

***Reazione a catena della
polimerasi (PCR) e
sequenziamento del DNA***



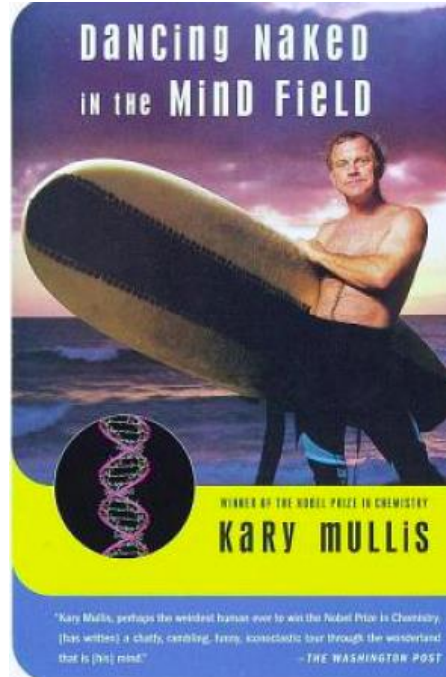
L'impatto della scoperta dei batteri termofili nelle biotecnologie

La DNA polimerasi dei batteri termofili è stabile ad alte temperature

Kary Mullis, premio Nobel per la Chimica nel 1993 per aver messo a punto la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR)



Dr. Mullis, shown here in 1998, shared the 1993 Nobel Prize in chemistry. (Joel Richardson/The Washington Post)

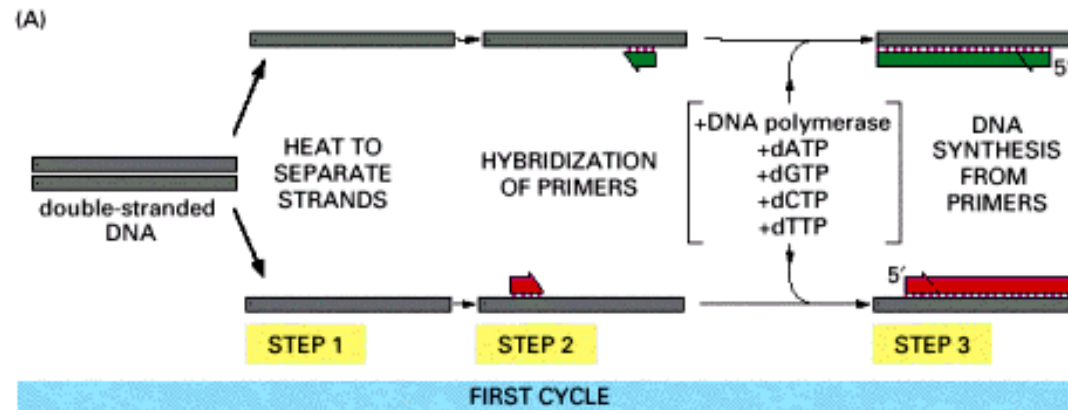


POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

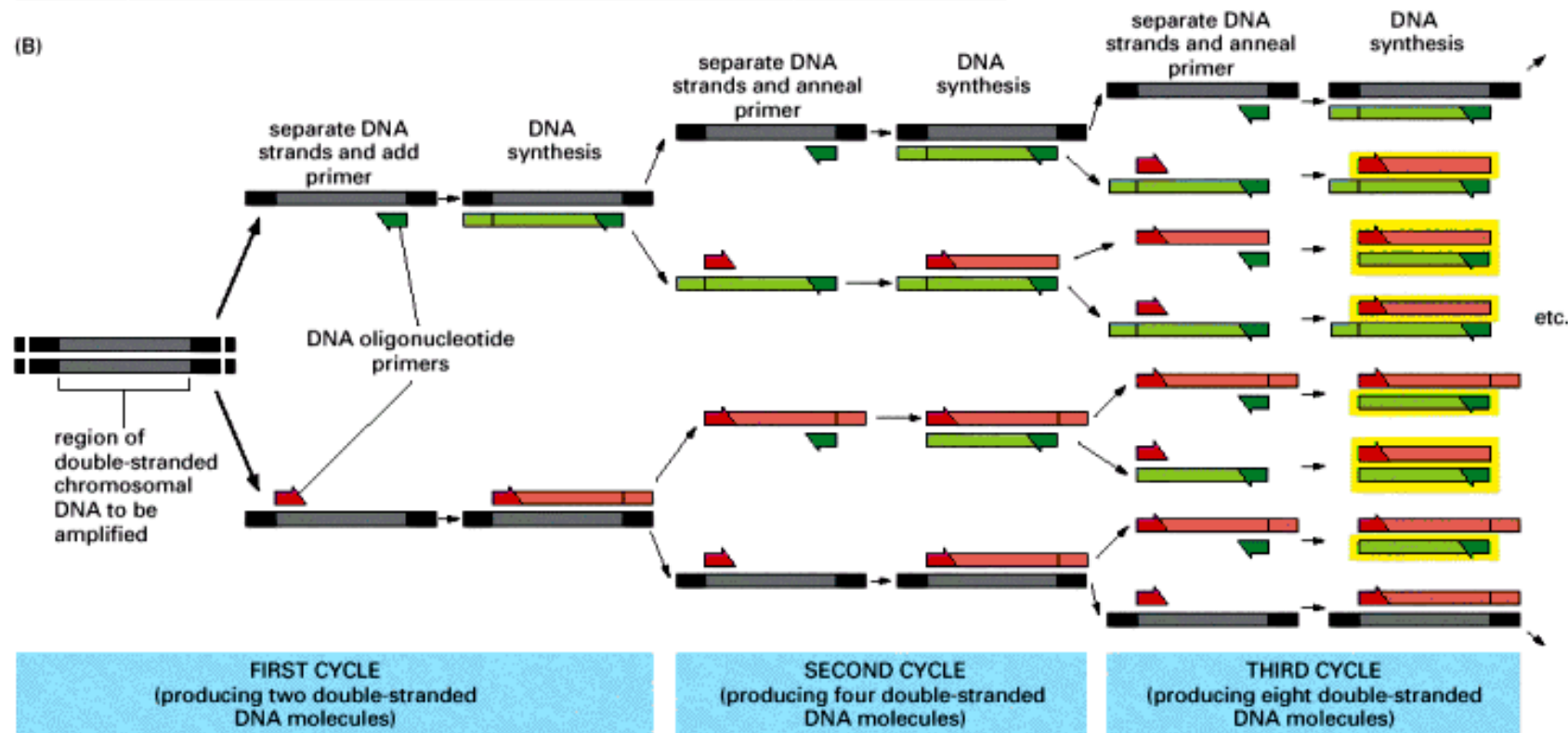
- E' una metodica attraverso la quale riusciamo ad ottenere elevate quantità di DNA attraverso la ripetizione di numerosi cicli nei quali la temperatura raggiunge i 95°C.
- Questa metodica è stata sviluppata grazie alla scoperta di DNA polimerasi che mantengono la struttura, e pertanto la funzione, anche a temperature elevate.

“I was working for Cetus, making oligonucleotides. They were heady times. Biotechnology was in flower and one spring night **while the California buckeyes were also in flower I came across the polymerase chain reaction.** I was driving with Jennifer Barnett to a cabin I had been building in northern California. She and I had worked and lived together for two years. She was an inspiration to me during that time as only a woman with brains, in the bloom of her womanhood, can be. That morning she had no idea what had just happened. **I had an inkling. It was the first day of the rest of my life...**”

Step 1: denaturazione (95°C)- step 2: *annealing* (58-72 °C)- step 3: sintesi (72 °C)



Principio di
funzionamento
della PCR



Il numero di cicli dipende dalla quantità di materiale di partenza (in genere 35-40 cicli sono sufficienti)

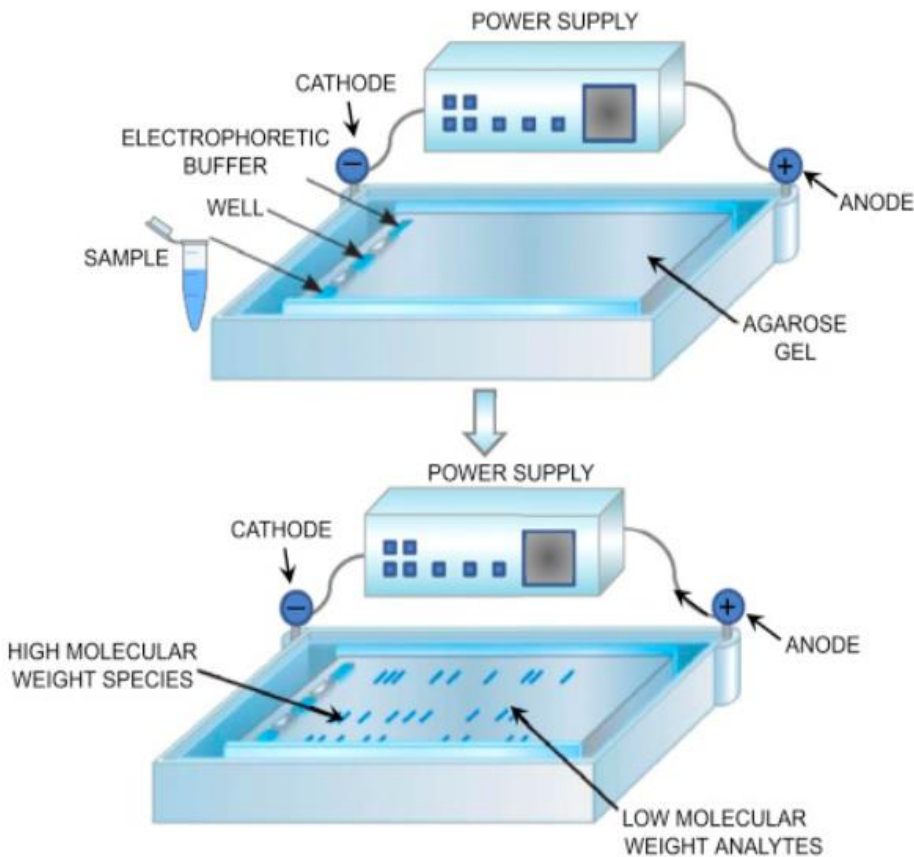
I primi utilizzatori dovevano eseguire manualmente **tutti i passaggi necessari della PCR**.

Molti di questi passaggi richiedevano di **spostare ripetutamente il campione di DNA tra tre grandi bagni d'acqua a diverse temperature**.

L'invenzione di una **macchina tutto-in-uno (termociclatore)**, in grado di **automatizzare il processo di PCR**, ha cambiato la storia della ricerca in biologia molecolare.



Come faccio a sapere se la PCR ha funzionato?



Gel d'agarosio

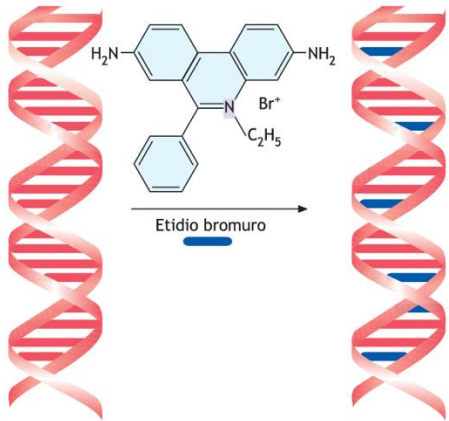
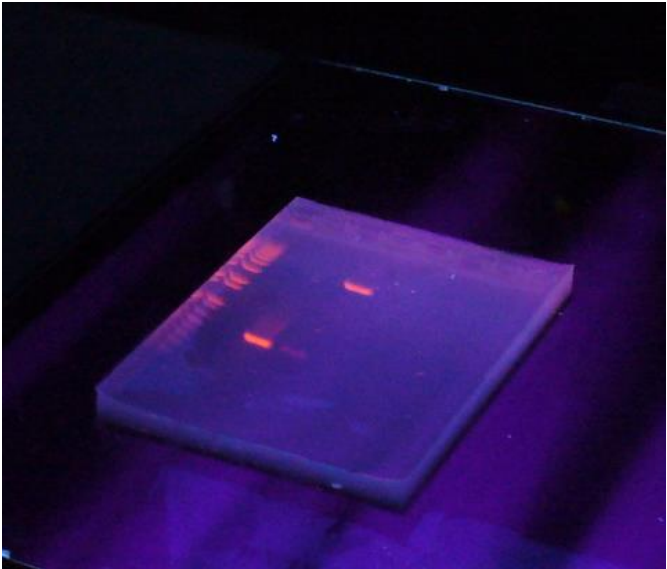
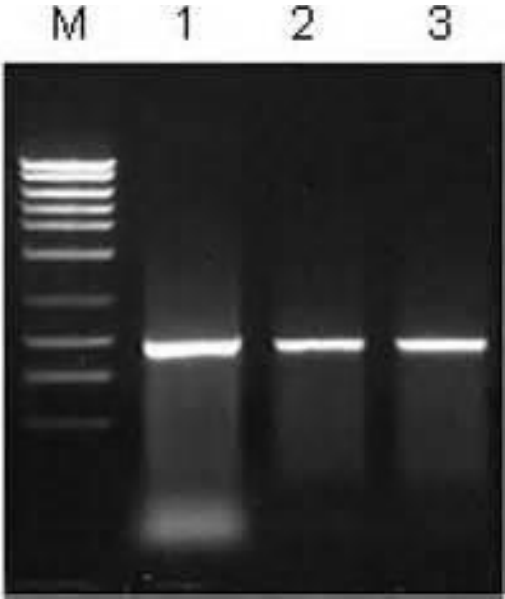
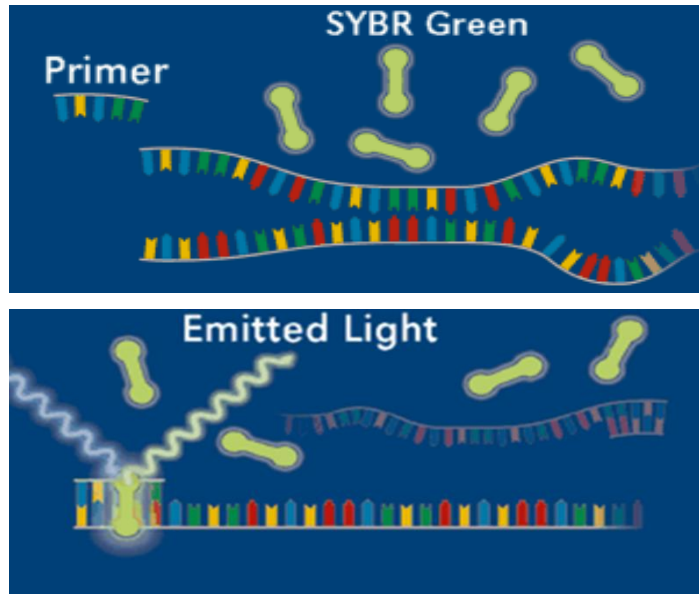


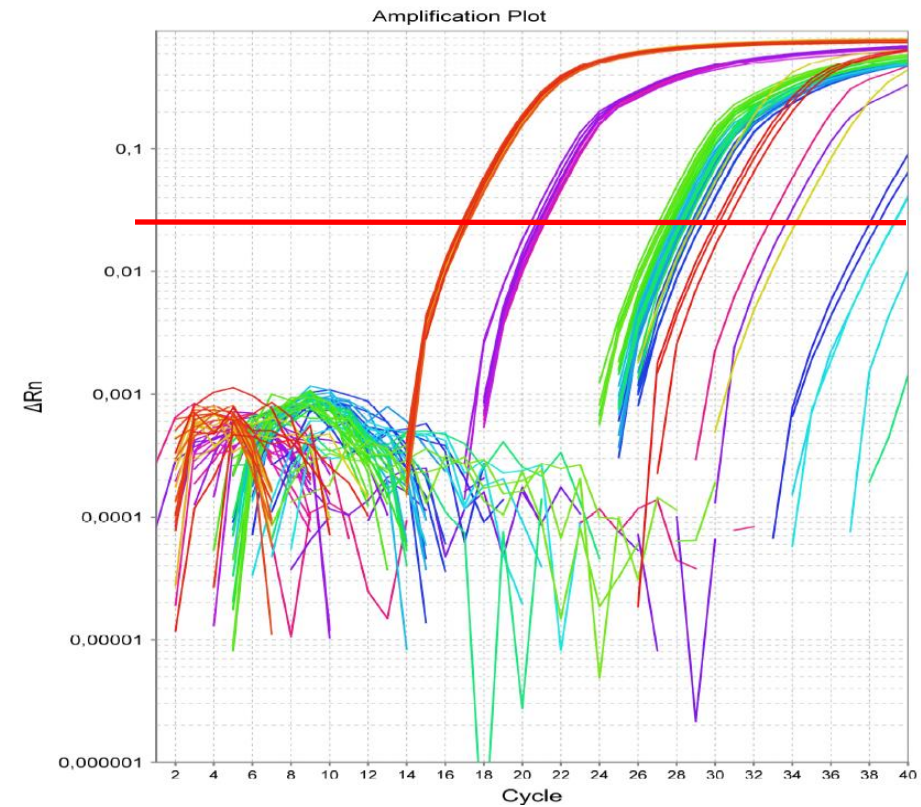
FIGURA I.12.1.2 Il legame dell'etidio bromuro al DNA. L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato con luce ultravioletta.



Real-time PCR



Ct: threshold cycle



Impiego della PCR

- Per scopi di ricerca di base (**clonaggio di un gene**)
- Oncologia: valutazione della **malattia minima residua** dopo una nuova terapia mirata contro specifici difetti molecolari
- Oncologia: **positività HPV** nel Pap-test della cervice uterina
- Virologia: rilevamento **SARS-CoV2**
- Utilizzando **l'impronta digitale del DNA**, piccoli frammenti di DNA possono essere isolati da una scena del crimine e confrontati con un enorme database di DNA.

Analisi forensi:

Amplificazione PCR di brevi sequenze ripetute in tandem (STR) – regioni altamente **polimorfiche** che contengono **brevi sequenze ripetute** (da 2 a 6 basi ripetute).



RNA 5' 2161 agagaagttt aaggaaggtg tagagtttct tagagacggt tgggaaattg ttaaatttat
2221 ctcaacctgt gcttgtgaaa ttgtcgggtg acaaattgtc acctgtgcaa aggaaattaa
2281 ggagagtgtt cagacattct ttaagcttgt aaataaattt ttggctttgt gtgctgactc
2341 tatcattatt ggtggagcta aacttaaagc cttgaattta ggtgaaacat ttgtcacgca
2401 ctcaaaggga ttgtacagaa agtgtgttaa atccagagaa gaaactggcc tactcatgcc 3'

RNA 5' agagaagttt aaggaaggtg tagagtttct tagagacggt tgggaaattg ttaaatttat 3'
cDNA 3' tctcttcaaa aatttaaata 5' (primer reverse)
5' agagaagtt 3' (primer forward)

1) RNA a cDNA : **trascrittasi inversa**

2) Amplificazione del cDNA Taq polimerasi

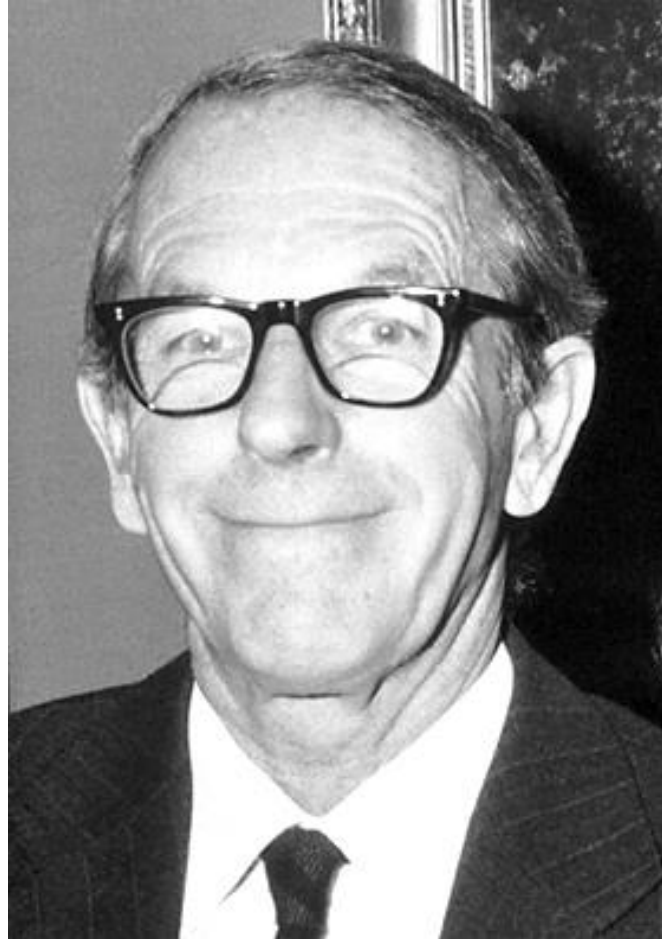
In questo caso il prodotto della PCR è 60 bp!!!
(varia tra 60 and 300)

PCR per misurare i livelli di espressione
genica (necessaria la trascrittasi inversa)

La **sequenza del DNA** (o **sequenza del filamento di DNA**) indica l'ordine preciso delle **basi azotate** che compongono la molecola di DNA

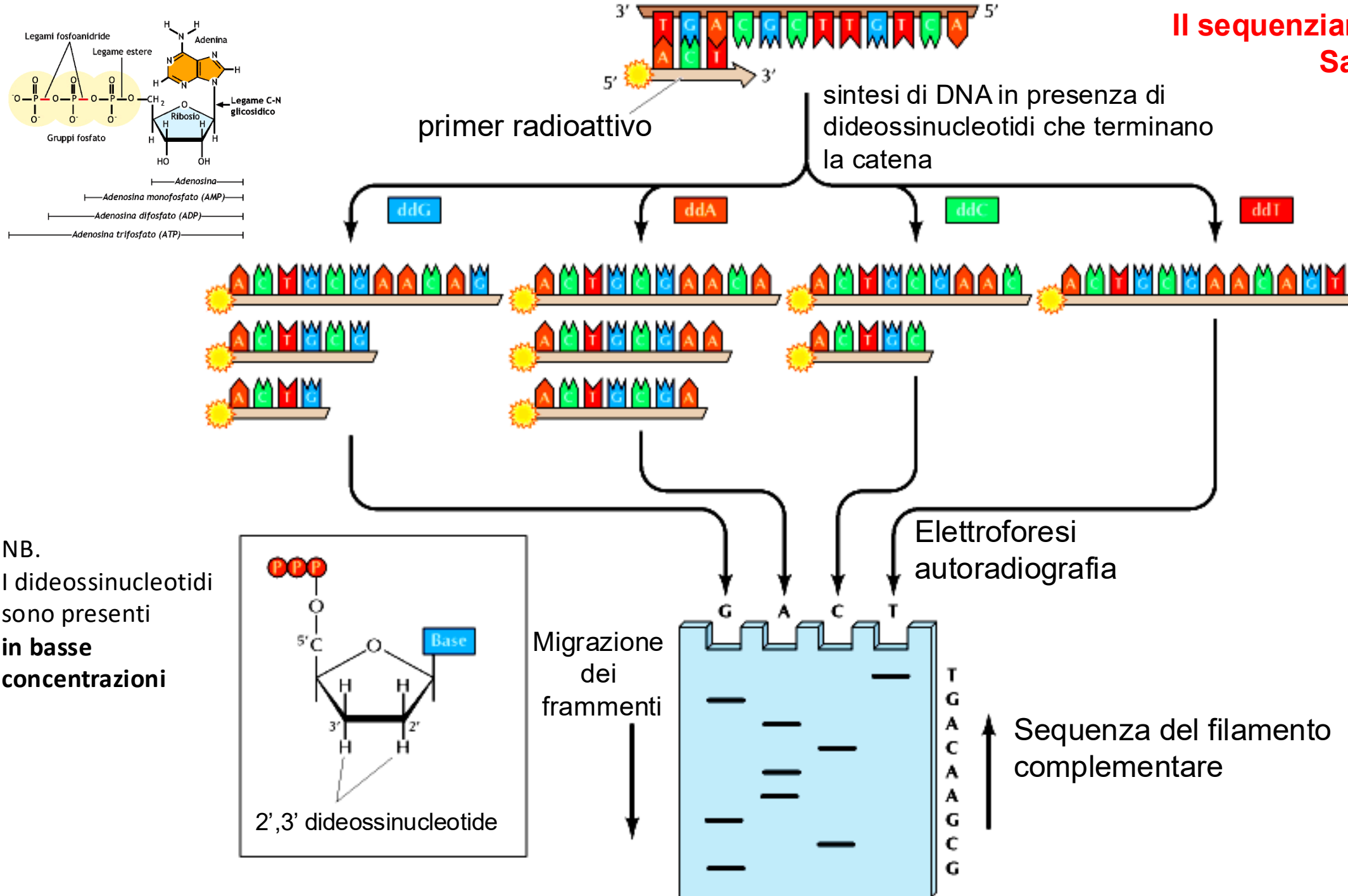


Sequenziamento del DNA

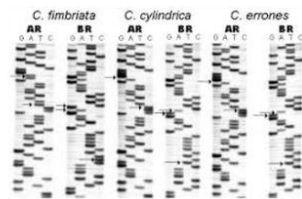
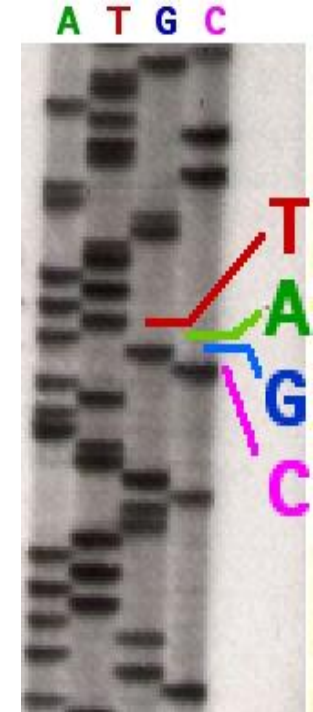
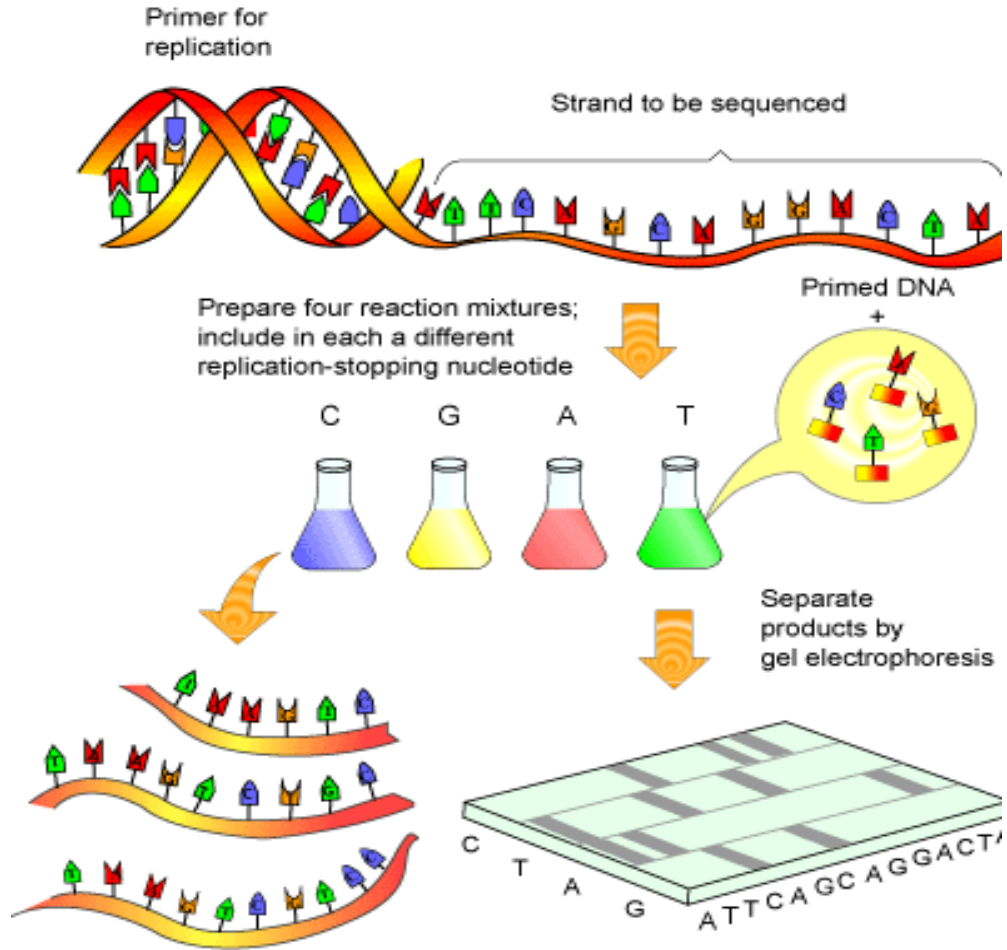


**The Nobel Prize in Chemistry 1980
Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick Sanger**

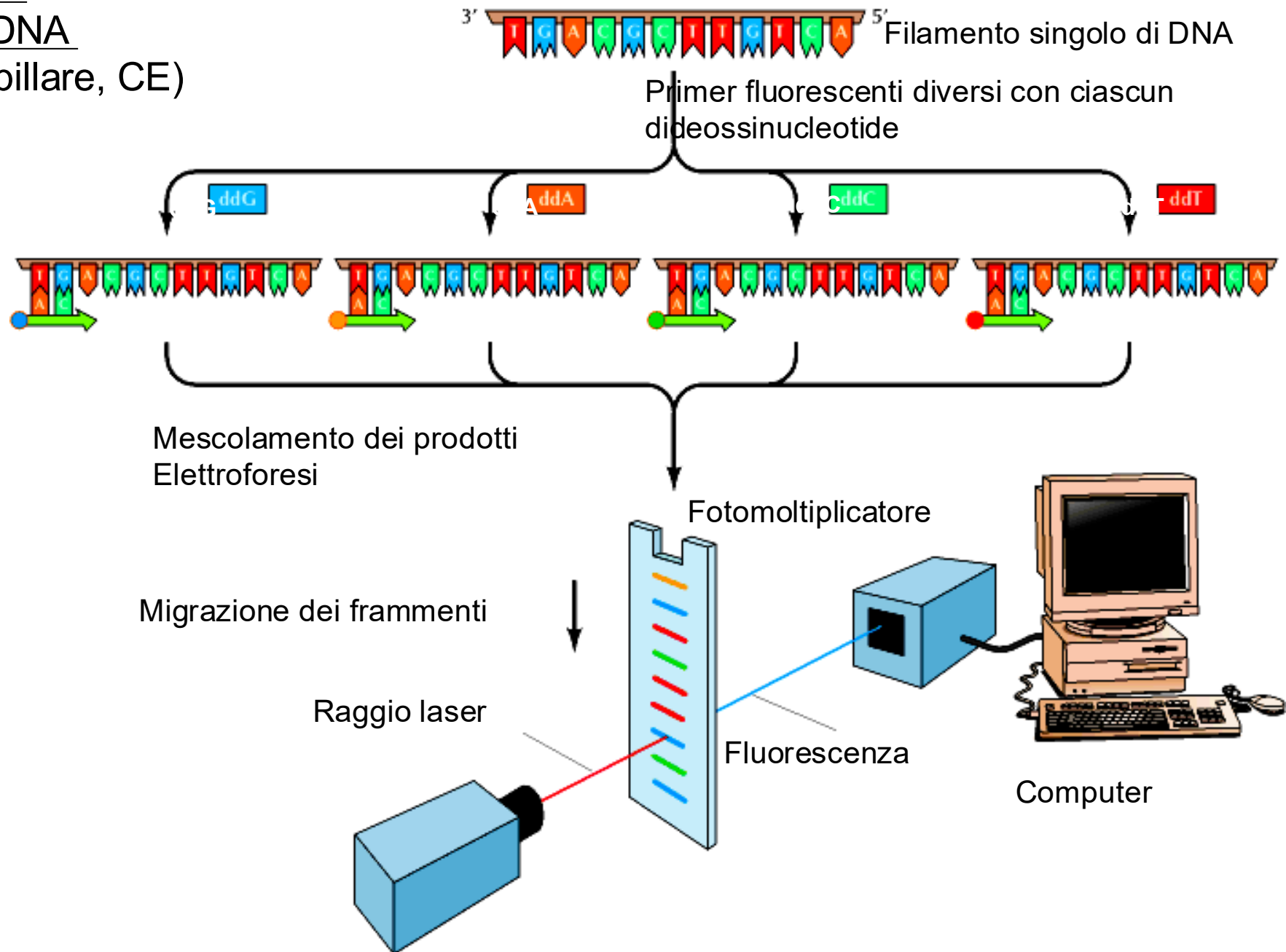
Il sequenziamento secondo Sanger



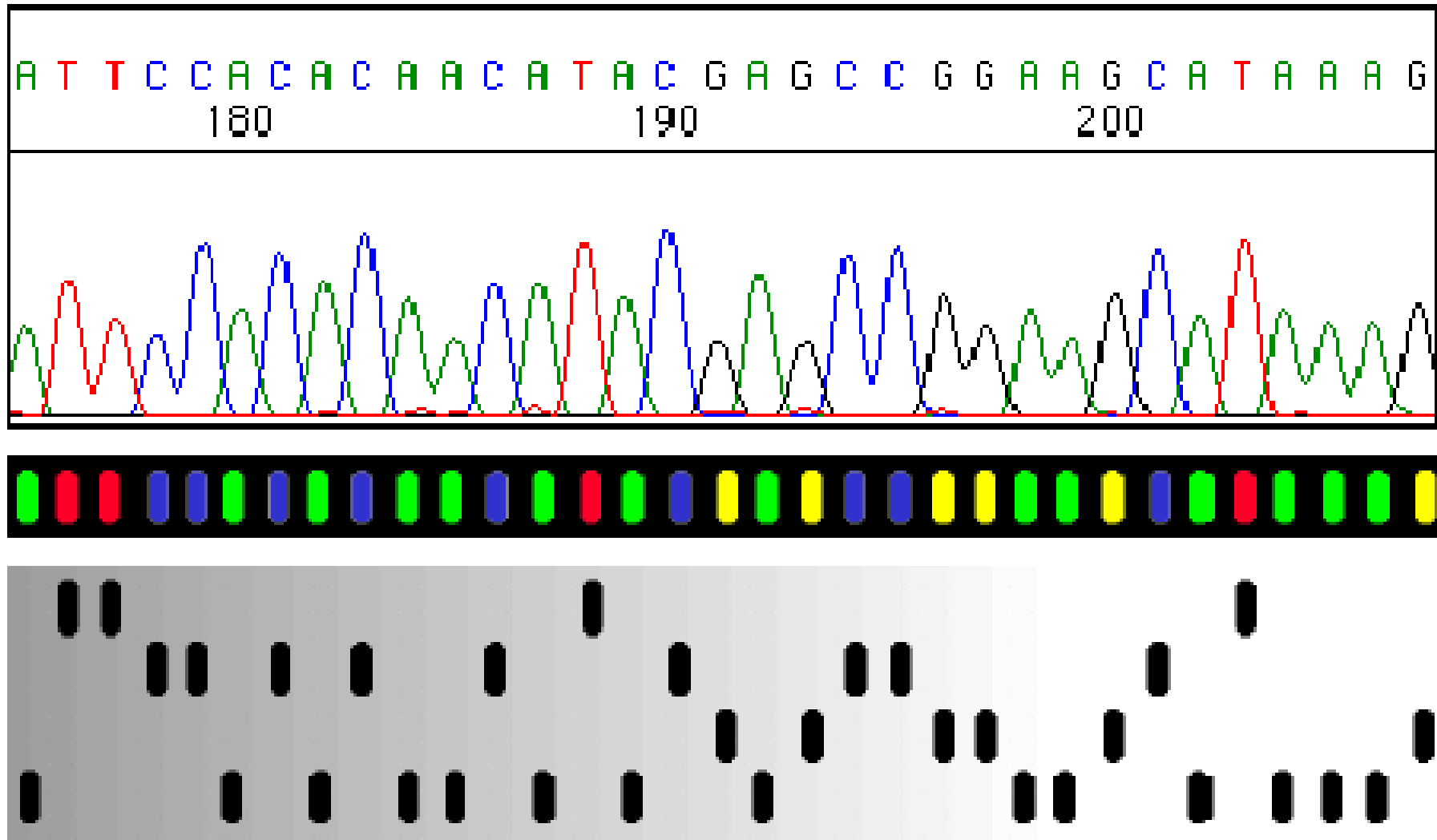
Elettroforesi su gel di acrilammide per leggere la sequenza del DNA



Sequenziamento
automatico del DNA
(elettroforesi capillare, CE)



Il sequenziamento automatico del DNA

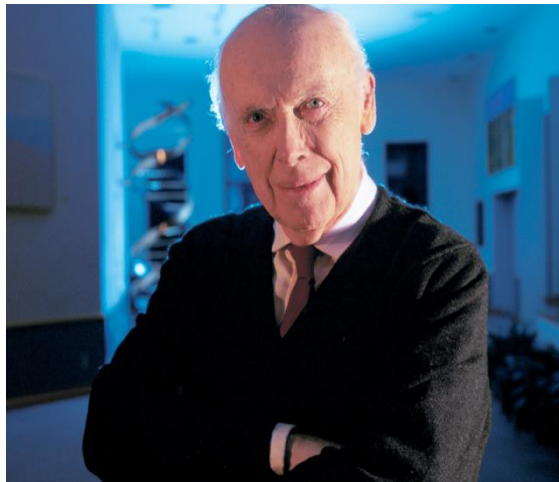


Human Genome Project

Il **Progetto Genoma Umano (HGP)** si riferisce allo sforzo internazionale, iniziato ufficialmente nell'**ottobre 1990** e completato nel **2003**, con gli obiettivi di:

- determinare la **sequenza completa del genoma umano**
- individuare tutti i **circa 20.000–25.000 geni umani stimati**
- **rendere disponibili** queste informazioni per ulteriori studi biologici

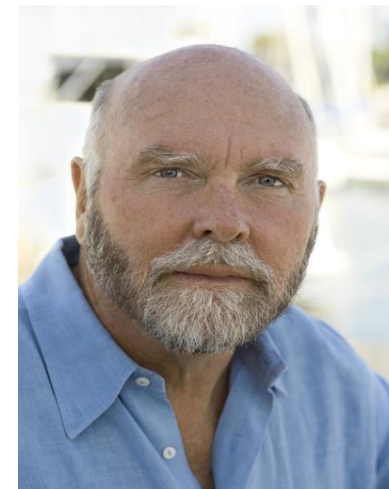
James Watson



Francis Collins (NIH)



John Craig Venter (Celera)



NEXT GENERATION SEQUENCING:

Come sequenziare centinaia di milioni di brevi sequenze (35–100 bp) in un'unica corsa

- **Progetto Genoma Umano – 2003:** ha richiesto 13 anni e 3 miliardi di dollari (CE)
- **Sequenziamento del genoma di Watson tramite tecnologia 454 (NGS) nel 2007** realizzato in circa 2 mesi: 2 milioni di dollari
- **Il sequenziamento di un genoma oggi richiede da poche ore a giorni e costa circa 300-1000 euro**

The complete sequence of a human genome

SERGEY NURK [ID](#), SERGEY KOREN [ID](#), ARANG RHIE [ID](#), MIKKO RAUTIAINEN [ID](#), ANDREY V. BZIKADZE [ID](#), ALLA MIKHEENKO, MITCHELL R. VOLLGER [ID](#),

NICOLAS ALTEMOSE [ID](#), LEV URALSKY [ID](#), [...], AND ADAM M. PHILLIPPY [ID](#) [+90 authors](#) [Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE • 31 Mar 2022 • Vol 376, Issue 6588 • pp. 44-53 • DOI: 10.1126/science.abcj6987

572,017 393



Addressing the remaining 8% of the genome, the Telomere-to-Telomere (T2T) Consortium presents a complete 3.055 billion–base pair sequence of a human genome, T2T-CHM13



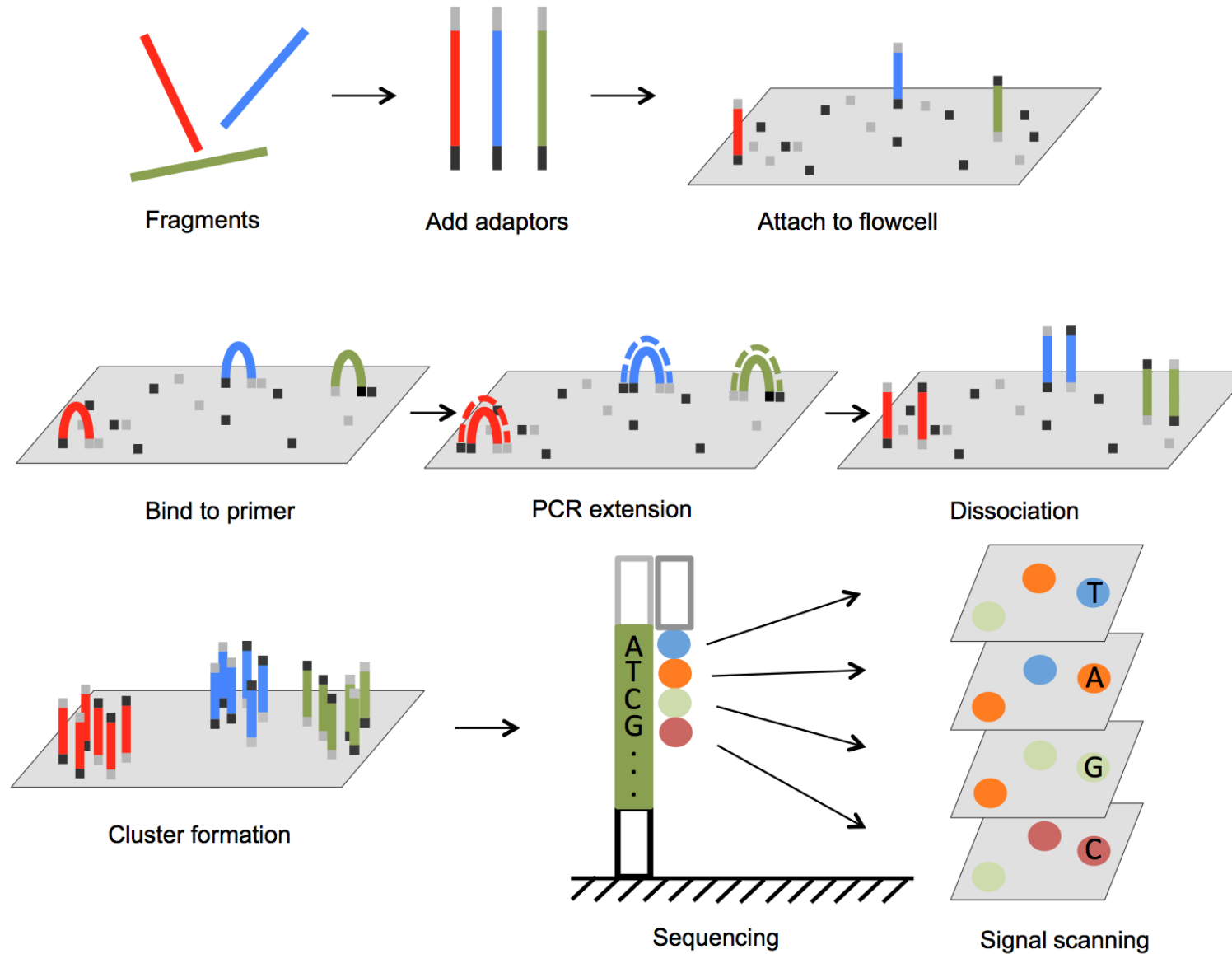
Il genoma umano più completo di sempre

Venti anni dopo la presentazione della prima bozza, arriva il sequenziamento completo di tutto il genoma umano. Aiuterà la ricerca biomedica e auguratamente la medicina personalizzata

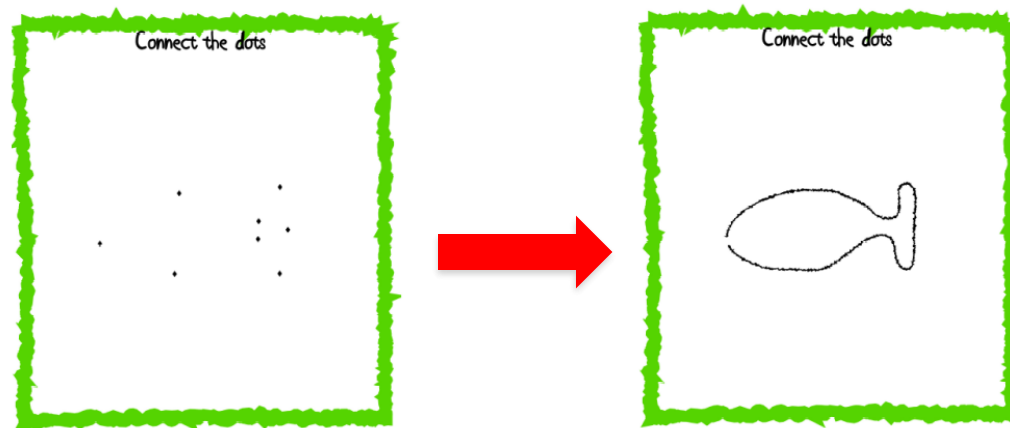


01.04.2022

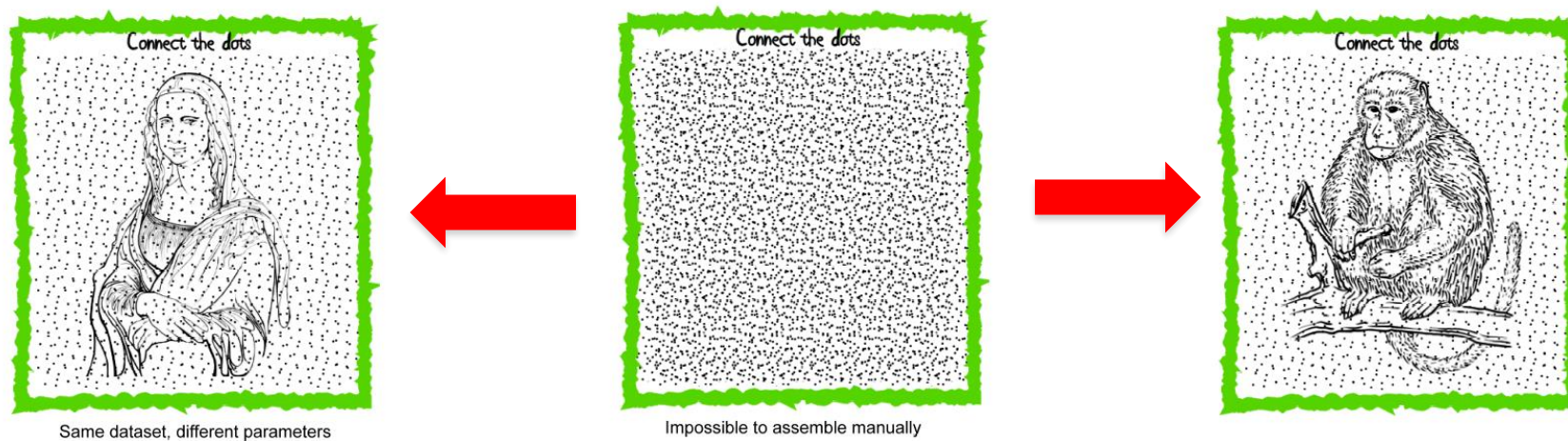
Schema del funzionamento di NGS



CE sequencing



NGS sequencing



L'informatica è necessaria per gestire la grande quantità di dati che si ottengono con le nuove tecnologie



Alan Turing
(1912-1954)



**Mainframe
digital
computers
1940s**



Steve Jobs
(1955-2011)



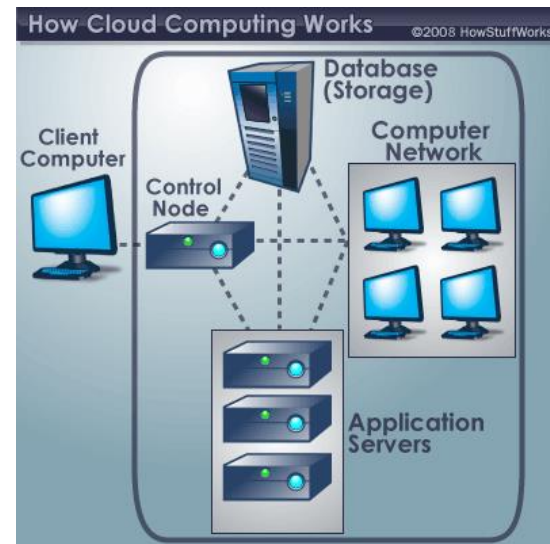
**Personal
computers
1980s**



Bill Gates
(1955-)



INTERNET



**Cloud
computing
2010s**

TCGA

[Program History](#) +[TCGA Cancers Selected for Study](#)[Publications by TCGA](#)[Using TCGA](#) +[Contact](#)

The Cancer Genome Atlas Program

The Cancer Genome Atlas (TCGA), a landmark [cancer genomics](#) program, molecularly characterized over 20,000 primary cancer and matched normal samples spanning 33 cancer types. This joint effort between the National Cancer Institute and the National Human Genome Research Institute began in 2006, bringing together researchers from diverse disciplines and multiple institutions.

Over the next dozen years, TCGA generated over 2.5 petabytes of genomic, epigenomic, transcriptomic, and proteomic data. The data, which has already lead to improvements in our ability to diagnose, treat, and prevent cancer, will remain [publicly available](#) for anyone in the research community to use.



Il sequenziamento massivo parallelo o NGS (Next Generation Sequencing)

- Consente il sequenziamento in parallelo di milioni di frammenti e fornisce informazioni su:
 - ✓ intero **genoma** o esoni (**esoma**)
 - ✓ *mutazioni puntiformi*
 - ✓ *Delezioni/inserzioni*
 - ✓ *SNPs (single nucleotide polymorphisms)*
 - ✓ *numero di copie*
 - ✓ mRNA- microRNA (**trascrittoma**)
- Richiede infrastrutture e personale altamente specializzato.

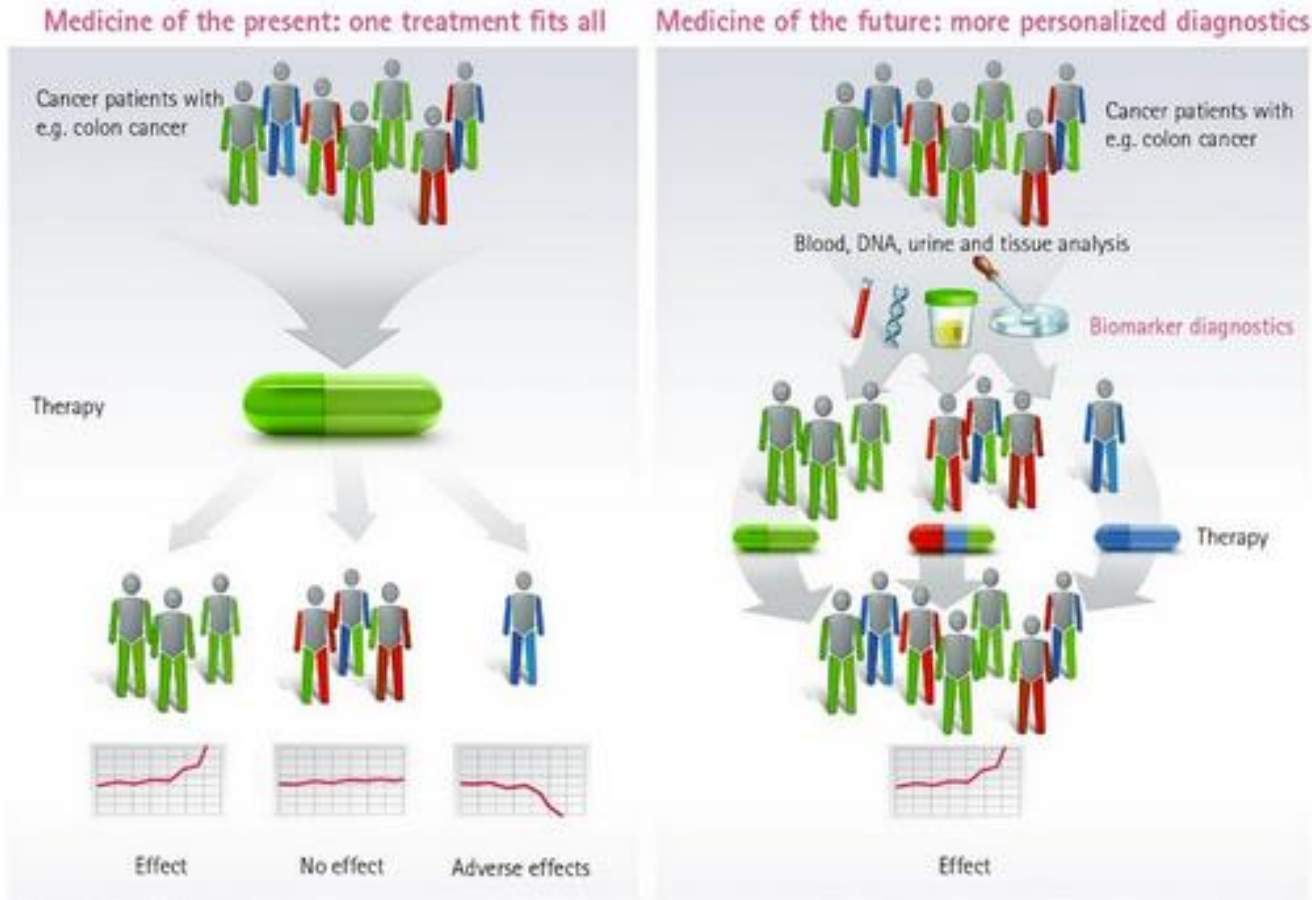
NGS nella pratica clinica

- Le tecniche di NGS impiegano biopsia, anche in paraffina e campioni di liquidi biologici (biopsia liquida)
- Malattie genetiche e screening prenatale
- Test in oncologia sulla probabilità di risposta e beneficio clinico dall'esposizione ad un determinato agente a bersaglio molecolare:
 - ✓ *nelle linee guida 2020 della European Society of Medical Oncology indicato per carcinoma del polmone non a piccole cellule (prevalenza di mutazioni in **EGFR**), tumore della prostata, carcinoma ovarico e colangiocarcinoma) che presentano mutazioni a carico di geni per i quali ci sono farmaci la cui efficacia è stata dimostrata da studi clinici*
 - ✓ *ESMO raccomanda l'uso di NGS in centri di ricerca per accelerare la ricerca clinica (mammella, pancreas, epatocellulare)*

MEDICINA PERSONALIZZATA

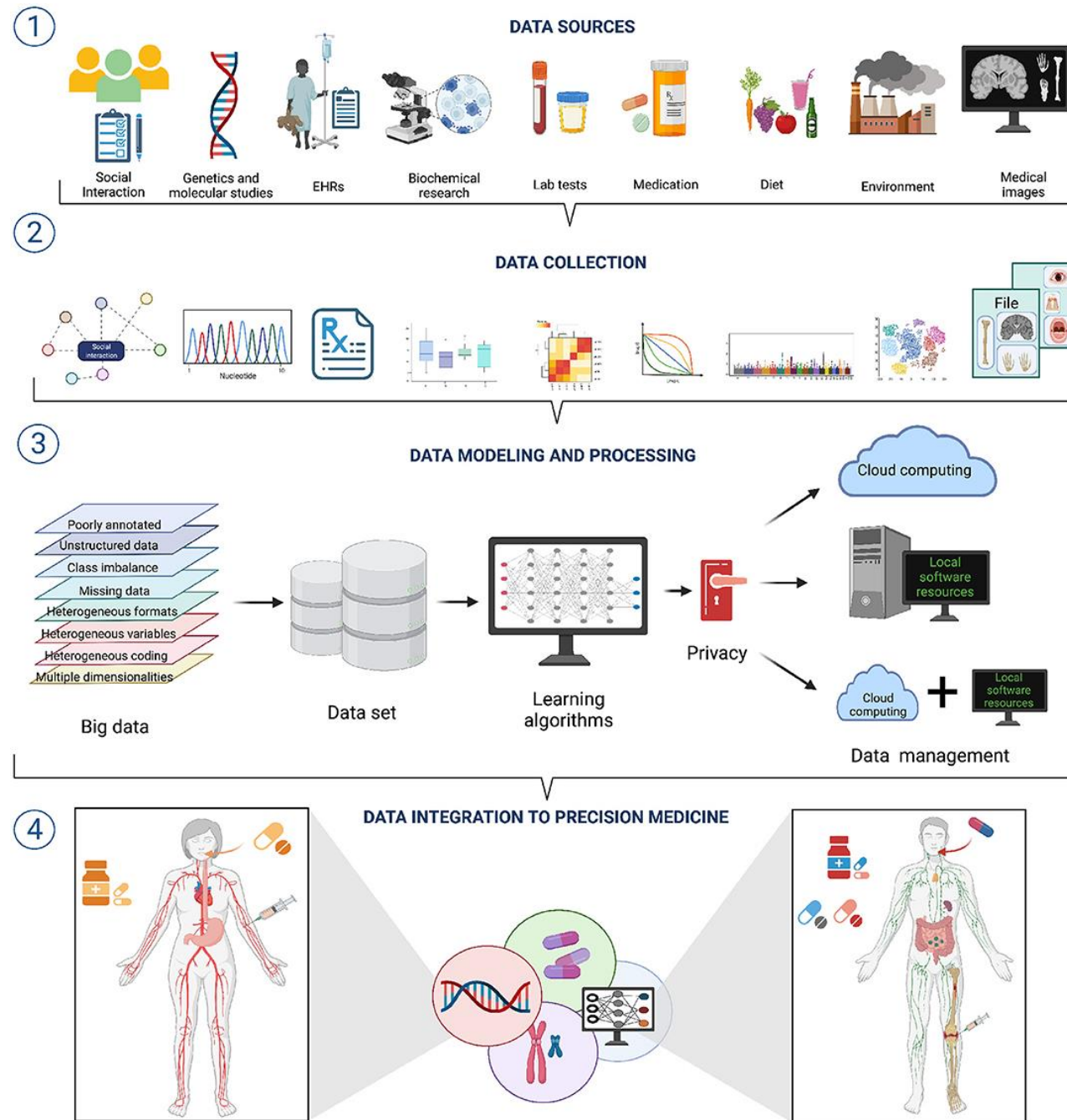
L'approccio al trattamento personalizzato prevede l'utilizzo di strumenti di analisi e test di diagnostica molecolare, con l'obiettivo di prescrivere i farmaci più adatti e gestire le patologie in modo ottimale per un paziente

Personalized medicine: tailored treatments



Source: Bayer Healthcare website

Modelli multidimensionali di set di data che includano tutte le **proteine**, tutti i **metaboliti**, **microbiota intestinale**, dati clinici e di imaging da migliaia di pazienti sono necessari per raggiungere lo scopo



Dalla biopsia alla singola cellula: *single cell sequencing*

- L'utilizzo di campioni di tessuto sfuso costituiti da un insieme di molte cellule, fornisce misure genomiche medie per un campione, ma maschera le differenze tra le cellule
- L'analisi delle **singole cellule** è essenziale per comprendere la diversità cellulare all'interno di un tumore e per sviluppare terapie mirate

PubMed®

single cell rna sequencing copd

Advanced Create alert Create RSS User Guide

Save Email Send to Sort by: Best match Display options

MY NCBI FILTERS

RESULTS BY YEAR

83 results

3 articles found by citation matching

Characterization of the COPD alveolar niche using single-cell RNA sequencing.
Sauler M, et al. Nat Commun. 2022. PMID: 35078977 [Free PMC article](#).

Single cell RNA sequencing identifies IGFBP5 and QKI as ciliated epithelial cell genes associated with severe COPD.
Li X, et al. Respir Res. 2021. PMID: 33823868 [Free PMC article](#).

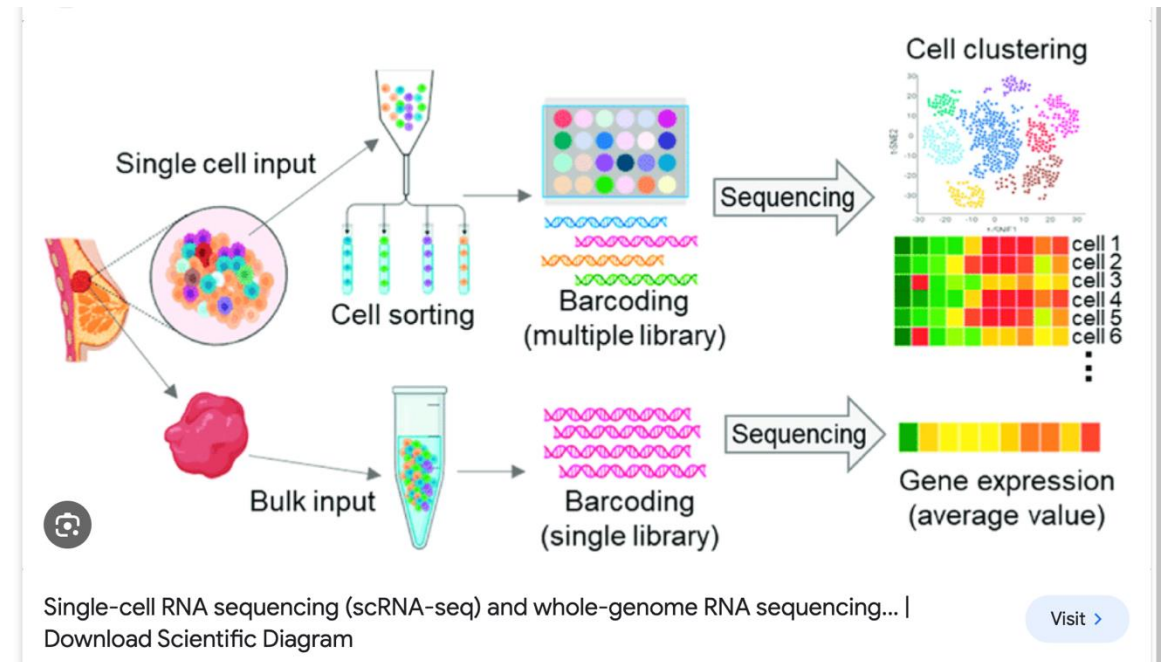
Combining single-cell RNA sequencing of peripheral blood mononuclear cells and exosomal transcriptome to reveal the cellular and genetic profiles in COPD.
Pei Y, et al. Respir Res. 2022. PMID: 36127695 [Free PMC article](#).

TEXT AVAILABILITY

☐ Abstract

☐ Free full text

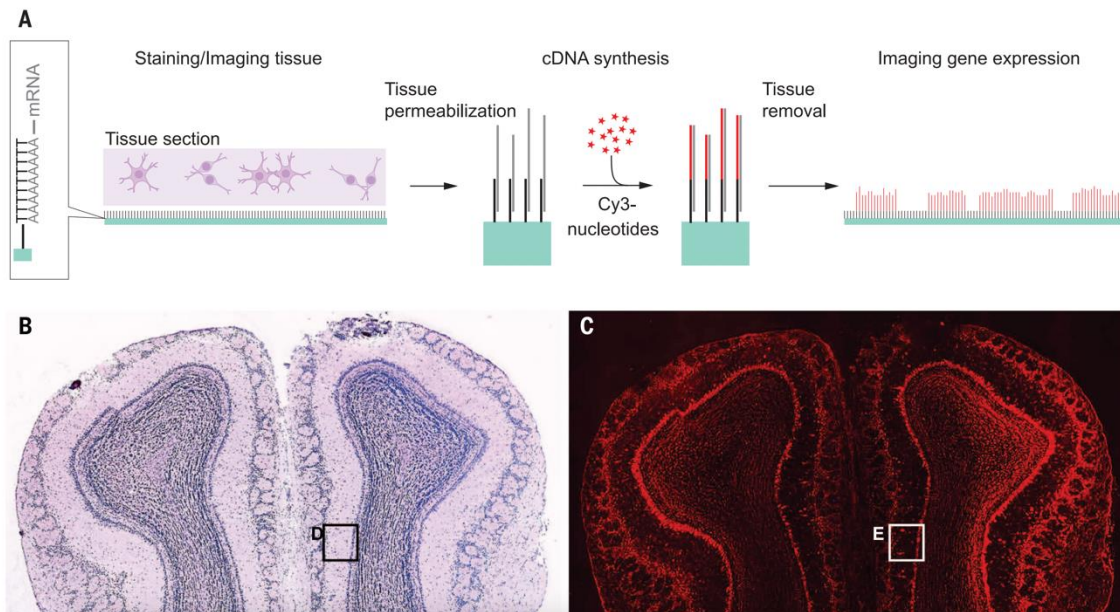
☐ Full text



La nuova frontiera: trascrittomica spaziale

- La trascrittomica spaziale è di riuscire ad individuare centinaia o migliaia di trascritti su un singolo tessuto, andando a localizzarli e contestualizzarli in modo preciso, fino ad arrivare all'analisi di singola cellula correttamente collocata nel suo contesto biologico che è un dato fondamentale per comprendere le dinamiche legate ad eventi sia fisiologici che patologici

RESEARCH | REPORTS



TRANSCRIPTION

Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics

Patrik L. Ståhl,^{1,2*} Fredrik Salmén,^{2*} Sanja Vickovic,^{2†} Anna Lundmark,^{2,3†} José Fernández Navarro,^{1,2} Jens Magnusson,¹ Stefania Giacomello,² Michaela Asp,² Jakub O. Westholm,⁴ Mikael Huss,⁴ Annelie Mollbrink,² Sten Linnarsson,⁵ Simone Codeluppi,^{5,6} Åke Borg,⁷ Fredrik Pontén,⁸ Paul Igor Costea,² Pelin Sahlén,² Jan Mulder,⁹ Olaf Bergmann,¹ Joakim Lundeberg,^{2†} Jonas Frisén¹

Analysis of the pattern of proteins or messenger RNAs (mRNAs) in histological tissue sections is a cornerstone in biomedical research and diagnostics. This typically involves the visualization of a few proteins or expressed genes at a time. We have devised a strategy, which we call “spatial transcriptomics,” that allows visualization and quantitative analysis of the transcriptome with spatial resolution in individual tissue sections. By positioning histological sections on arrayed reverse transcription primers with unique positional barcodes, we demonstrate high-quality RNA-sequencing data with maintained two-dimensional positional information from the mouse brain and human breast cancer. Spatial transcriptomics provides quantitative gene expression data and visualization of the distribution of mRNAs within tissue sections and enables novel types of bioinformatics analyses, valuable in research and diagnostics.

synthesized cDNA (Fig. 1A and fig. S1). The tissue was then enzymatically removed, which left cDNA coupled to the arrayed oligonucleotides on the slide (6). The fluorescent cDNA showed a pattern in detail corresponding to the tissue structure revealed by the general histology (Fig. 1, B and C), and the cDNA was strictly localized directly under individual cells (Fig. 1, D to G'). By comparing the hematoxylin-and-eosin and fluorescent signals, we could measure the average distance of diffusion outside the border of a cell to $1.7 \pm 2 \mu\text{m}$ (mean \pm SD) (fig. S1, E to H).

The realization that it is possible to capture mRNA in tissue sections with minimal diffusion and maintained positional representation motivated us to array oligonucleotides with positional barcodes (Fig. 2A), and we denoted this strategy “spatial transcriptomics.” We deposited ~200 million oligonucleotides in each of 1007 features, with a diameter of 100 μm and a center-to-center distance of 200 μm , over an area of 6.2 mm by 6.6 mm (fig. S2).

After capturing and reverse-transcribing mRNA, we generated sequencing libraries based on amplification by in vitro transcription (fig. S3, A and B) (7, 8). Comparison with data from RNA extracted and fragmented in solution revealed that ~95% of the genes found with one of the methods was also found with the other (fig. S3C).