

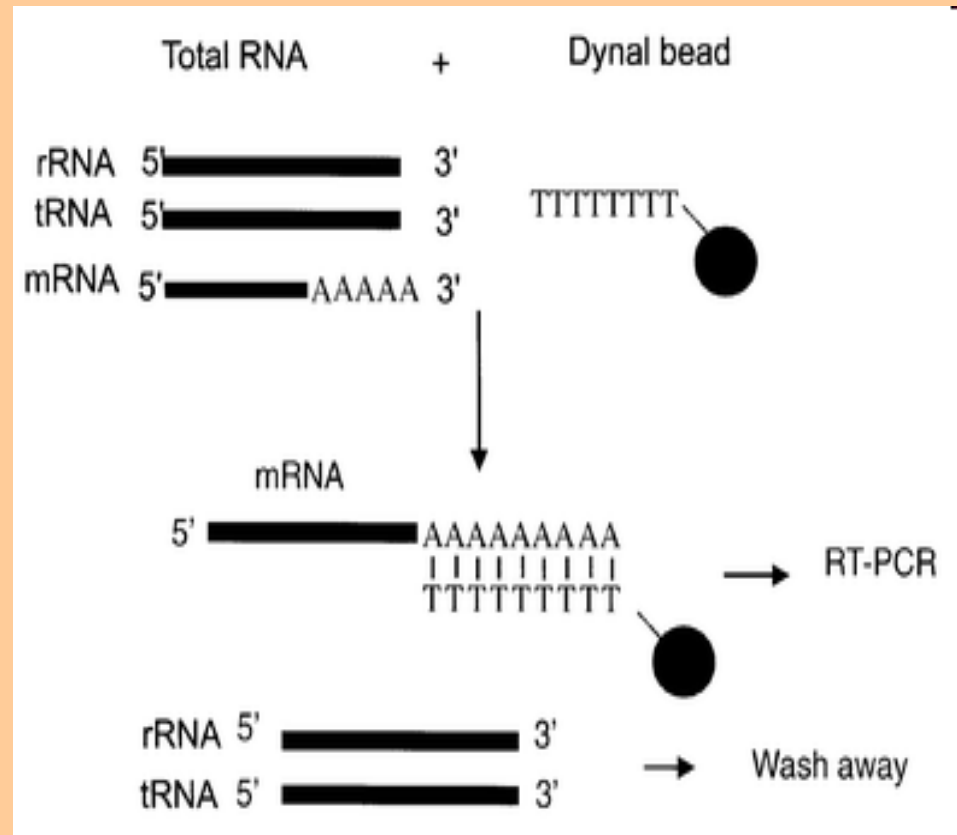
Isolamento del RNA messaggero da cellule eucariote

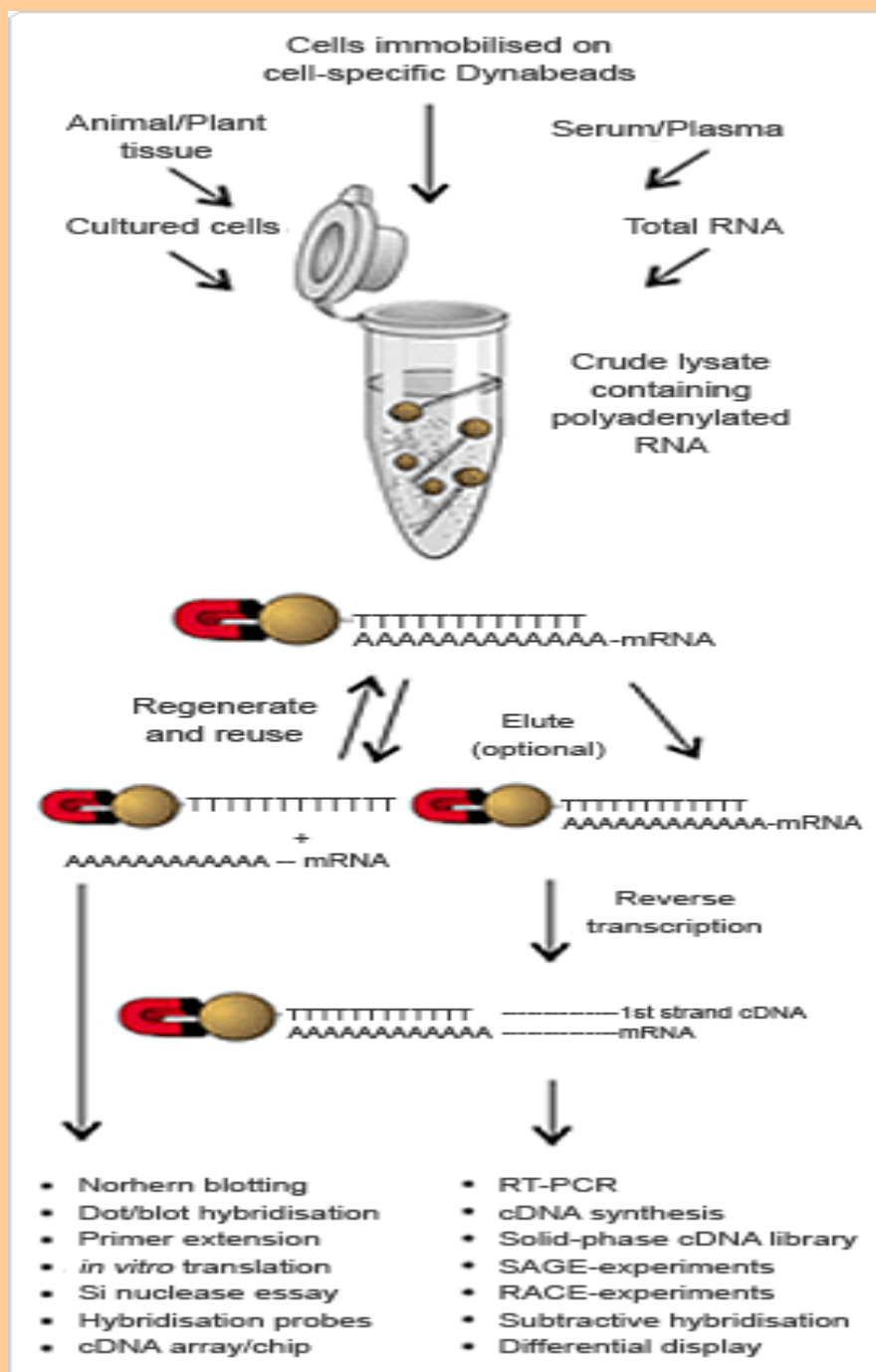
L' RNA totale è costituito da una miscela di RNA ribosomale, di trasporto e messaggero. Quest'ultimo è di notevole interesse nel campo delle biotecnologie, in quanto contiene l'informazione genetica che, nel caso degli eucarioti, spesso non è possibile ottenere direttamente dalla sequenza del DNA genomico.

Sono stati messi a punto dei protocolli che permettono di isolare solo l'RNA messaggero a partire da RNA totale o direttamente dal tessuto.

Isolamento del RNA messaggero da cellule eucariote

Il metodo più semplice per isolare il mRNA eucariotico consiste nell'utilizzare la coda di poliadenina all'estremità 3'. Si utilizzano degli oligonucleotidi sintetici di poli-T legati a dei supporti insolubili (resina polimerica o sferette di metallo). Tramite l'appaiamento selettivo A-T è possibile separare il mRNA da tutti gli altri componenti presenti nella miscela.





Retrotrascrizione e sintesi del cDNA

L' mRNA è una molecola a filamento singolo poco stabile e non può essere replicata o manipolata facilmente *in vitro*. Per numerose applicazioni nel campo delle biotecnologie questo viene usato come “stampo” per ottenere una sequenza di DNA a doppio filamento (chiamato cDNA o DNA complementare) con la medesima sequenza ma che può essere facilmente maneggiato, replicato e propagato. Questo procedimento viene chiamato **retrotrascrizione**.

Per questo tipo di reazione si utilizza un enzima presente in alcuni retrovirus chiamato **trascrittasi inversa** che permette di ottenere DNA a partire da RNA.

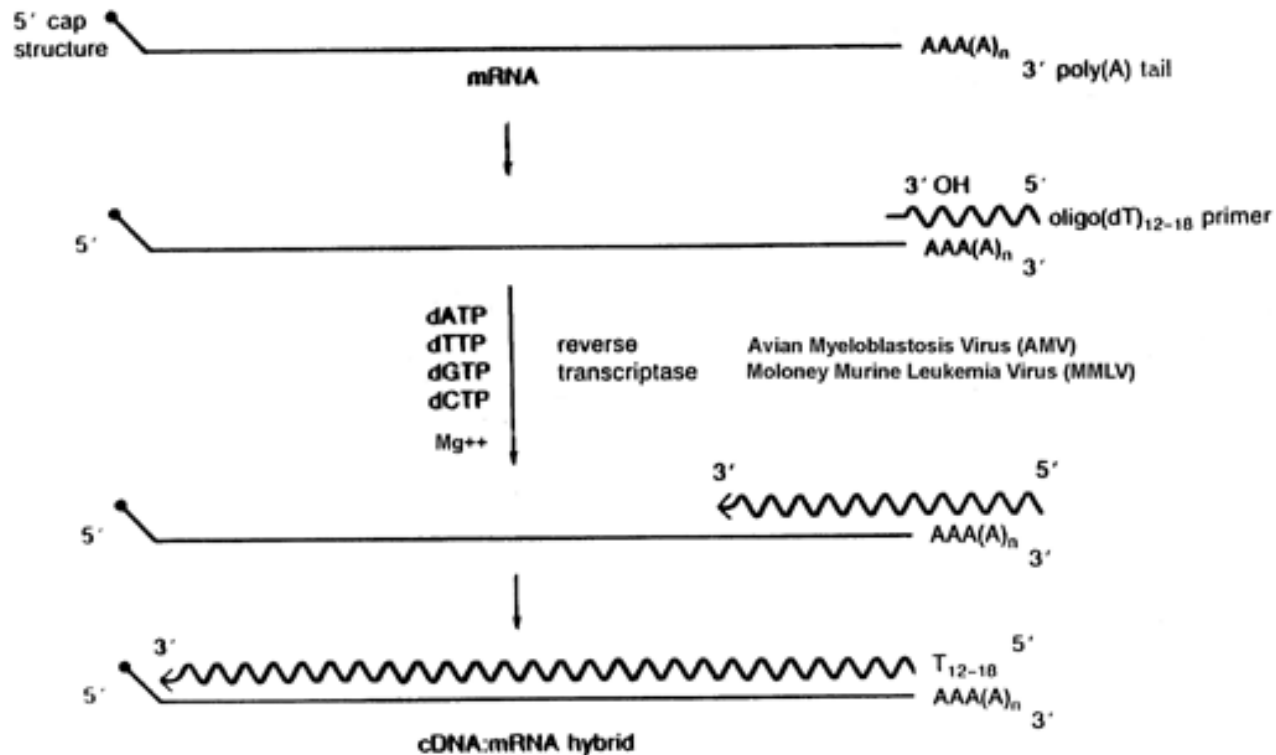
mRNA → trascrittasi inversa → cDNA

La reazione sfrutta ancora una volta la **coda di poliadenina** presente all'estremità 3' del mRNA e prevede 2 passaggi:

1. Sintesi del filamento di DNA complementare al mRNA mediante trascrizione inversa.
2. Sintesi del secondo filamento utilizzando una DNA polimerasi.

Sintesi del primo filamento

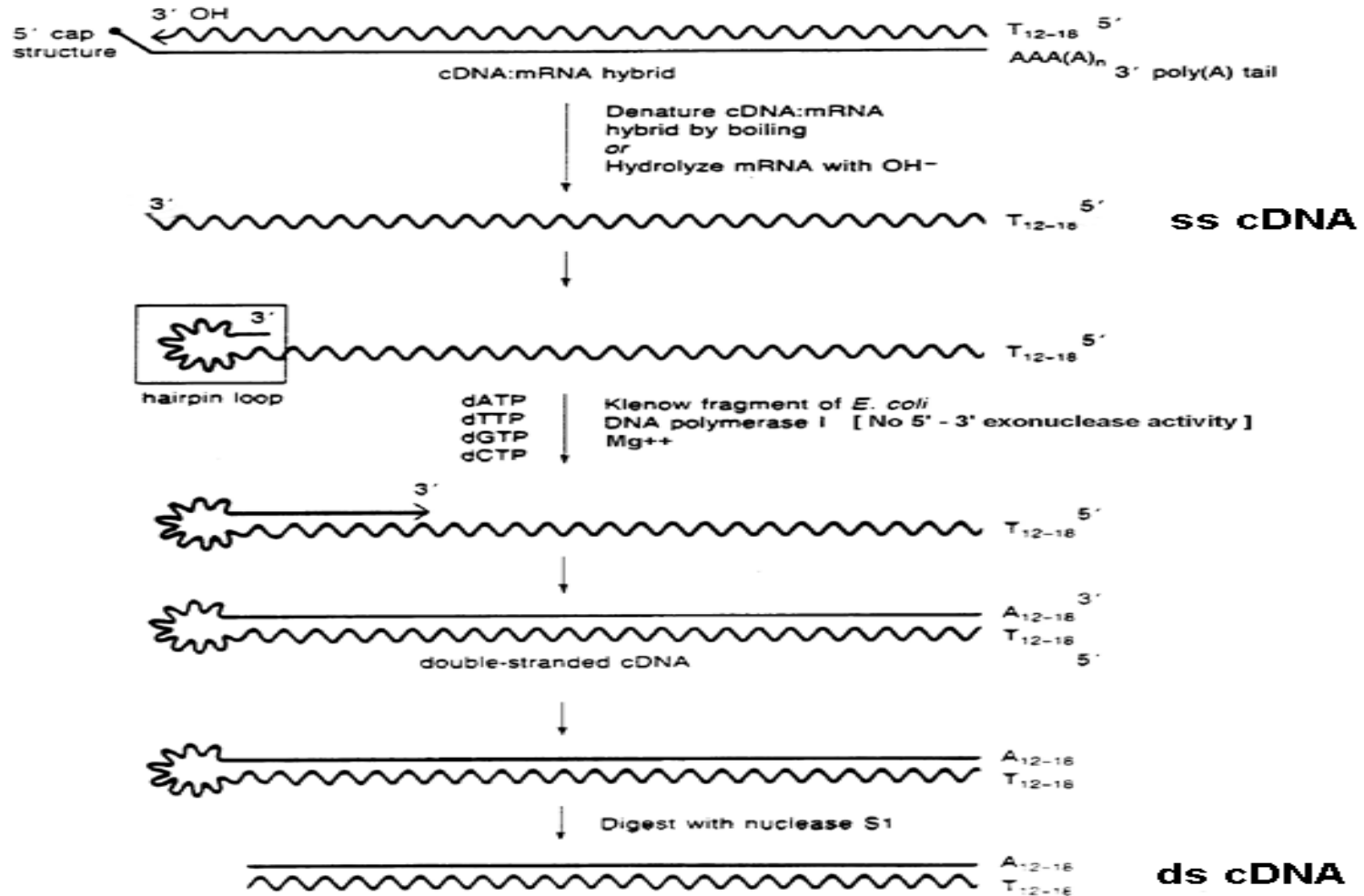
Traditional cDNA synthesis



Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

Sintesi del secondo filamento (self-priming)

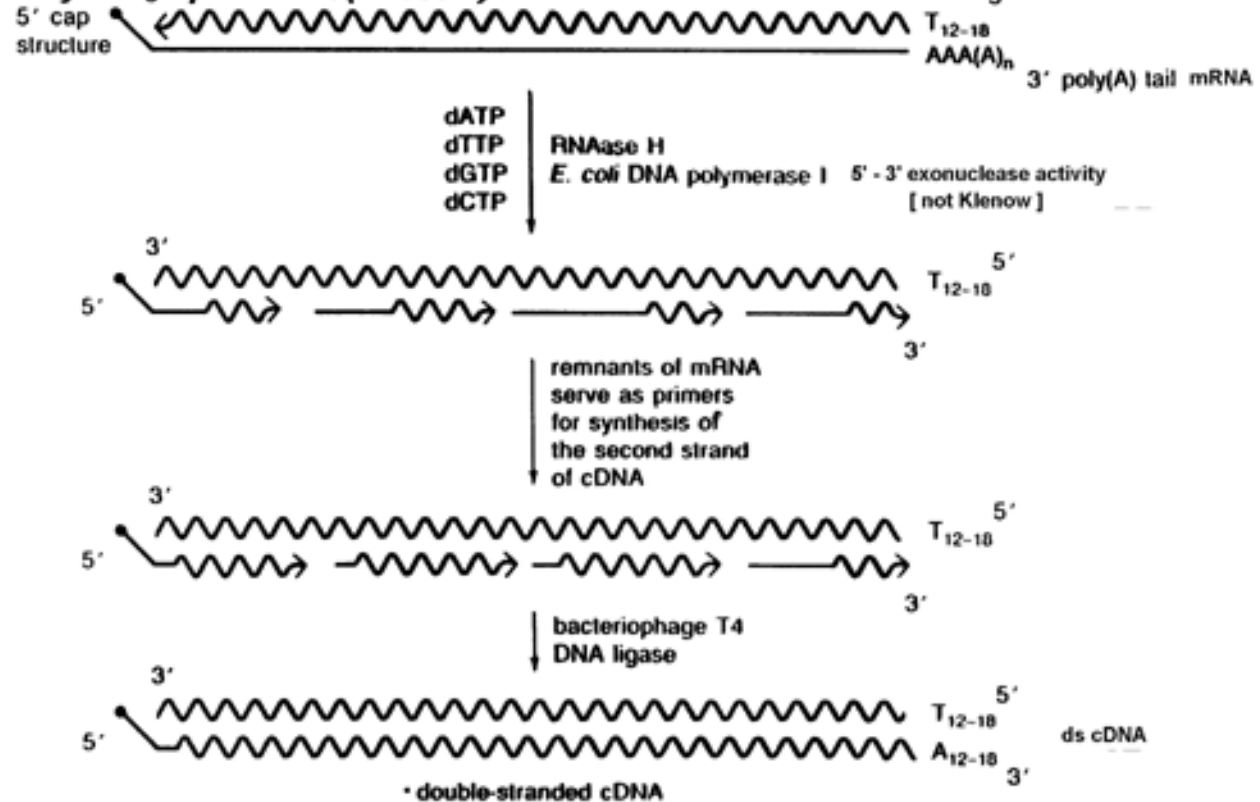
Traditional cDNA synthesis



Synthesis of double-stranded cDNA by the self-priming method.

Sintesi del secondo filamento (RNA fragments priming)

cDNA synthesis by RNA₃ replacement (RNase H)

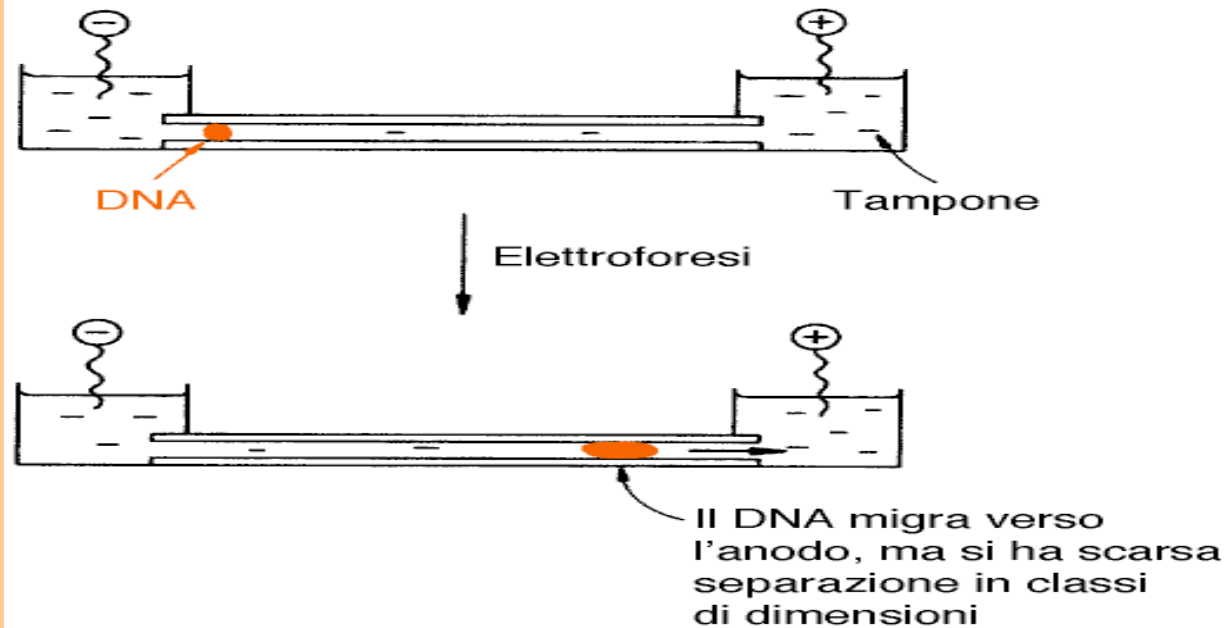


Replacement synthesis of double-stranded cDNA.

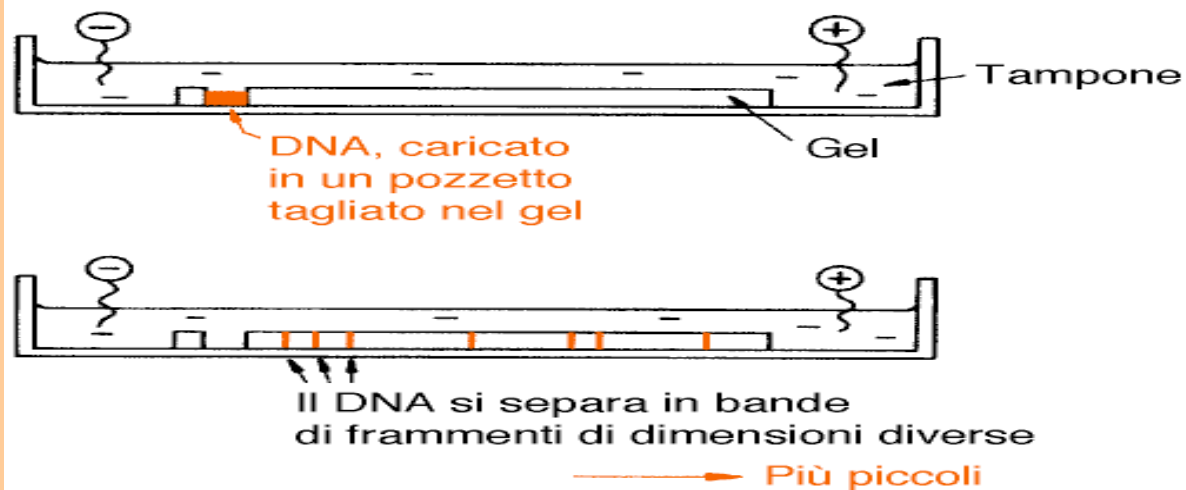
ELETTROFORESI

L'elettroforesi su gel è costituita da un movimento di cariche in un campo elettrico. E' il metodo più comune per separare molecole di DNA, RNA e proteine e trova numerose applicazioni in biologia molecolare. Vengono utilizzati due diversi tipi di *gel*: di agarosio e di poliacrilammide. L'agarosio è un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro a seconda della sua concentrazione. E' quindi la percentuale di agarosio che determina la gamma dei frammenti di DNA, RNA o proteine che vengono separati. Tuttavia il gel di agarosio non ha il potere risolutivo per separare molecole di DNA che differiscono soltanto per uno o pochi nucleotidi. Per questo scopo vengono utilizzati i gel di poliacrilammide i quali riescono a separare frammenti diversi anche di un solo nucleotide (range 1-1000 bp) grazie a pori di dimensioni minori rispetto a quelli di agarosio. Il gel è ottenuto per polimerizzazione di acrilammide monofunzionale tramite un cross-legante, l'N, N'-metilenebisacrilammide. A differenza di quelli dell'agarosio, i legami formati nella poliacrilammide sono irreversibili. La matrice è neutra e meccanicamente stabile. Inoltre i gel di poliacrilammide si possono fare a varie concentrazioni (minimo 3%).

(a) Elettroforesi standard



(b) Elettroforesi in gel



Elettroforesi su gel di agarosio

Dopo la loro polimerizzazione, i gel vengono posti nelle apposite vaschette elettroforetiche riempite in seguito del *tampone di corsa*. Tale tampone è lo stesso e alla stessa concentrazione di quello usato per polimerizzare l'agarosio. I tamponi più usati sono:

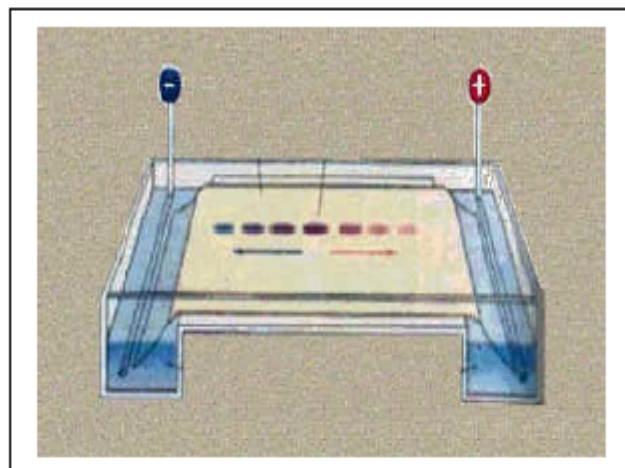
- il TAE (Tris-acetato + EDTA). Questo nel tempo perde capacità tamponante perché si ha la separazione di cariche agli elettrodi. Viene quasi sempre utilizzato a una concentrazione 1X;
- il TBE (Tris-borato + EDTA) ha capacità tamponante superiore al TAE. E' stabile e quindi viene usato in corse elettroforetiche molto lunghe. L'unico difetto è che col tempo tende a precipitare. Può essere utilizzato a "mezza forza", cioè 0.5X, perché già a questa concentrazione ha un potere tamponante sufficiente;
- il TPE (Tris-fosfato + EDTA).

Il Tris contenuto nel tampone è un sale molto usato nei laboratori. Tampona tra pH 7 e pH 8, un range in cui il DNA si mantiene molto bene. L'EDTA, invece, è un chelante che sequestra ioni Mg^{2+} presenti in soluzione e che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi). Il suo potere tamponante è nullo rispetto a quello del Tris.

Prima di caricare il gel si aggiunge al campione un colorante con velocità di migrazione nota in modo da seguire istante per istante l'andamento dell'elettroforesi. Tale colorante è chiamato **Loading buffer (LB)** ed è costituito da:

- 0.25% Blu bromofenolo, che migra come un frammento di 300 bp in TBE 0.5X;
- 0.25% Xilene di cianolo, che migra come un frammento di 4000 bp in TBE 0.5X;
- 40% (w/v) saccarosio in acqua.

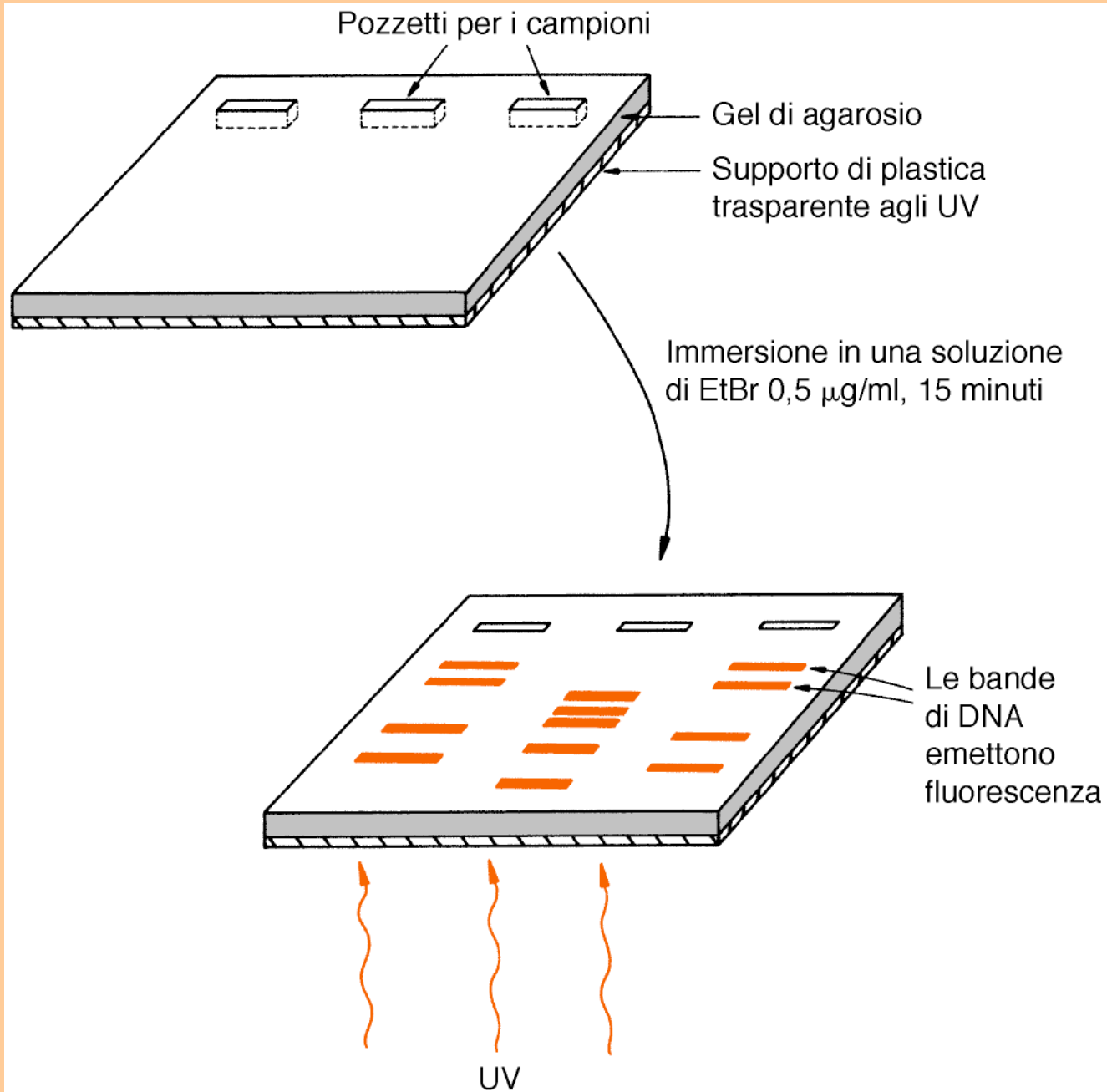
Spesso sul gel, durante il caricamento dei campioni, si riserva un pozzetto in cui verrà messo il *marker*. Questo è composto da una miscela di frammenti lineari di DNA i quali migrano nel gel in maniera nota. Ogni marker comprende un range di separazione. Per esempio l'*1Kb* contiene venti frammenti che si separano tra 0.1 e 10.0kb. In questo modo, confrontando il mio campione con il marker, posso dire più o meno che lunghezza ha il mio frammento.



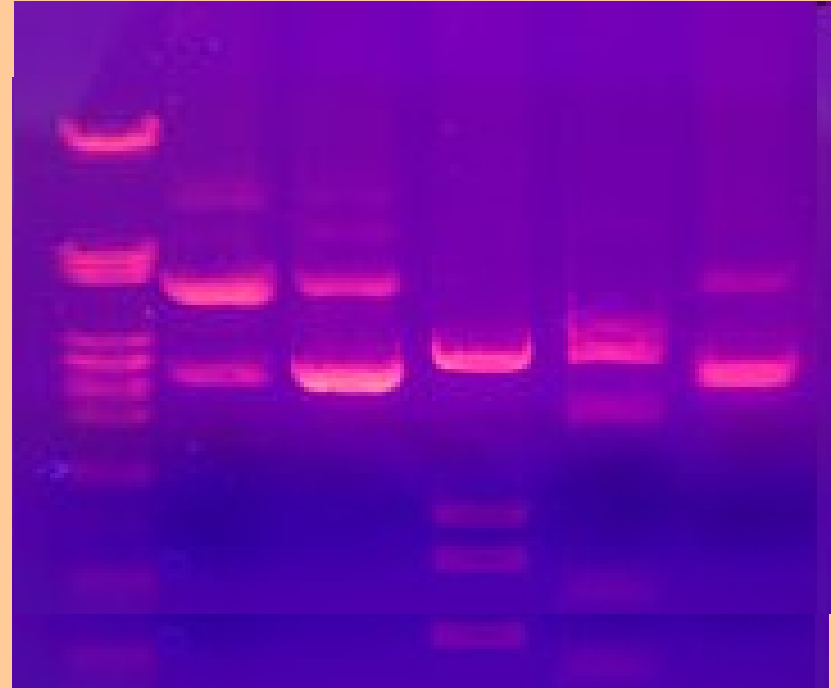
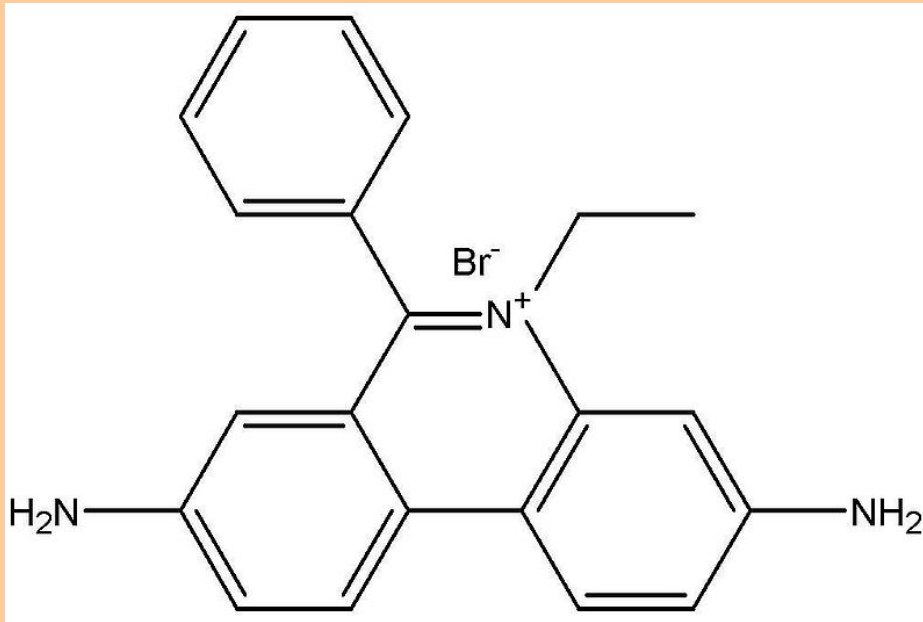
Il principio di funzionamento dell'elettroforesi consiste nel movimento di particelle cariche negativamente, DNA, RNA o proteine (saturate con Sodio-dodecilsolfato, SDS), in un campo elettrico verso il polo positivo (anodo). La separazione, come detto prima, avviene in base alle dimensioni e quindi alla massa della molecola. La distanza di migrazione è maggiore per molecole piccole le quali sono trattenute meno dalla maglia polisaccaridica formata dal gel.

Nell'esecuzione della corsa elettroforetica, si deve applicare una *differenza di potenziale* proporzionale alla distanza tra gli elettrodi. In particolare si applica un voltaggio di 3-5V/cm (calcolato come distanza tra i due elettrodi). Solitamente si utilizza voltaggio costante per i gel di agarosio e un amperaggio costante per quelli di poliacrilammide. Il voltaggio applicato deve essere circa 5V/cm perché se fosse maggiore si rischierebbe di scaldare il tampone di corsa e quindi di danneggiare il DNA, l'RNA o le proteine, a seconda delle molecole con cui si sta lavorando. Per ovviare a questo vengono usate vaschette che contengono un'elevata quantità di tampone di corsa. Nel caso di voltaggio costante, l'amperaggio non deve essere un fattore limitante e quindi si posiziona il cursore dei mA (milli Ampère) al massimo. Nel caso invece di amperaggio costante avremo il cursore del voltaggio al massimo e quello dell'amperaggio settato sul valore desiderato.

Importante è anche il *tempo* della corsa elettroforetica che è direttamente proporzionale alla risoluzione. Si può velocizzare il processo aumentando il voltaggio (o l'amperaggio) ma bisogna fare attenzione a non incorrere nei rischi detti precedentemente dovuti al calore prodotto per effetto Joule.

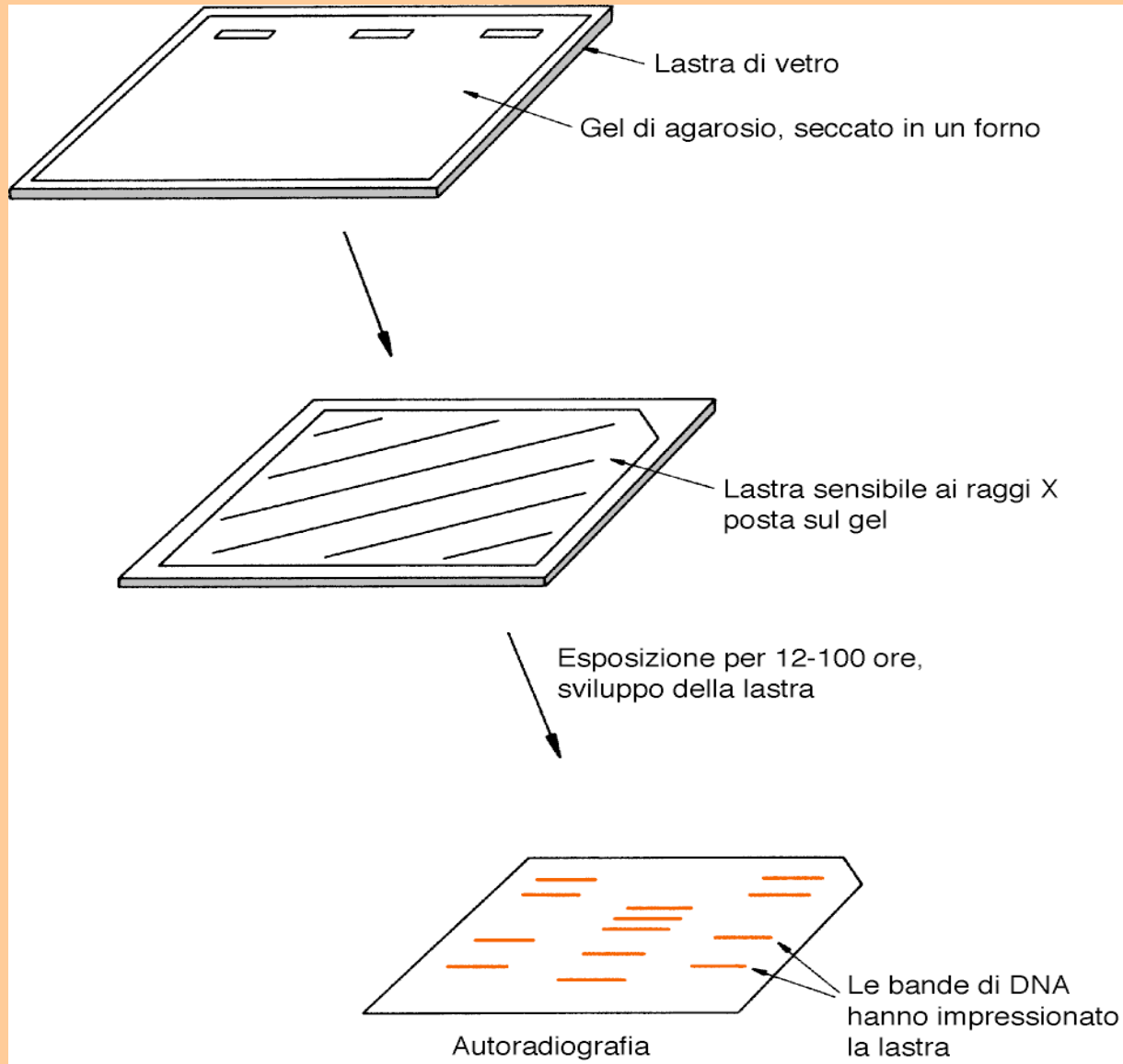


**Etidio bromuro: intercalante
si inserisce nella doppia elica
del DNA e diventa fluorescente**

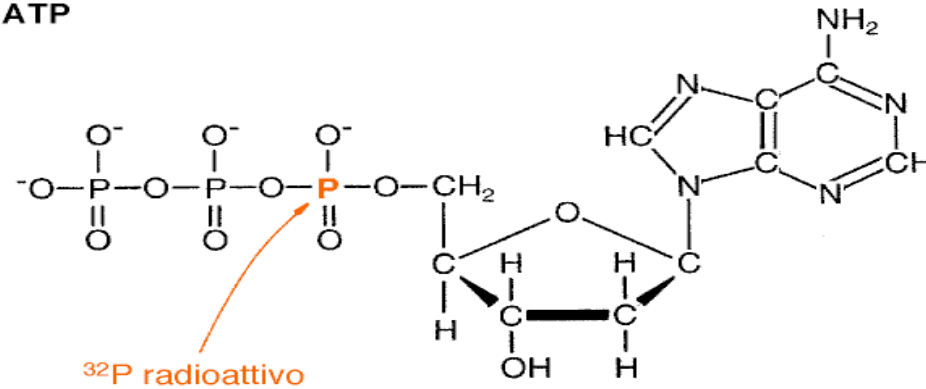


**Eliminato dai laboratori per la sua tossicità.
Oggi si usano analoghi meno tossici come il
SyberSafe**

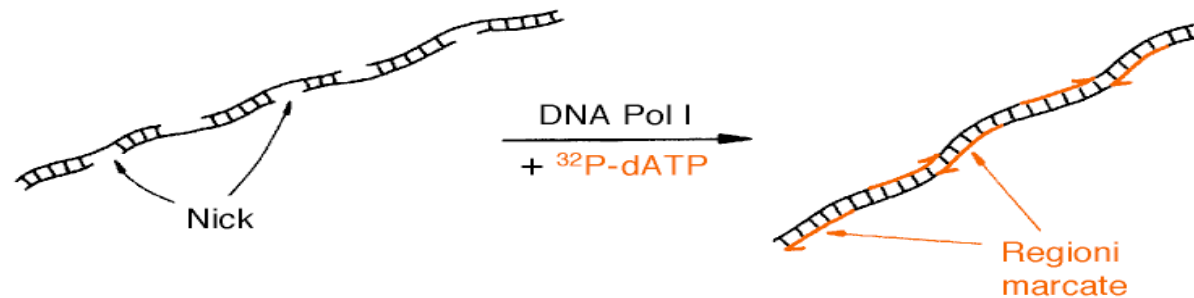
Visualizzazione mediante autoradiografia (con DNA marcato)



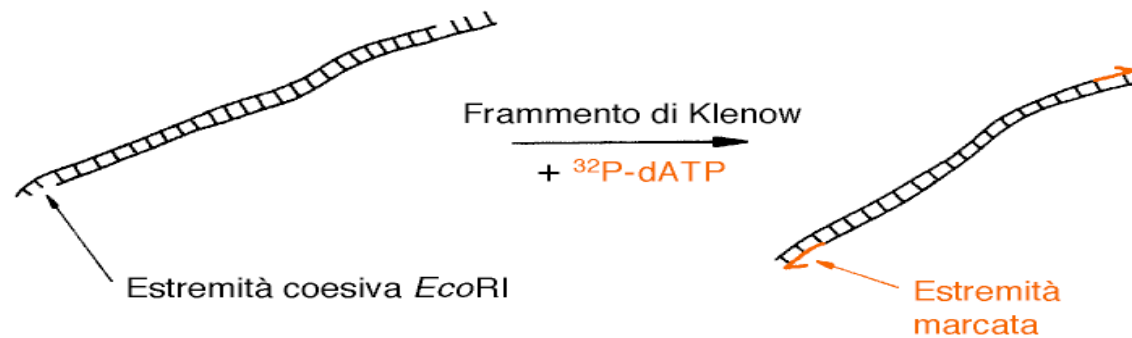
(a) [α - ^{32}P] dATP



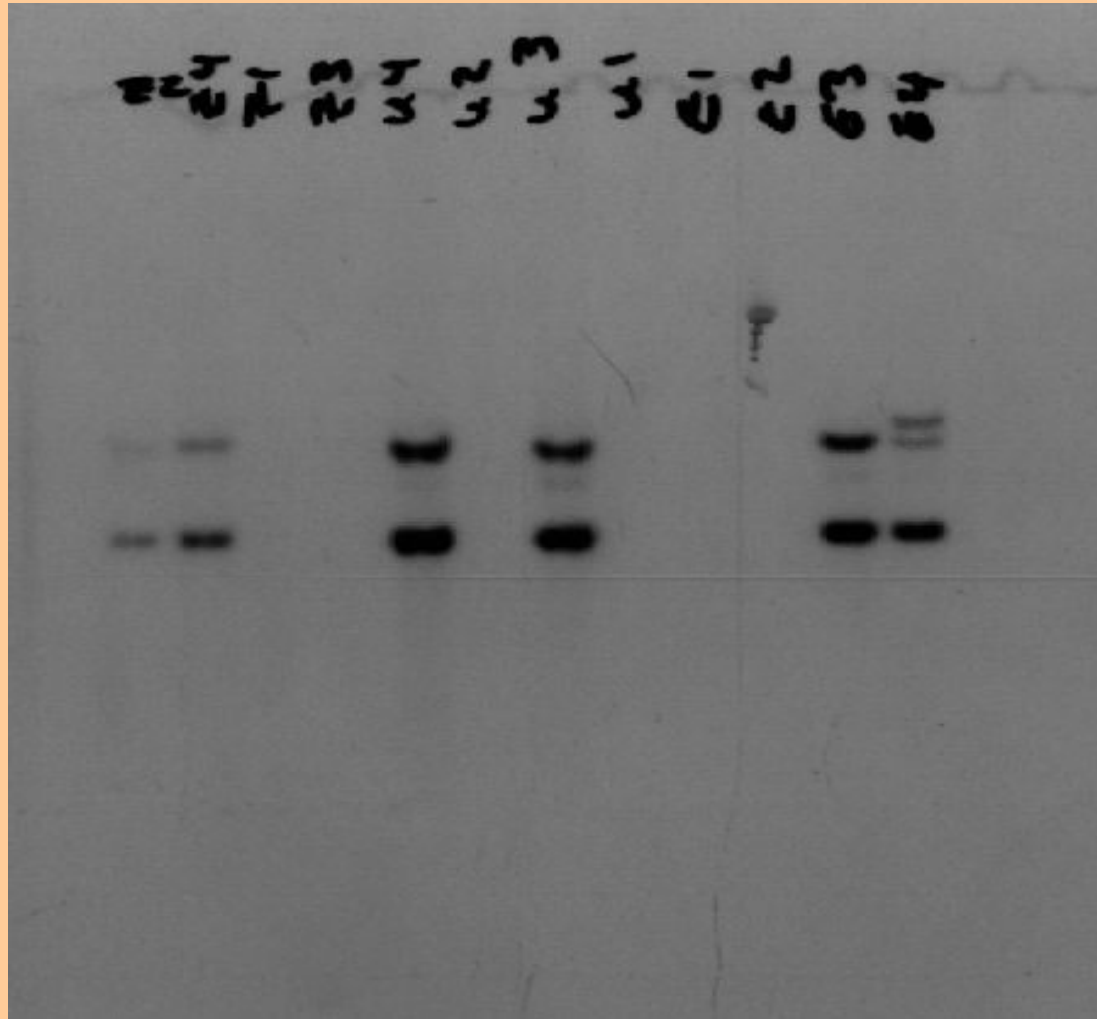
(b) Marcatura mediante nick translation

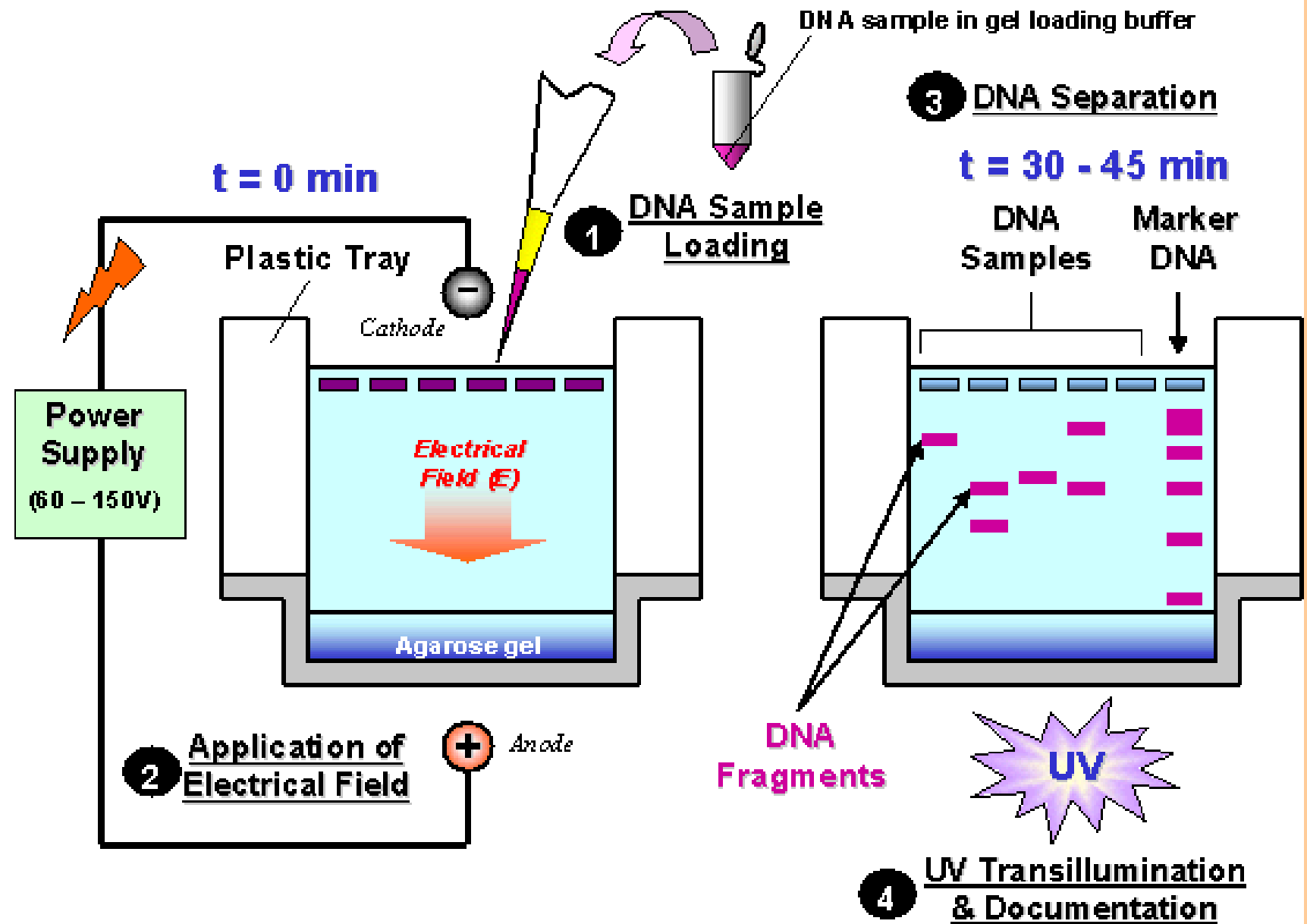


(c) Marcatura mediante end filling



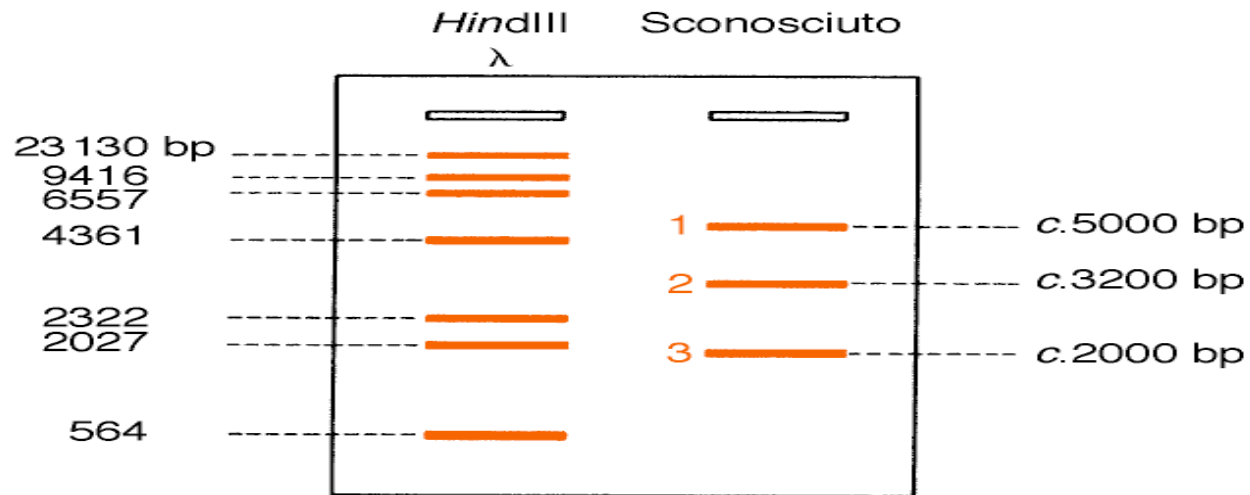
autoradiografia



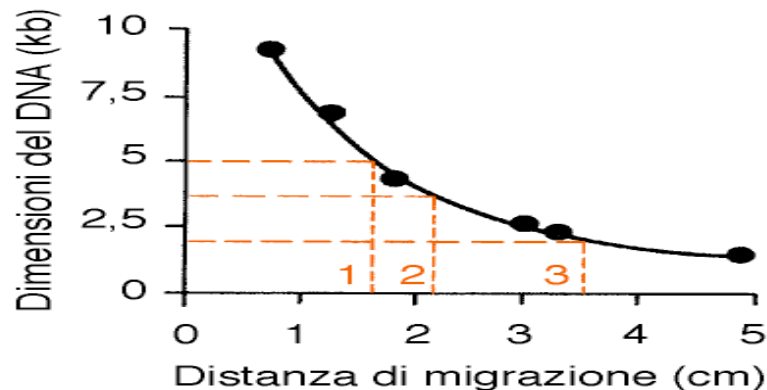


Determinazione del numero di basi (dimensioni dei frammenti di DNA)

(a) Stima approssimativa a occhio



(b) Stima grafica accurata



Quantificazione del DNA

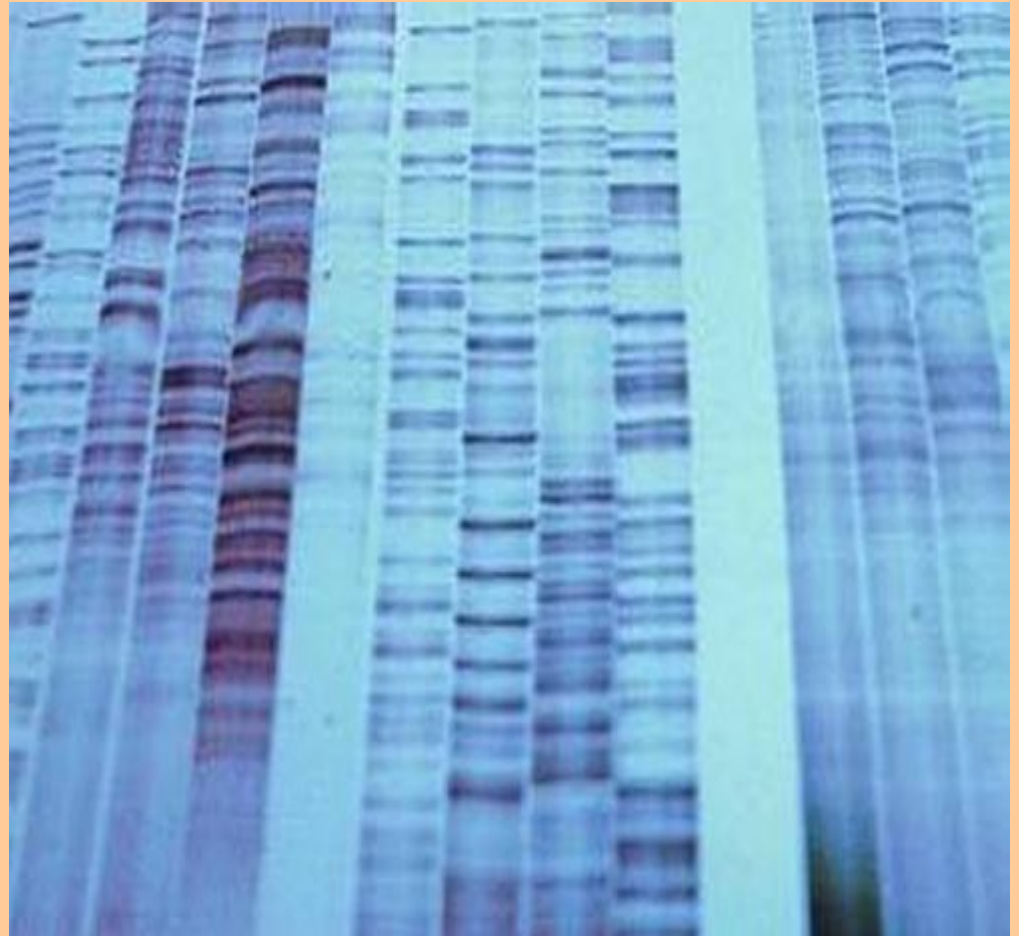
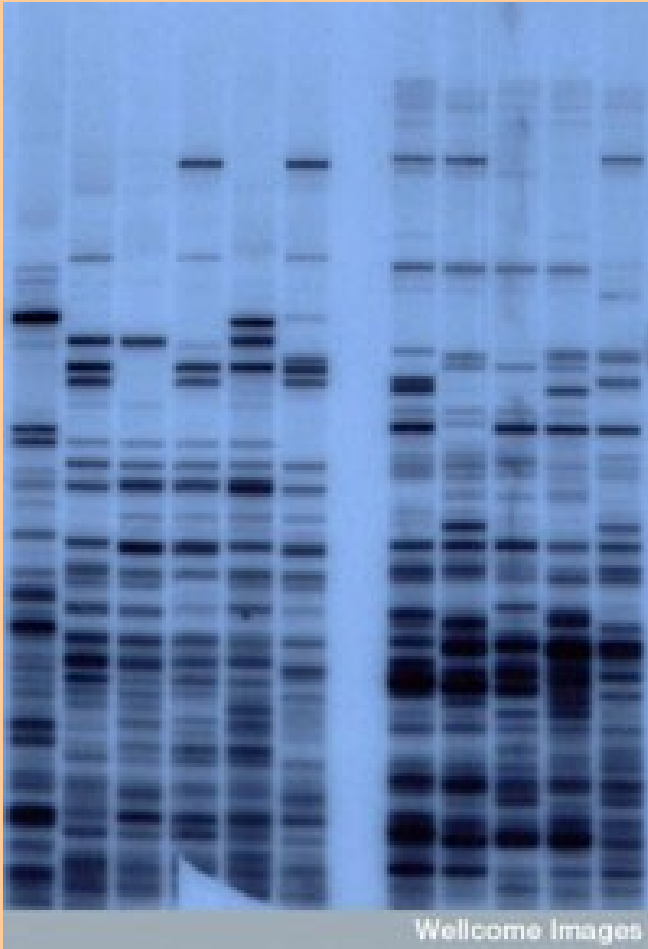
- Direttamente da gel di agarosio: quantità minima rilevabile: circa 10 ng.

- Assorbimento a 260 nm: 1 unità di assorbanza:

DNA a doppia elica: 1 Unità assorbimento = 50ug/ml

$$\text{Concentrazione DNA (ug/ml)} = A_{260\text{nm}} \times 50\text{ug/ml}$$

Elettroforesi del DNA su gel di poliacrilammide



RESTRIZIONE DEL DNA

Reazione di taglio

Per il taglio con enzimi di restrizione è importante non usare concentrazioni di DNA superiori a $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (es.: $1\mu\text{g}$ di DNA in $10\mu\text{l}$ di volume finale di reazione). Se si deve caricare su gel grandi quantità di DNA, digerire in un volume adeguato e poi precipitare con alcool e risospendere nel volume di caricamento.

1. Aggiungere 1/10 del volume finale di tampone 10x per l'enzima di restrizione da utilizzare.

Il tampone ricrea un ambiente adatto all'azione dell'enzima di restrizione: quest'ultimo è un'endonucleasi e quindi necessita di ioni Mg^{++} . Poiché generalmente il DNA è risospeso in TE (contenente EDTA, un chelante di ioni bivalenti) i tamponi contengono un eccesso di ioni Mg^{++} in modo da usare l'EDTA e da lasciare in soluzione una quantità di ioni sufficiente all'enzima. 1mM di EDTA è sufficiente a complessare il Mg^{++} in soluzione ma non tanto da complessare anche il Mg^{++} che serve quando dobbiamo usare degli enzimi di restrizione.

Il tampone è composto di Tris, Mg^{++} e stabilizzatori dell'attività enzimatica che permettono di evitare tagli aspecifici. Usare il tampone appropriato per l'enzima di restrizione (anche se magari il tampone è di una ditta e l'enzima di un'altra: l'importante è che i due corrispondano): l'utilizzo di un tampone non specifico può comportare attività enzimatica aspecifica (per questo è importante testare i tamponi universali prima di prove importanti).

In caso di taglio con due enzimi di restrizione diversi, utilizzare un tampone che assicuri almeno 50% di efficienza per entrambi gli enzimi (cfr tabelle dei cataloghi delle ditte di produzione dei tamponi). Se l'efficienza è minore, è preferibile utilizzare il primo enzima in un tampone appropriato, precipitare il DNA, lavarlo, risospenderlo e procedere al taglio con il secondo enzima nel nuovo tampone.

Come la maggiorparte delle aziende che oggi operano sul mercato, New England Biolab (www.neb.com) fornisce 4 tamponi con caratteristiche leggermente diverse. Ogni enzima funziona bene con almeno uno di essi ed è generalmente possibile trovare un tampone che permetta l'attività dei due enzimi che si impiegano nel caso di digestioni multiple.

2. Aggiungere 1 µl di enzima di restrizione.

L'enzima viene aggiunto per ultimo nella soluzione perché funziona solo se sono già presenti DNA, TE (o H₂O) e tampone.

Gli enzimi si misurano come unità di attività. 1 o 2 unità sono la quantità necessaria per tagliare 1 µg di DNA di Fago λ in 30 minuti (bastano poche unità perché è DNA lineare e corto, quindi è facile da tagliare e il numero di siti riconosciuti dall'enzima sono pochi). Nel DNA plasmidico (superavvolto) o genomico i siti di restrizione sono di più e possono essere nascosti per cui di solito si usano 5-8 unità di enzima per ogni µg di DNA da tagliare e servono tempi più lunghi, fino a 3 ore. E' da notare che, nei plasmidi superavvolti, l'enzima fatica a tagliare i siti di restrizione mascherati dai superavvolgimenti. Dopo i primi tagli la struttura si rilassa esponendo così tutti i siti di restrizione del DNA.

Si considera che in 10 µl può essere tagliato al massimo 1 µg di DNA. Quando taglio DNA plasmidico (circolare) che ha un solo sito di restrizione per l'enzima utilizzato, sul gel di agarosio trovo una sola banda. Se taglio invece DNA genomico che ha molti siti di taglio per lo stesso enzima, sul gel risulta una strisciata con gradiente crescente dal basso verso l'alto poiché dal taglio si formano in maggioranza lunghi frammenti di DNA. La visualizzazione su gel di agarosio di un frammento di DNA richiede almeno 20 picogrammi. Per la visualizzazione di DNA genomico tagliato con un enzima di restrizione sono invece necessari di almeno 2 µg, che posso ottenere precipitando con isopropanolo e NaOAc 3M, seguito da un lavaggio in etanolo e alla fine risospeso in 10-15 µl di TE.

Gli enzimi di restrizione sono forniti di glicerolo (crioprotettore) e conservati a -20°C. Durante la procedura devono essere tenuti in ghiaccio. Per diluirli - se necessario - si utilizza il tampone di reazione ad una concentrazione 1X; una volta diluiti non è possibile conservarli per più di qualche ora. Di solito le case fornisco gli enzimi a circa 12-20 unità per µl.

3. Incubare per 1h a 37°C (3h per DNA genomico).

Se dopo questo tempo il DNA non risulta tagliato completamente, conviene ripetere l'estrazione, non la digestione, perché il DNA contiene evidentemente impurità.

Alcuni enzimi hanno bisogno di temperature più basse di 37°C (es. *Sma*I taglia a temperature inferiori a 25°C) per cui prima di usare ogni enzima, assicurarsi sempre di quali sono le sue condizioni ottimali di utilizzo.

Gli enzimi di restrizione posso avere la cosiddetta "star activity", un fenomeno che si presenta se l'enzima è in attività per un tempo prolungato (es. over-night). Quando l'enzima perde le sue capacità funzionali o è in condizioni non idonee, comincia a tagliare in modo aspecifico. Per questo motivo gli enzimi vengono usati con il tampone appropriato e mai oltre le 3 ore.

Restrizione del DNA

Digestione del plasmide pUC18 con l'enzima di restrizione EcoR I.

Preparare la reazione di digestione e il controllo negativo:

(L'acqua va aggiunta per prima e l'enzima per ultimo!)

Reazione:

10 μ l pUC18
1 μ l EcoRI (enzima di restrizione)
2.5 μ l buffer 10X
11.5 μ l H₂O

25 μ l

Controllo negativo (senza enzima):

10 μ l pUC18
- -
2.5 μ l buffer 10X
12.5 μ l H₂O

25 μ l

Le digestioni vanno lasciate per 1-2 ore a 37°C.

Preparazione TAE 50X (50 ml)

Per preparare il TAE 50X:

- 1) Pesare 12.2 g di Tris base
- 2) Aggiungere 2.8 mL di acido acetico glaciale (sotto la cappa chimica)
- 3) Aggiungere 5 mL di EDTA 0.5 M pH 8.0
- 4) Portare a volume con acqua distillata

Preparazione gel di agarosio 0.8% (un gel ogni 2 gruppi)

Pesare la quantità necessaria di agarosio per un gel allo 0.8%, aggiungere il TAE 1X e portare a volume.

Ricetta:

0.6 g agarosio
1.6 ml TAE 50X
78.4 ml H₂O

80 ml

Scaldare nel forno a microonde in una beuta senza fare bollire e mescolare ogni tanto per sciogliere bene l'agarosio. Aspettare qualche minuto e aggiungere **5 µl di SyberSafe**; mescolare e versare nell'apposita vaschetta precedentemente preparata.

Il gel solidificato va posto nella vaschetta di corsa senza il pettinino e coperto con 250 ml di buffer di corsa (TAE 1X).

Campioni da caricare:

- 25µl pUC18 digerito (+ 5 uL Sample Buffer)
- 25µl pUC18 non digerito (+ 5 uL Sample Buffer)
- 25 ul RNA totale (+ 5 uL Sample Buffer)

-Aggiungere poi in un altro pozzetto 5 uL di DNA ladder (marcatore di pesi molecolari).

-Impostare nell'alimentatore il voltaggio per la corsa elettroforetica (90 – 100 V).

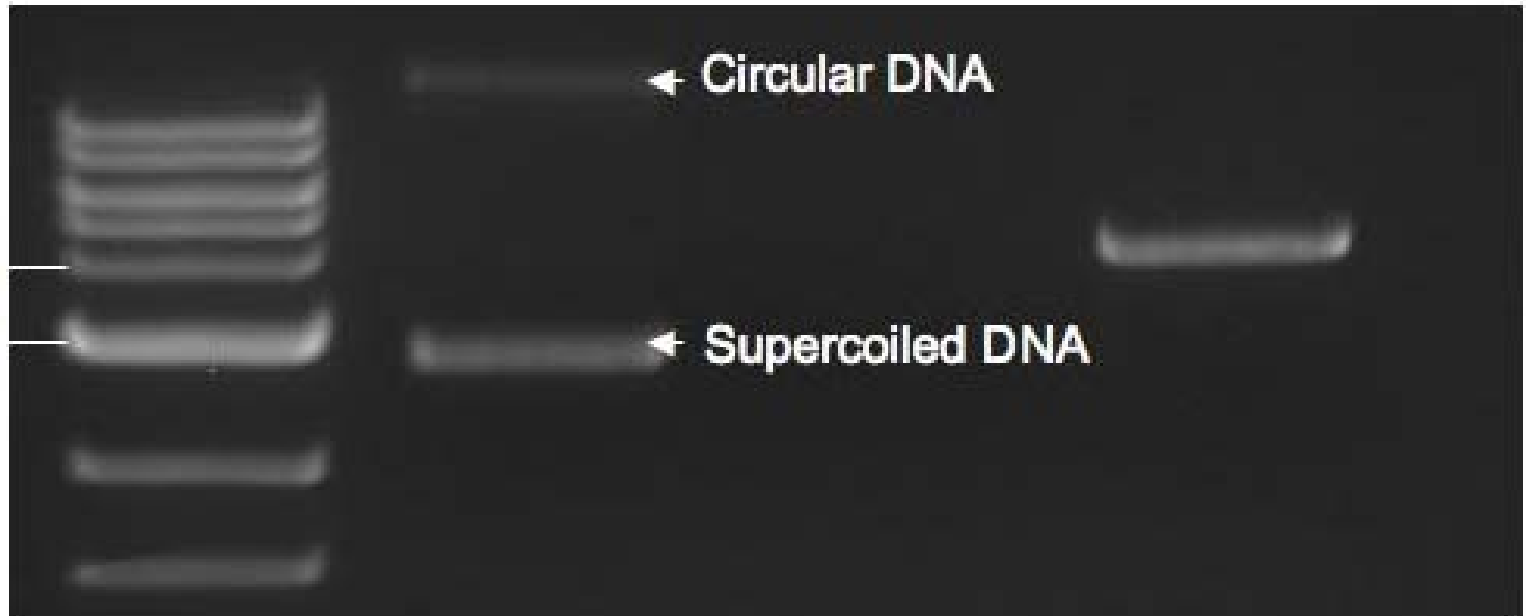
Marker

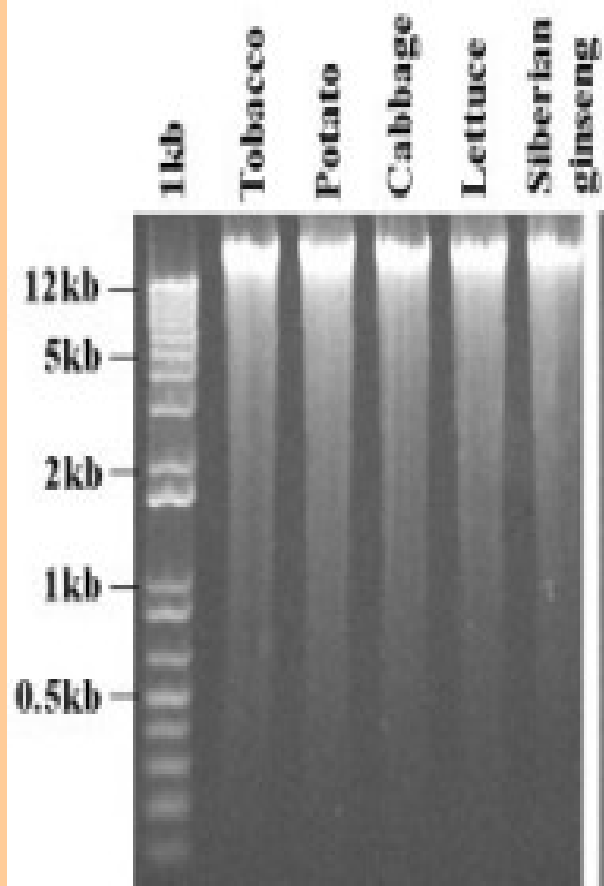
Undigested
Plasmid

Digest
Product

4 kb

3 kb



A**B**