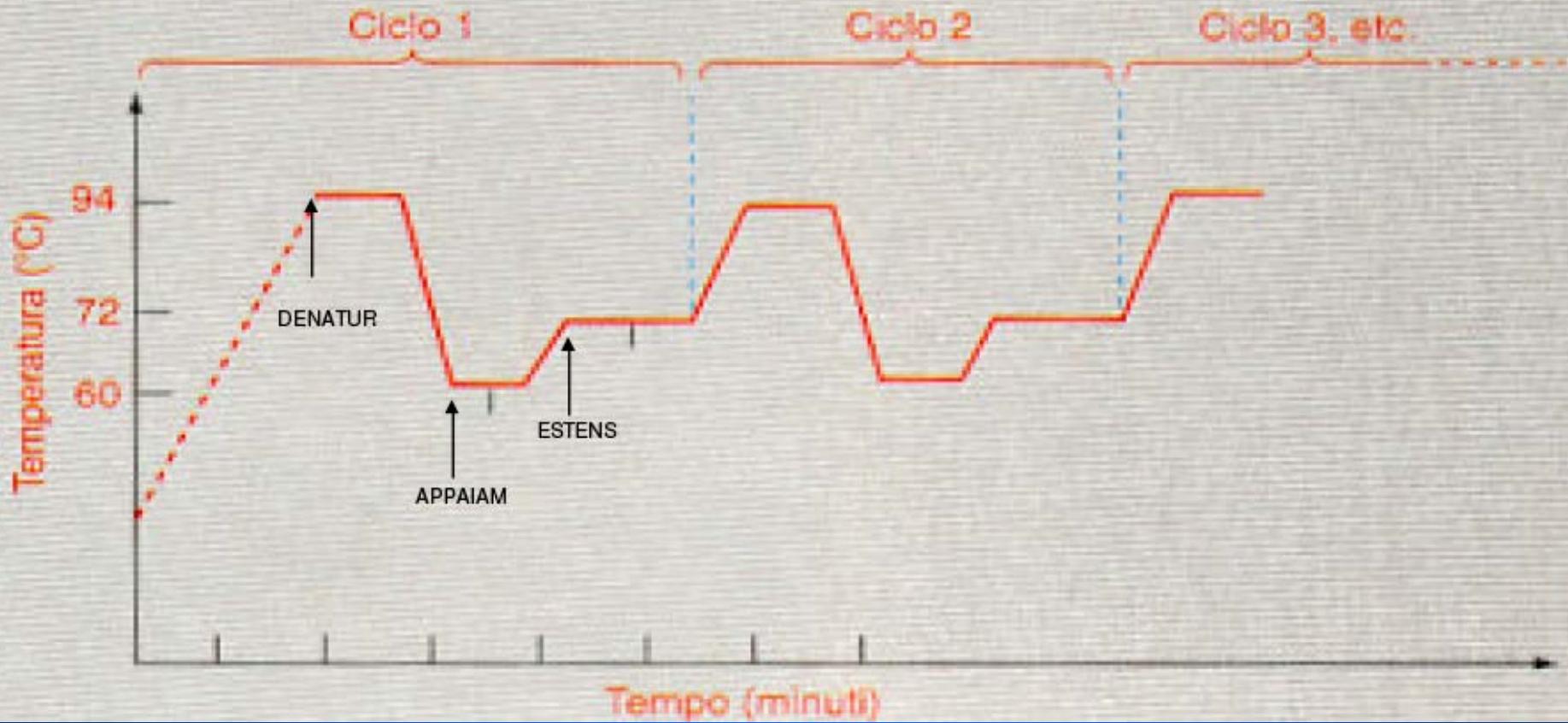
- 1- DUE OLIGONUCLEOTIDI complementari a due regioni situate su filamenti opposti del DNA stampo Ai lati della regione che si vuole amplificare;**
- 2- DNA STAMPO che contenga la regione da amplificare;**
- 3- POLIMERASI TERMOSTABILE;**
- 4- I 4 DESOSSIRIBONUCLEOSIDI TRIFOSFATI**

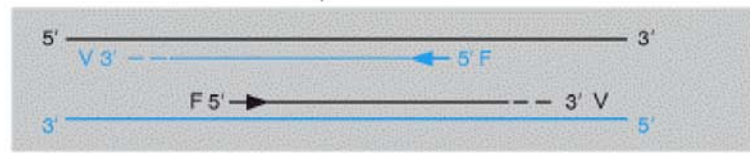
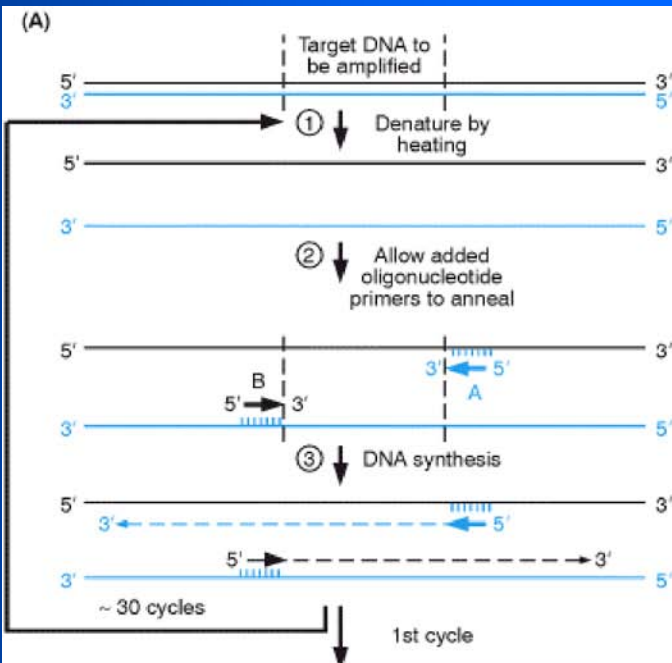
# Fasi della PCR

**Tre passaggi amplificati per 30 o 40 cicli:**

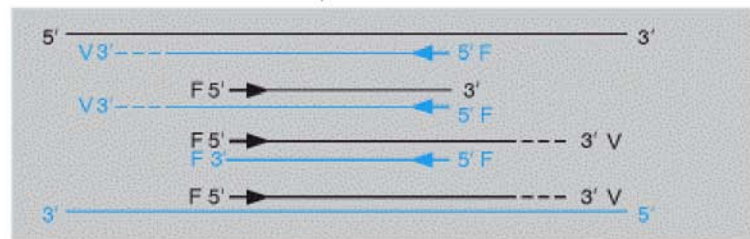
- Denaturazione a 94°C, 30 sec. - 1 min.
- Annealing a 54-60°C, 30 sec. - 50 sec.
- Estensione a 72°C, 1-2 min.



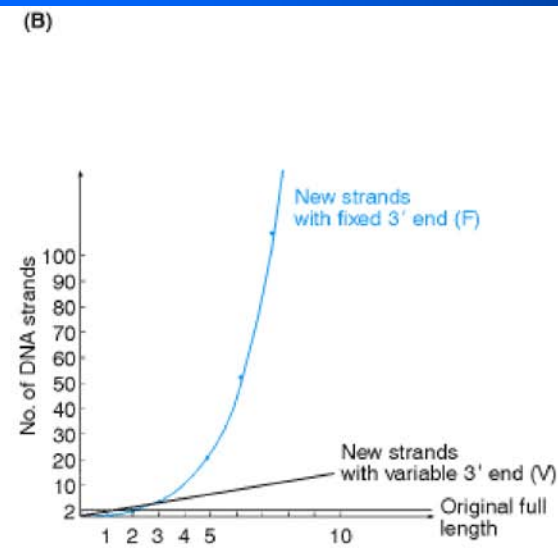
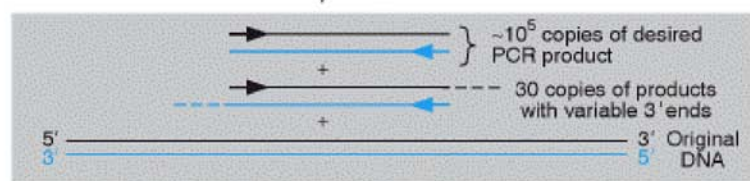




2nd cycle



25th cycle

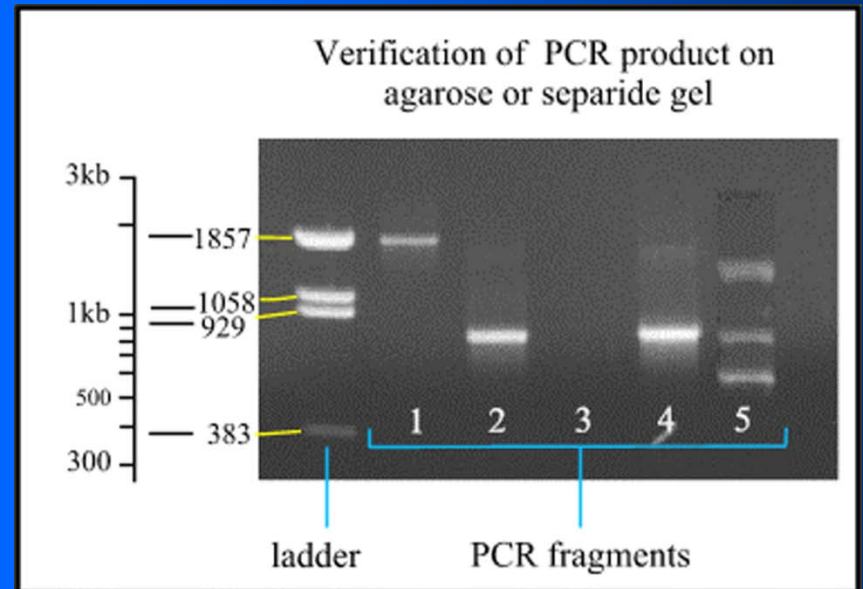


Key:  
 F, F Fixed end  
 V, V End of variable length

# Controlli della PCR

**Prima di utilizzare la PCR per successive preparazioni, bisogna controllare:**

- Se è presente un prodotto amplificato
- Se il prodotto è della giusta taglia
- Se è stata amplificata una sola banda





# Problemi con la PCR

- **Annealing:** i primer ibridizzano velocemente (15-20 sec); aumentare il tempo di annealing non aumenta la resa, ma diminuisce la specificità
- **Estensione:** la maggior parte delle Taq incorporano 50 nucleotidi al secondo a 72°C; è possibile usare meno di 15 sec per frammenti brevi, ed aumentare il tempo per templati più lunghi (>400 bp). In generale si considera 1 min per un template di 1 Kbp.
- **Concentrazione dei primer e dei dNTPs:** i primer devono essere compresi in un intervallo di 0.1-1.0  $\mu\text{M}$ , i dNTPs fra 20 e 200  $\mu\text{M}$ . Diminuendo i primer e i dNTPs aumenta la stringenza della reazione.

# Necessità della PCR

- Resa
- Specificità
- Fedeltà
- Taglia del prodotto
- Risultati riproducibili

# PCR: Vantaggi

## ➤ Velocità e facilità d'uso

**In poche ore si possono ottenere milioni di copie della sequenza di DNA target**

## ➤ Sensibilità

**Virtualmente è possibile utilizzare il DNA di una singola cellula come template (contaminazione)**

## ➤ Robustezza

**Amplificazione possibile anche utilizzando DNA di bassa qualità**

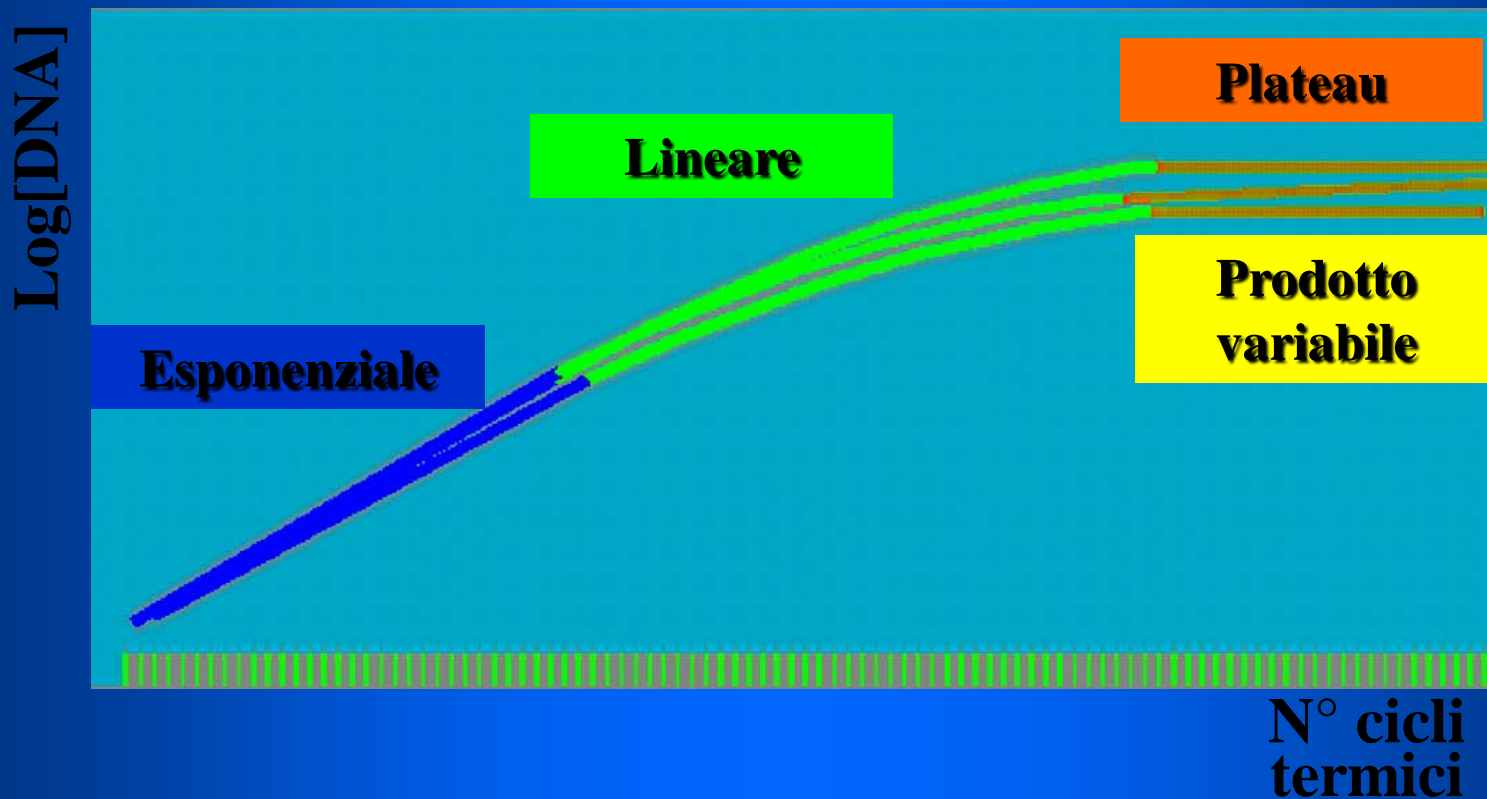
# PCR: Svantaggi

- **Solo sequenze note**  
**Necessario conoscere la sequenza del DNA da amplificare per sintetizzare i primers**
- **Dimensioni e quantità limitate**  
**Dimensioni medie dell'amplicone 0.1-5kb**  
**Quantità limitata rispetto alle tecniche di clonaggio**
- **Proofreading**  
**Taq polimerasi manca dell'attività 3'→5' esonucleasica, 20 cicli di reazione su un frammento di 1 kb produrranno ~40% di frammenti con una mutazione puntiforme (~1/10000)**

## Resa effettiva: effetto plateau

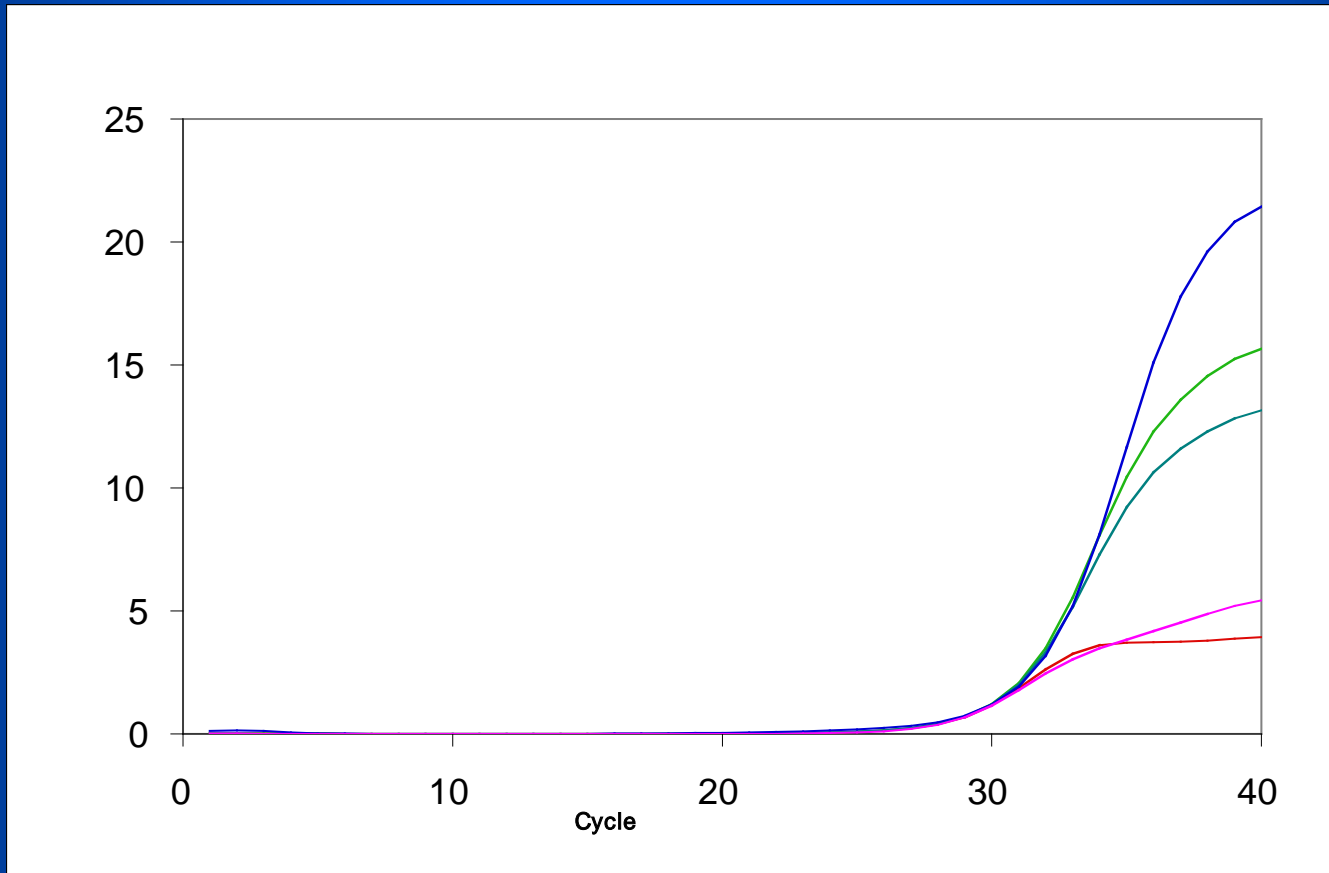
Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:

- ✓ Quantità dei primers
- ✓ Attività della Taq polimerasi
- ✓ Reannealing dei filamenti



# Il plateau non dipende da T

Anche se la quantità iniziale di template è la medesima, il plateau è raggiunto in tempi diversi ed in cicli diversi



# PCR: Soluzioni

- Utilizzare i dati ottenuti durante la fase esponenziale:  
Il prodotto di PCR è proporzionale al template iniziale
- Questo è reso possibile mediante il rilevamento, di una fluorescenza, che è proporzionale al prodotto di PCR
- La fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando uno strumento quantitativo ma anche dei marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR

# Applicazioni della PCR

Typing genetic markers	RFLPs (see <i>Figure 6.6</i> ); STRPs (see <i>Figures 6.7</i> and <i>6.8</i> )
DNA templates for mutation screening	Genomic mutation screening and RT-PCR (see <i>Figure 6.5</i> )
Detecting point mutations	Mutations changing restriction site same principle as <i>Figure 6.6</i> . Other mutations by allele-specific amplification (ARMS; <i>Figure 6.9</i> )
cDNA cloning	From amino acid sequence by DOP-PCR ( <i>Figure 6.11</i> ); cloning of the ends of cDNA by RACE ( <i>Figure 20.1</i> ); making cDNA libraries from limiting amounts of material
Genomic DNA cloning	Cloning of new members of a DNA family by DOP-PCR (Section 6.2.4). Single cell PCR and whole genome amplification or subgenomic amplification (e.g. microdissected chromosome bands) by DOP-PCR or linker-primed PCR ( <i>Figure 6.12</i> )
Genome walking	Inverse PCR (see <i>Figure 10.15</i> ); bubble linker (vectorette) PCR (see <i>Figure 10.16</i> ), <i>Alu</i> -PCR (see <i>Figure 10.18</i> )
DNA sequencing	Double-stranded DNA for direct sequencing or for conventional cloning then sequencing, cycle sequencing ( <i>Figure 6.18</i> )
<i>In vitro</i> mutagenesis	Using 5' add-on mutagenesis to create a recombinant PCR product (see <i>Figure 6.20A</i> ). Using mispaired primers to change a single predetermined nucleotide (see <i>Figure 6.20B</i> )
Gene expression studies	RT-PCR (Section 20.2.4); differential display ( <i>Figure 20.7</i> )