

# ***Farmacologia Applicata***

***AA 2023/24***

## **Metodiche di biologia molecolare applicate alla farmacologia:**

- Protein Analysis
- Western blot Analysis
- Real Time qPCR
- Chromatin Immuno Precipitation (Chip)
- Metilazione del DNA
- CRISPR-Cas9

Dott.ssa Laura Rullo, PhD  
Dott.ssa Camilla Morosini  
Dott.ssa Loredana Losapio

# Quantificazione proteine

La quantificazione della concentrazione proteica in un campione in soluzione acquosa è un test importante nei laboratori di ricerca e sviluppo e in biochimica, per applicazioni che vanno dagli studi enzimatici alla fornitura di dati per il rilascio di lotti biofarmaceutici.

➤ I saggi di quantificazione delle proteine sono metodi che utilizzano la spettroscopia UV/visibile per determinare rapidamente la concentrazione di proteine, rispetto ad uno standard, o usando un coefficiente di estinzione assegnato.

## Assorbanza nell'ultravioletto a 280 nm

- ❖ Le proteine mostrano un caratteristico spettro di assorbimento ultravioletto (UV) a circa 280 nm, principalmente dato dagli amminoacidi aromatici tirosina e triptofano.
- ❖ Se la sequenza primaria non contiene nessuno o pochi di questi aminoacidi, allora questo metodo non risulterà adatto.

- Di routine, in queste misure dirette vengono utilizzate le cuvette in cristallo di quarzo per la misurazione, poiché i materiali plastici non sono trasparenti ai raggi UV.
- Se è noto il coefficiente di estinzione molare della proteina, può essere utilizzata la legge di Lambert-Beer per quantificare accuratamente la quantità di proteina mediante assorbanza UV, supponendo che la proteina sia pura e non contenga componenti non proteici che assorbono i raggi UV come cofattori nucleotidici legati, eme o centri ferro-zolfo

# **Concentrazione proteica in un campione biologico**

**Bradford Assay**

**Lowry Assay**

**BCA Assay**

# Concentrazione proteica in un campione biologico

**Bradford 0,1-1,5 mg/mL**

**Lowry 0,01 mg – 1 mg/mL**

**BCA 0,5 ug- 1,5 mg/mL**

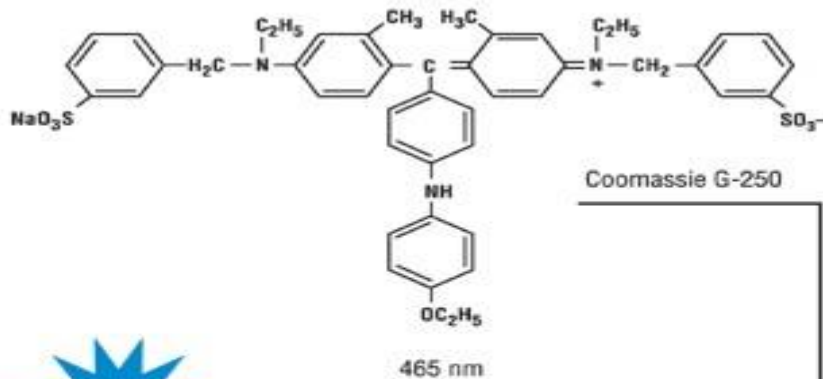
## Saggio con Blue Coomassie (Bradford)

Il saggio Bradford è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (descritto per la prima volta da M.M. Bradford nel 1976). Il meccanismo di base del test è il legame del colorante a pH acido con i residui basici di arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina.

Il colorante libero (forma cationica) presenta un massimo di assorbimento a 465 nm e un colore rosso, dopo il legame con le proteine, si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento a 595 nm a causa della stabilizzazione della forma anionica del colorante che presenterà un colore blu. La colorazione avrà una intensità direttamente proporzionale al contenuto proteico del campione in esame.

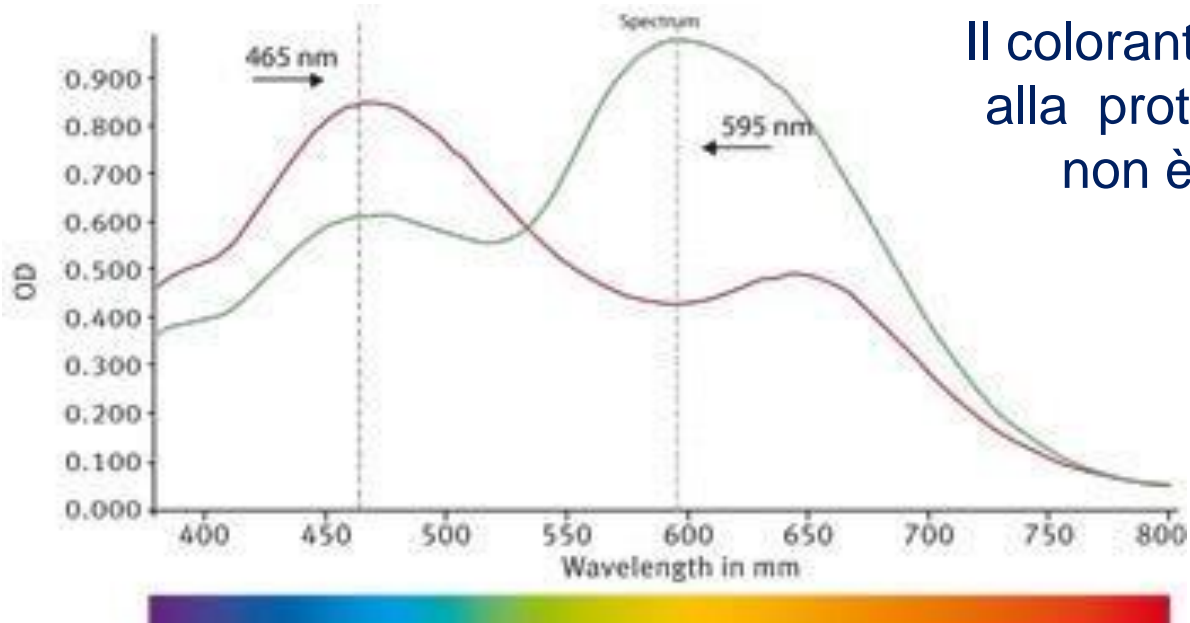
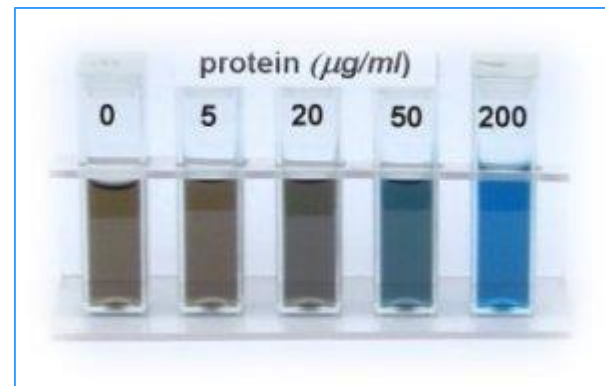
**PROTEIN**  
Basic and Aromatic  
Side Chains

+



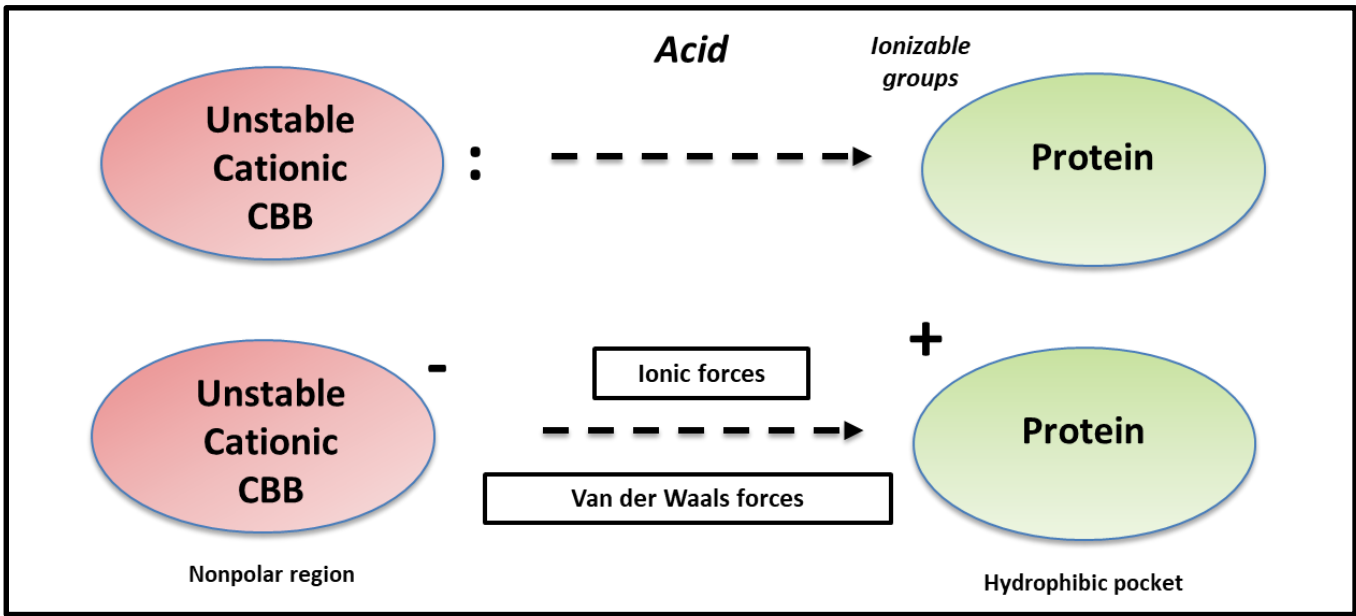
**BLUE**  
 $A_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$

Protein-Dye Complex

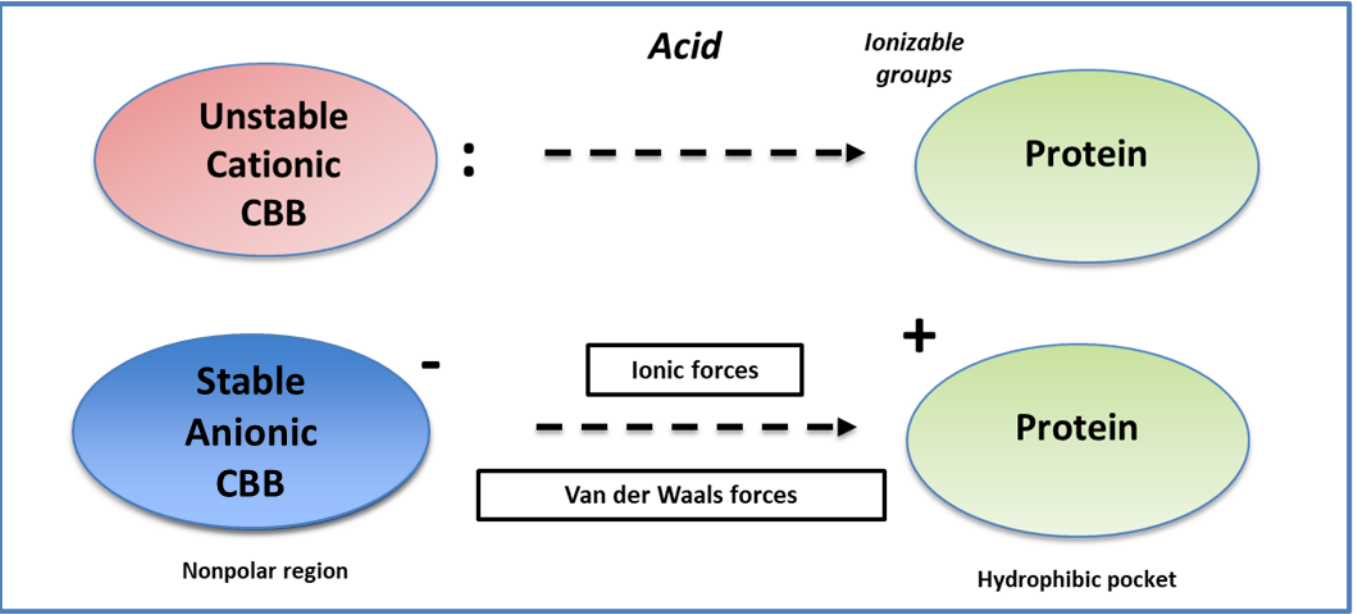


Il colorante Blu di Coomassie legato alla proteina è blu al contrario se non è legato è marroncino.





465 nm



595 nm

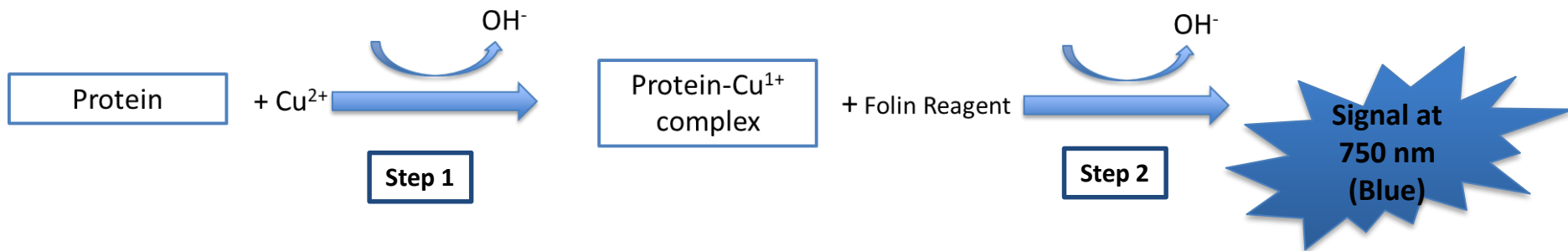
# Metodo Lowry (Alkaline Copper Reduction Assays)

Il saggio di Lowry (Lowry *et al.*, 1951) si basa su una procedura di due fasi:

1. **La reazione del biureto**: aggiungendo alla soluzione proteica una **soluzione rameica** in ambiente basico, si ottiene una colorazione viola porpora con un assorbimento massimo a 540 nm.
2. Dopo l'aggiunta del reattivo di Folin che va a reagire con le tirosine ed i triptofani delle proteine, la soluzione assume un colore blu (750nm) dato dalla formazione di blu di tungsteno e blu di molibdeno mediante una reazione di riduzione operata dal complesso rame-proteina

**Prima fase:** In primo luogo, la reazione Biuret in cui  $\text{Cu}^{2+}$  della miscela di reazione reagisce con il legame peptidico delle proteine in condizioni alcaline con conseguente loro riduzione a ioni rameosi ( $\text{Cu}^+$ ),

**Seconda fase:** La reazione di Lowry - in cui il reattivo di Folin-Ciocalteu, che contiene un complesso fosfomolibdico che è una miscela di tungstato di sodio, molibdato di sodio e fosfato, insieme alla soluzione di solfato di rame e la proteina forma un colore blu (blu di molibdeno) che può essere valutato misurando l'assorbanza a 750 nm .



## Metodo dell' acido bicinconinico (BCA)

Solfato di rame

Bicarbonato di sodio+tartrato di sodio

Bicinconinich Acid

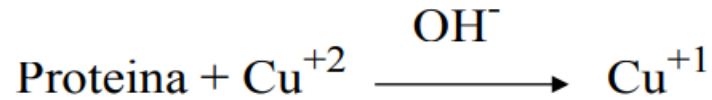
# Metodo dell'acido bicinconinico (BCA)

(Range: 0.2– 50 mg)

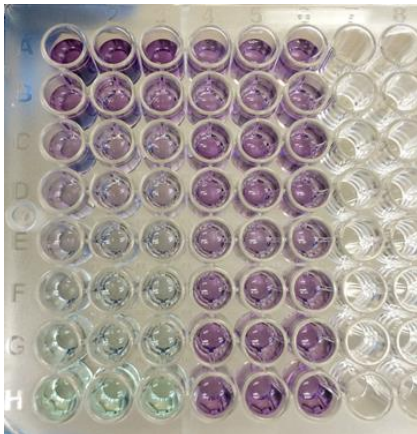
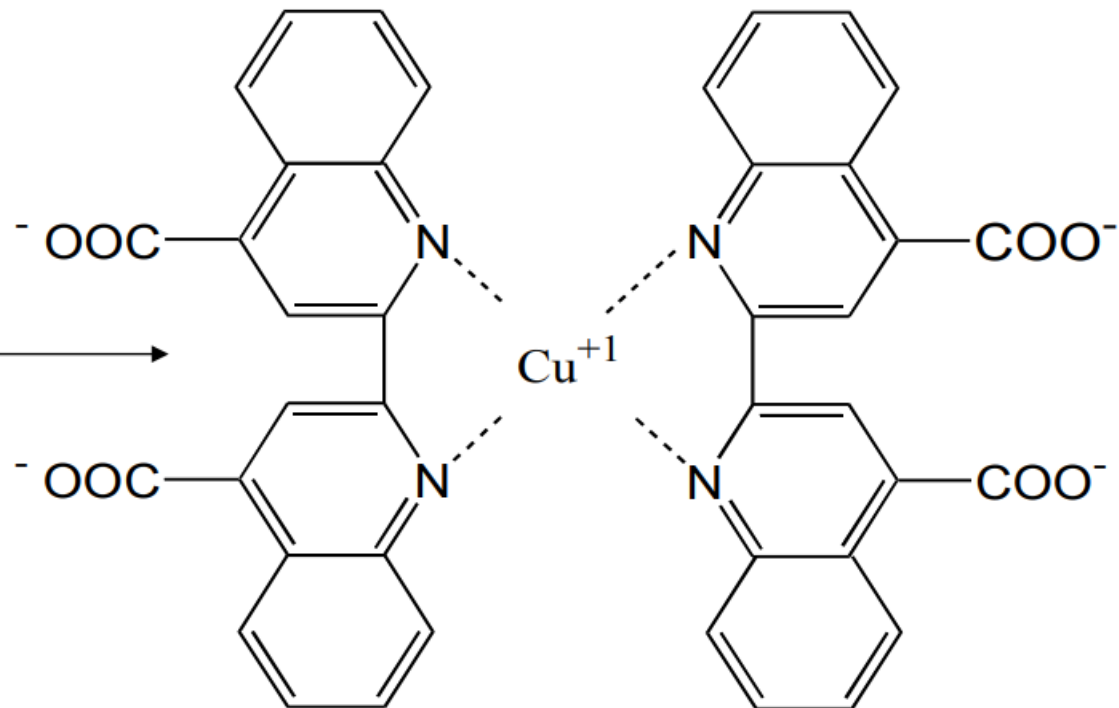
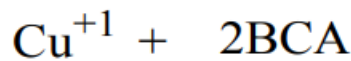
- ❖ Nel metodo BCA si sostituisce il reagente di Folin (utilizzato per il metodo Lowry) con acido bicinconinico. Le proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico. Gli ioni rameosi reagiscono con l'acido bicinconinico per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA). Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562nm.
- ❖ La reazione chimica dipende dalla temperatura, Diversi gruppi funzionali possono mostrare una diversa reattività a temperature elevate. Infatti, a temperature elevate (60 ° C rispetto a 37 ° C), si osserva una maggiore formazione di colore a causa della maggiore reattività dei legami di triptofano, tirosina e peptidi.

# Metodo dell'acido bicinconinico (BCA) (Range: 0.2– 50 mg)

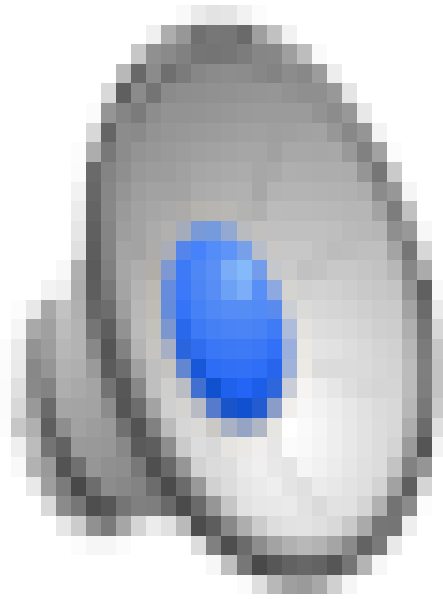
**Step 1:**

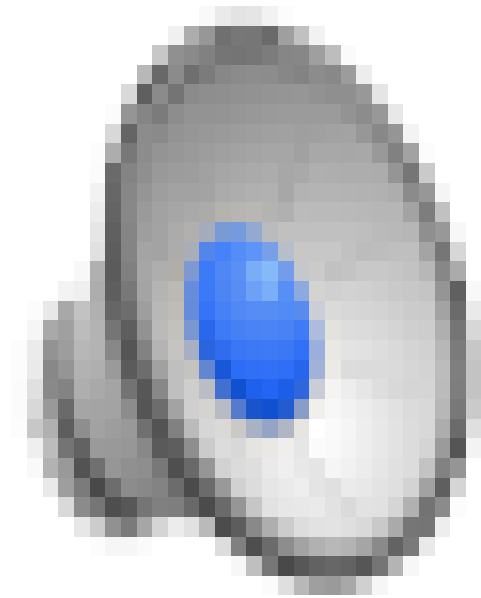


**Step 2:**



**Complesso Viola-porpora**







# Legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon b c$$

$\varepsilon$  = assorbività molare (o coefficiente di estinzione molare): dipende dall'analita e dalla lunghezza d'onda

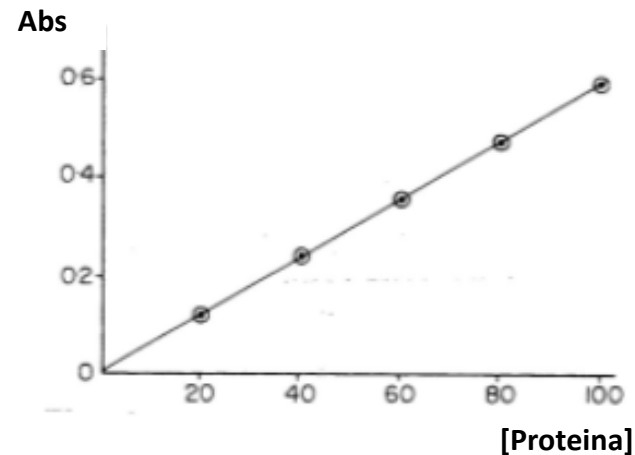
$b$  = lunghezza del percorso del raggio nel campione

$c$  = concentrazione molare della specie assorbente (moli/L soluzione)

L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione:

$$A = k[c]$$

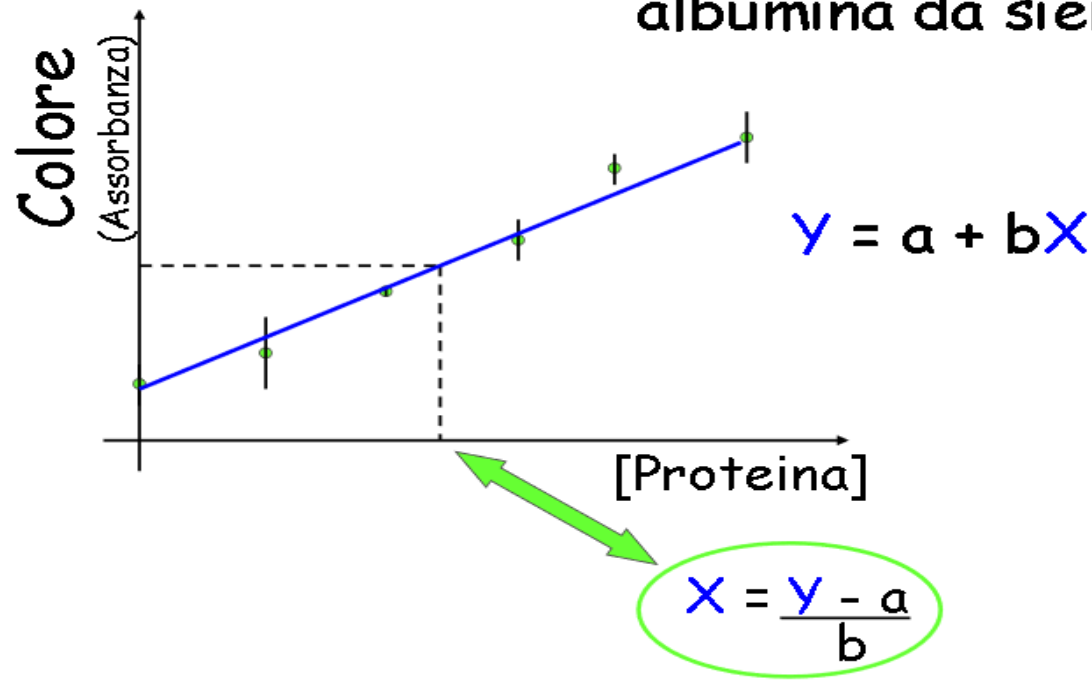
La quantificazione è accurata solo se, alla lunghezza d'onda di analisi, l'analita è l'unica specie assorbente



# Retta di taratura

- Una retta di taratura nota anche come curva di calibrazione, è un tipo di grafico utilizzato per la determinazione della quantità incognita di un campione rispetto un campione di riferimento.
- La **curva standard** per la concentrazione proteica viene ottenuta utilizzando concentrazioni note di **albumina sierica bovina (BSA)**, una proteina sierica che trasporta gli acidi grassi ed importante nel mantenimento del pH del plasma. La BSA funge quindi da proteina di riferimento.
- La preparazione di una curva standard è necessaria per verificare se il metodo di dosaggio di una particolare sostanza rileva un aumento lineare con la sua concentrazione

## Curva di taratura (standard curve) di BSA: albumina da siero bovino



Usando l'equazione della retta ottenuta possiamo ricavare la concentrazione del nostro campione incognito

# Western Blot

## Qualitative

- To determine the presence or absence of a specific protein isoform in a biological sample.

## Quantitative

- To determine the relative abundance of a specific protein isoform in a biological sample.

# Western Blot: Electrophoresisbased Immunoassay

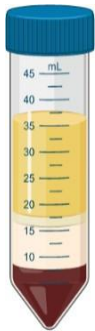
## Pros:

- **Relative quantification**
- **Differentiates proteins by size**
- **Low capital investment**
- **Most widely used technique, many resources available**
- **Can multiplex**

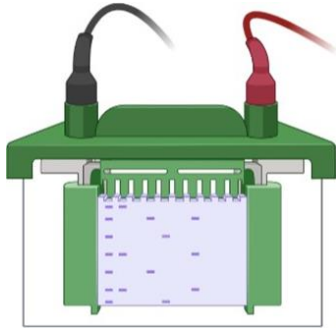
## Cons:

- **Multi-step protocol requires optimization**
- **Lower throughput**

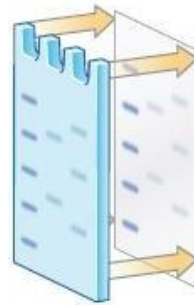
Preparazione  
del campione



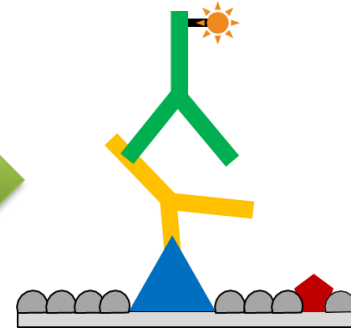
Elettroforesi



Trasferimento



Immunodetection

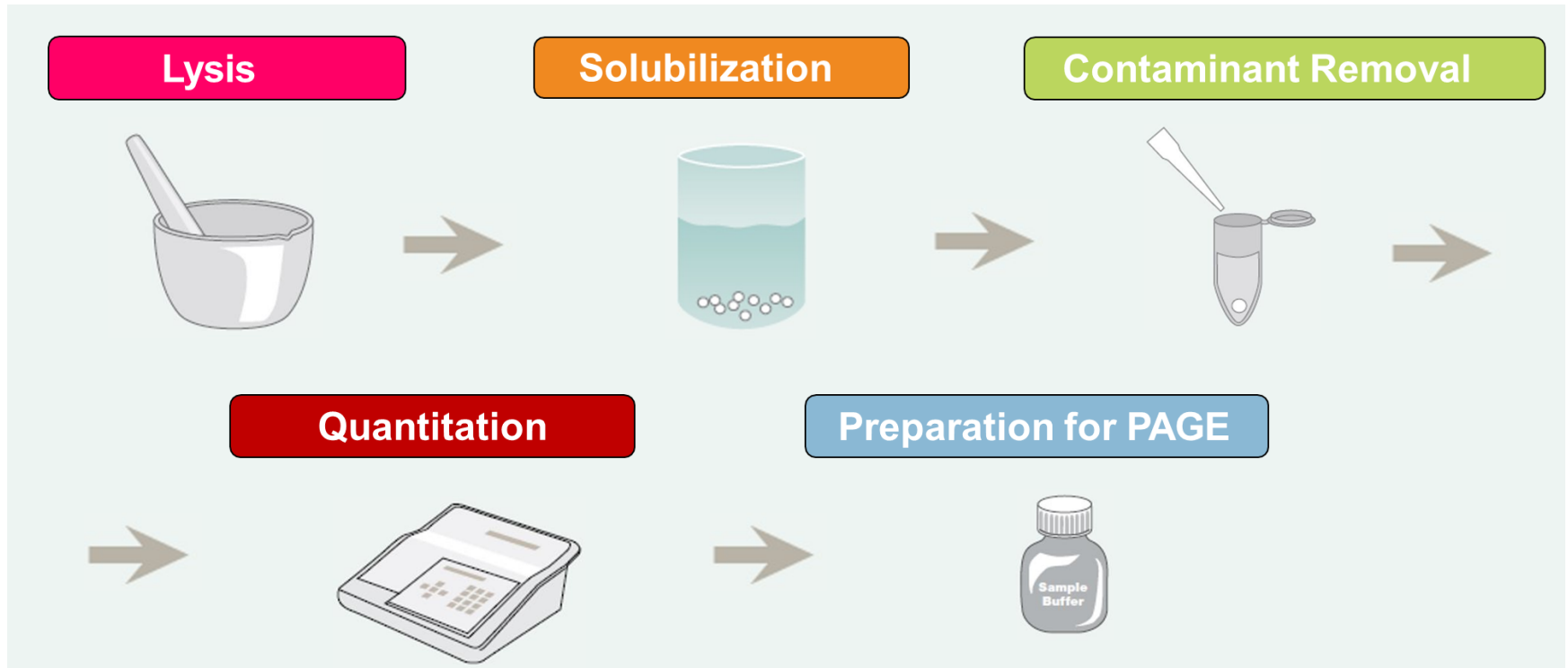


Acquisizione  
delle immagini



ANALISI

# Preparazione del campione



# Lysis Methods



## Gentle – tissue culture cells

- Osmotic shock
- Freeze-thaw
- Detergent
- Enzymatic

## Harsh – tissue, microbes

- Sonication
- French press
- Grinding
- Beads



## LYSIS BUFFER

Lysis buffers differ in their ability to solubilize proteins, with those containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and other ionic detergents considered to be the harshest and therefore most likely to give the highest yield.

The main consideration when choosing a lysis buffer is whether the chosen antibody will recognize denatured samples. When this is not the case, it will be noted on the antibody datasheet, and buffers without detergent or with relatively mild non-ionic detergents (NP-40, Triton X-100) should be used

### Protein location and lysis buffer choice

Protein location	Buffer recommended
Whole cell	NP-40
Cytoplasmic (soluble)	Tris-Triton
Membrane bound	NP-40 or RIPA
Nuclear	RIPA or use nuclear fraction protocol*
Mitochondria	RIPA or use mitochondrial fraction protocol*



### N-PER Neuronal Protein Extraction Reagent

is a proprietary cell lysis reagent optimized for efficient extraction of proteins from all cellular compartments of neuronal tissue and primary cultured neurons.

Features of N-PER Neuronal Protein Extraction Reagent:

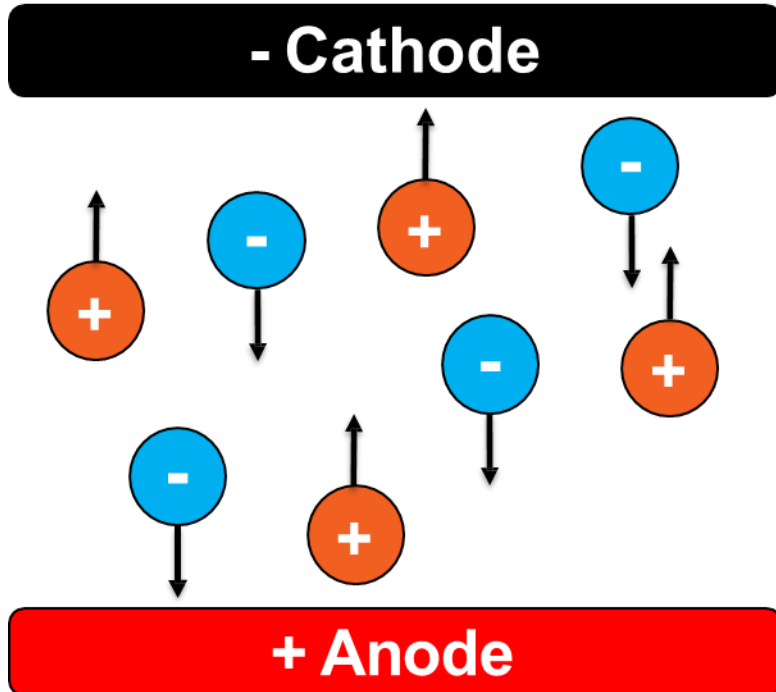
- **Optimized**—efficient total protein extraction, including membrane proteins, from brain tissue or primary cultured neurons;
- **Gentle**—preserves protein function without compromising yield;
- **Versatile**—can be supplemented with protease inhibitors, reducing or chelating agents or required cofactors;
- **Compatible**—extracts are suitable for use with total protein, enzymatic and immunological assays and protein purification methods

# Protease and phosphatase inhibitors

As soon as lysis occurs, proteolysis, dephosphorylation and denaturation begin. These events can be slowed down significantly if samples are kept on ice or at 4°C at all times and appropriate inhibitors are added fresh to the lysis buffer. Ready-to-use cocktails of inhibitors from various suppliers are available but you can make your own cocktail.

Inhibitor	Protease/phosphatase inhibited	Final concentration in lysis buffer	Stock (store at -20°C)
Aprotinin	Trypsin, chymotrypsin, plasmin	2 µg/mL	Dilute in water, 10 mg/mL. Do not re-use thawed aliquots.
Leupeptin	Lysosomal	5–10 µg/mL	Dilute in water. Do not re-use thawed aliquots.
Pepstatin A	Aspartic proteases	1 µg/mL	Dilute in methanol, 1 mM.
PMSF	Serine, cysteine proteases	1 mM	Dilute in ethanol. You can re-use the same aliquot.
EDTA	Metalloproteases that require Mg <sup>2+</sup> and Mn <sup>2+</sup>	5 mM	Dilute in dH <sub>2</sub> O, 0.5 M. Adjust pH to 8.0.
EGTA	Metalloproteases that require Ca <sup>2+</sup>	1 mM	Dilute in dH <sub>2</sub> O, 0.5 M. Adjust pH to 8.0.
Sodium fluoride	Serine-threonine phosphatases	5–10 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.
Sodium orthovanadate	Tyrosine phosphatases	1 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.

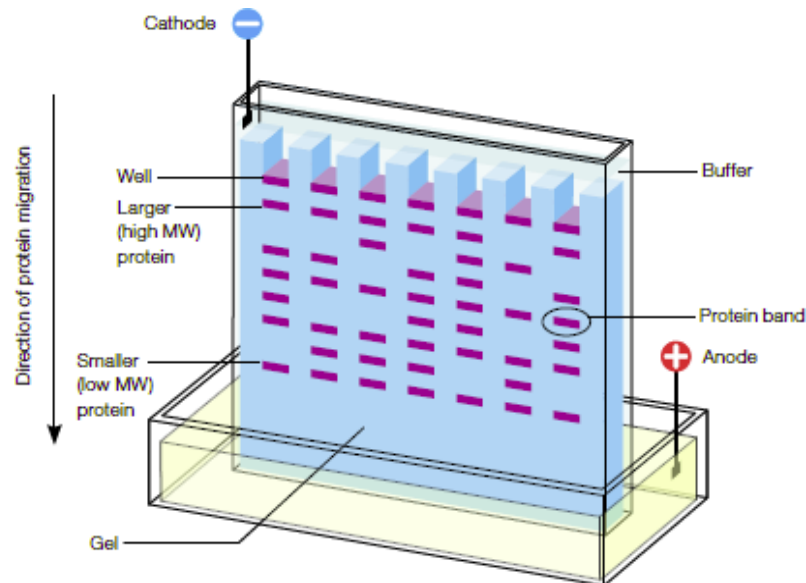
# Principio Elettroforesi



- Electrophoresis is the **movement of charged particles through a fluid** under the influence of a **uniform electric field**.

## Factors that affect protein electrophoresis

- Strength of the electric field (voltage).
- Buffer composition:
  - pH
  - Concentration
  - Ionic strength
- Gel composition
- Protein size, shape, net charge and intermolecular interactions (e.g. EMSA).



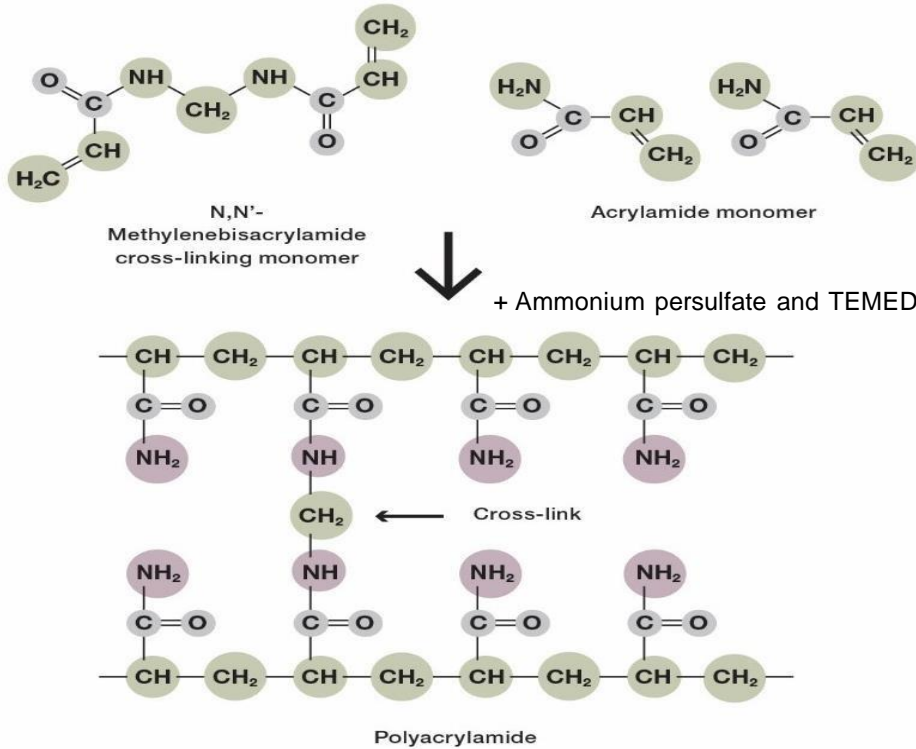
## Electrophoresis: Experimental Choices

Western blots can detect proteins in a variety of states (e.g. denatured, native, protein-protein complexes, protein-nucleic acid complexes, etc.).

### Experimental choices:

- Native vs. Denaturing conditions
- Reducing agents ( $\beta$ -mercaptoethanol, DTT) for disulphide bond reduction
- Gel % (acrylamide/bis-acrylamide) that best resolves protein of interest
- Selection of MW Standards for estimation of protein relative size

# Elettroforesi: gel poliacrilammide



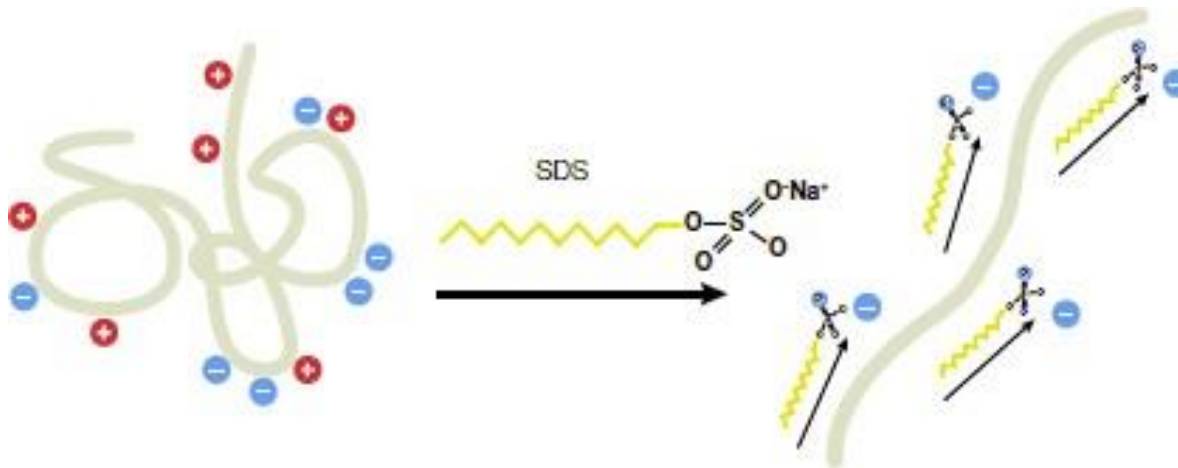
- **Pore size provides unique sieving property to gel matrix**
- Acrylamide monomer and bis-acrylamide (cross-linking) levels are varied, producing uniform pore sizes
- (%T) = total acrylamide gm/100ml
- (%C) =  $\frac{\text{bis-acryl (gm)}}{\text{bis-acryl + monomer-acryl (gm)}}$

- Typical polyacrylamide gel (%T) is anywhere from 4-20%.
  - Low %T for high MW proteins
  - High %T for low MW proteins
- Single percentage gels
  - Best for resolution of proteins of similar MW.
- Gradient gels
  - Best for screening broad range of MWs
- Lower percentage can help with downstream transfer



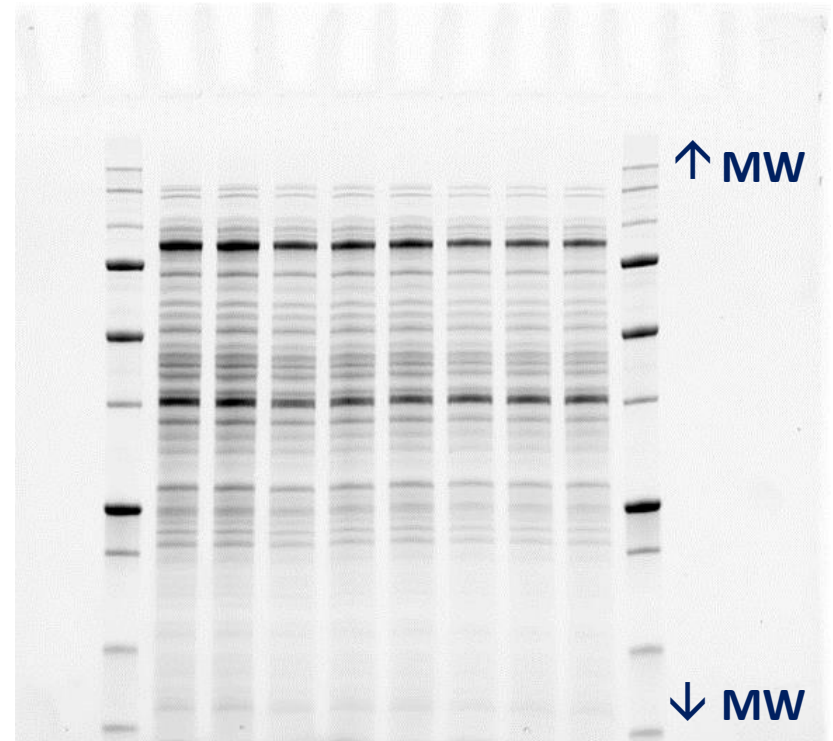
# ELETTROFORESI: SDS-PAGE

- Sodium Dodecyl Sulfate (an anionic detergent) denatures protein structure
- SDS binds proportional to protein mass (1.4 g SDS/g protein), approximately one SDS for every two amino acids.

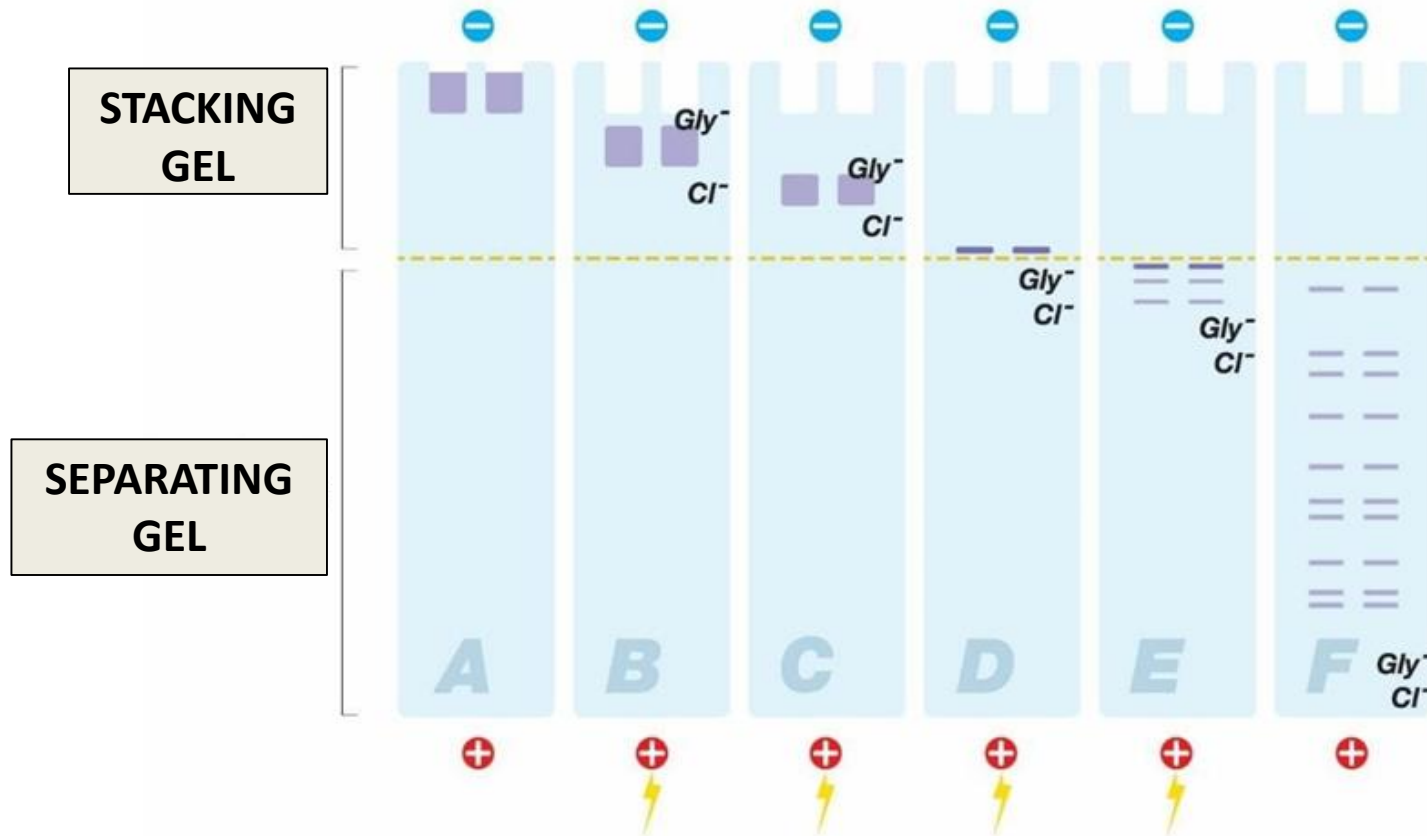


# ELETTROFORESI: SDS-PAGE

- Protein movement depends on
  - Electrophoretic mobility( $\mu$ ), based on charge
  - Gel sieving properties, based on MW
- Migration is dependent mainly on the sieving property of the gel **proportional to the MW** of the protein

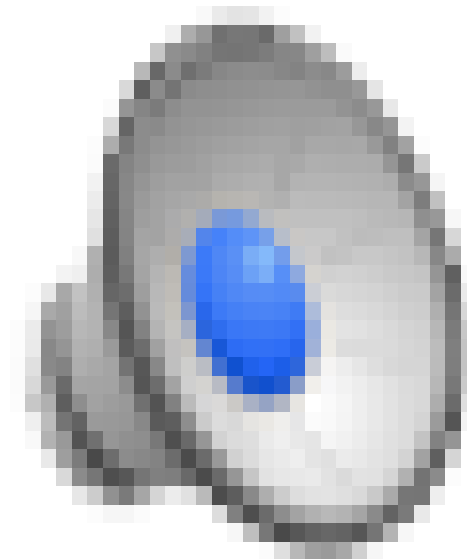


# ELETTROFORESI: SDS-PAGE



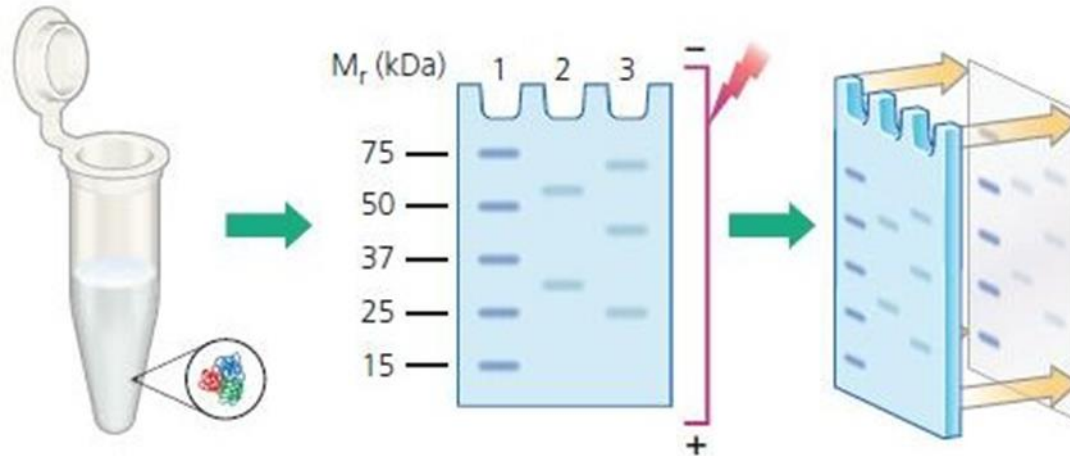
The **discontinuous buffer system** provides **stacking of the sample volume** for finer band **resolution** in the separating gel

# Separazione proteine SDS-page



# Electrophoretic Transfer

**Transferring protein to a membrane makes immunodetection possible** by allowing antibodies to access protein on the membrane surface.

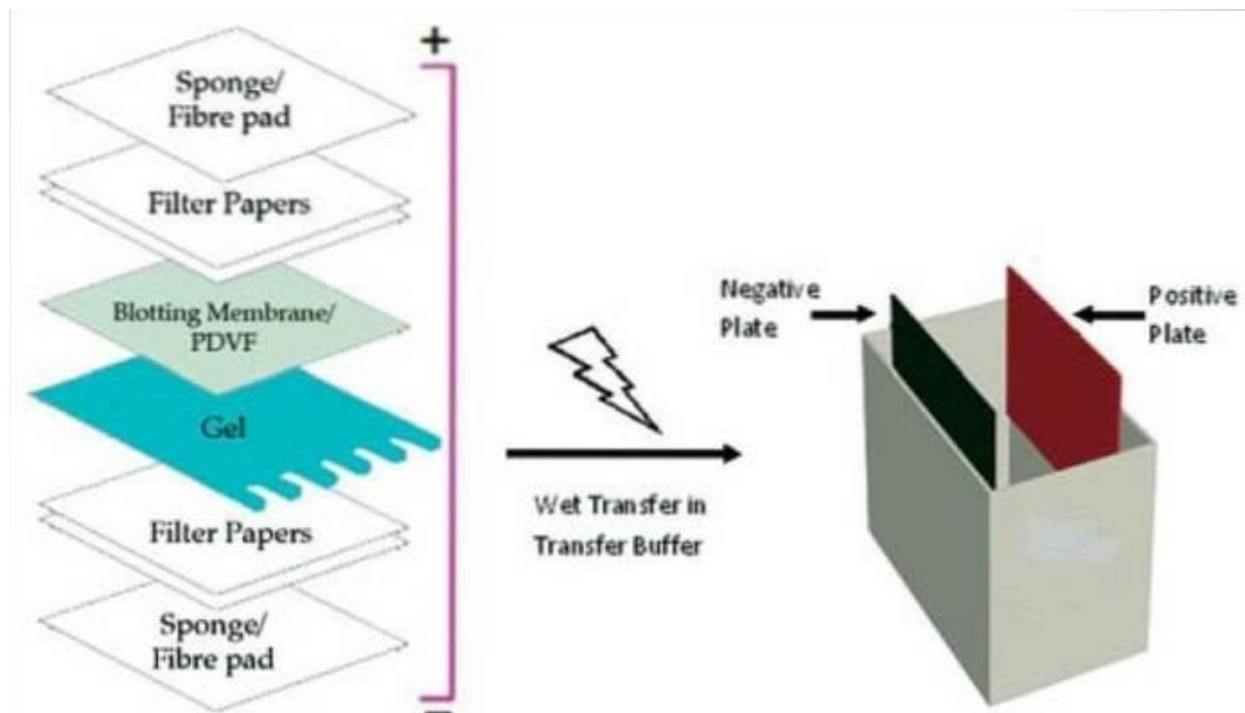


- Applied voltage causes migration of protein from gel to membrane
- Semi-dry or wet tank methods

# Electrophoretic Transfer: Tank Blotting

## Wet Tank Transfer:

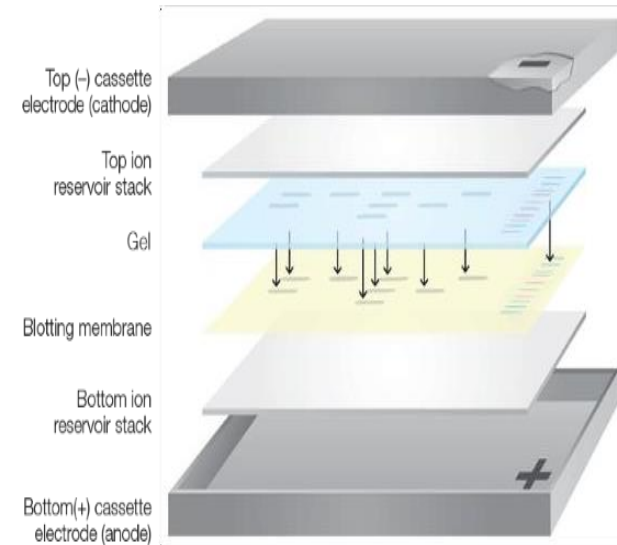
- Transfer stack is submerged in buffer
- Filter papers, gel and membrane need to be placed between sponges and held in a plastic cassette
- Flexible voltage and time and Reliable for high MW protein transfer
- Uses large volume of transfer buffer



# Electrophoretic Transfer: Semi-Dry Blotting

## Semi-Dry Transfer:

- **Transfer stack is in direct contact with plate electrodes**
- **High rate of transfer, good for high throughput.**
- **Uses minimal amount of transfer buffer**
- **Can overheat due to limited heat dissipation**



## Nitrocellulose membrane

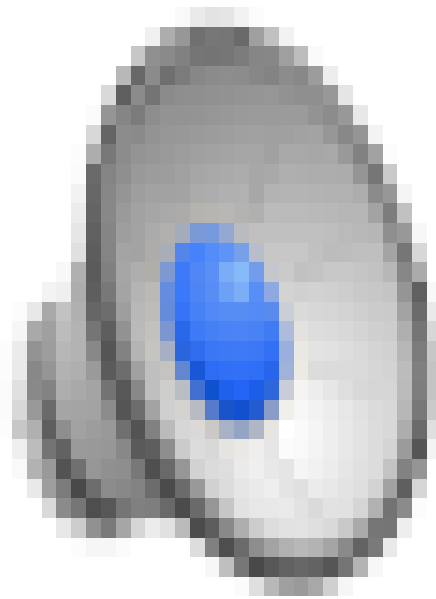
- **Initial western blotting techniques used nitrocellulose membrane**
- **Easily wetted by aqueous buffers for easy sandwich assembly**
- **Binding capacity: 80-100 ug/cm<sup>2</sup>**
- **Available in 0.45 μm and 0.22 μm pore sizes. Use small pore size for small proteins (< 15 kDa)**
- **Works well for Far Red and near IR fluorescent signals (700-800nm)**



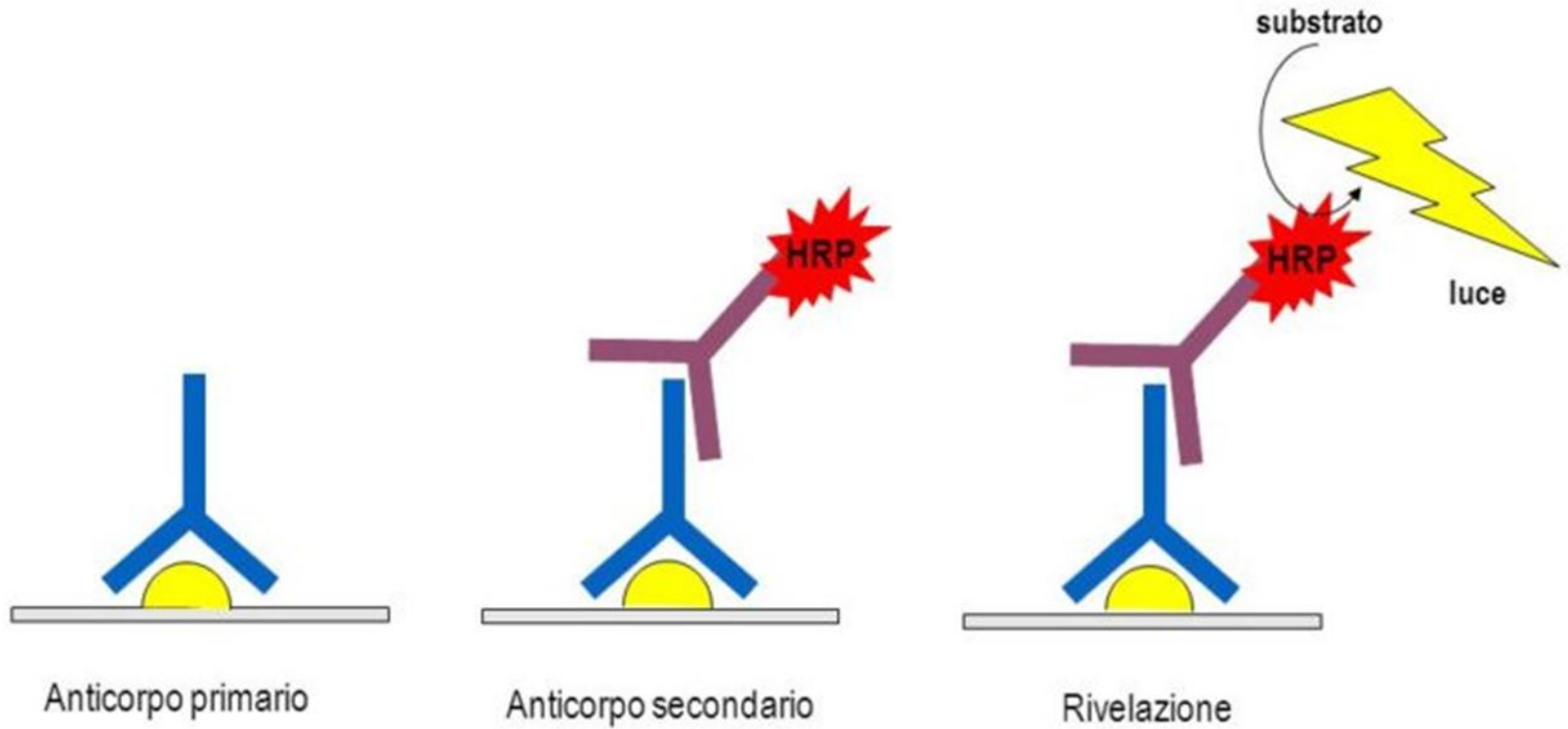
# PVDF membrane

- Polyvinylidene difluoride (PVDF) has a higher protein binding capacity (150-200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) than nitrocellulose
- PVDF can provide strong chemiluminescent signal
- Must first be wetted using organic solvent (MeOH) before making the transfer sandwich
- Also available in 0.45  $\mu\text{m}$ , 0.22  $\mu\text{m}$  and 0.1  $\mu\text{m}$  pore sizes
- Proteins blotted onto PVDF can be directly micro-sequenced (Matsudaira 1987)

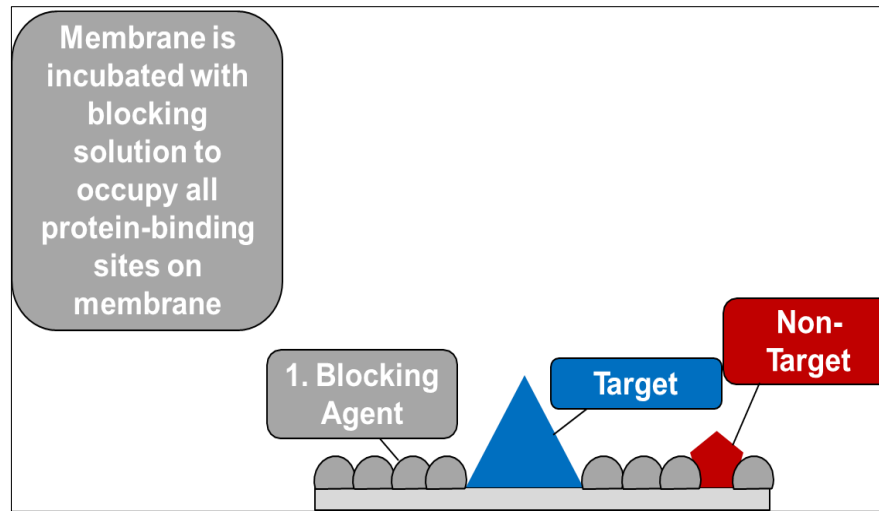
# Trasferimento su film nitrocellulosa



# Immunodetection

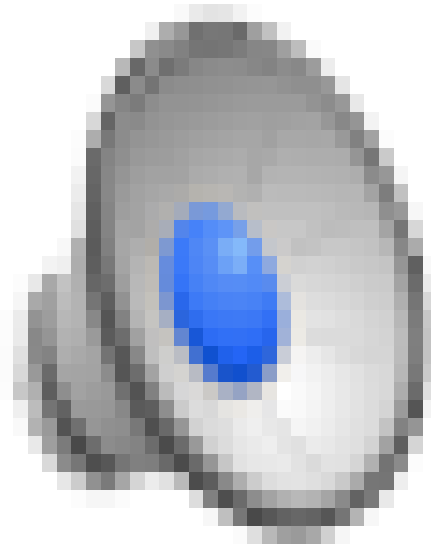


# Immunodetection

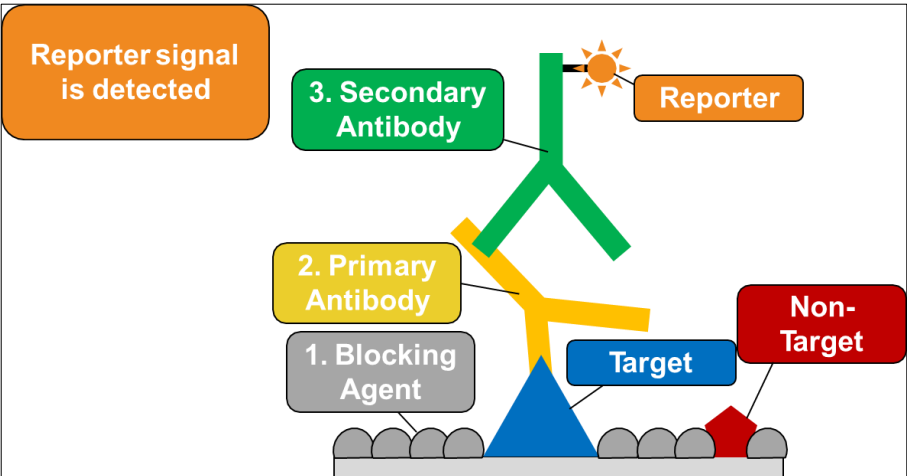
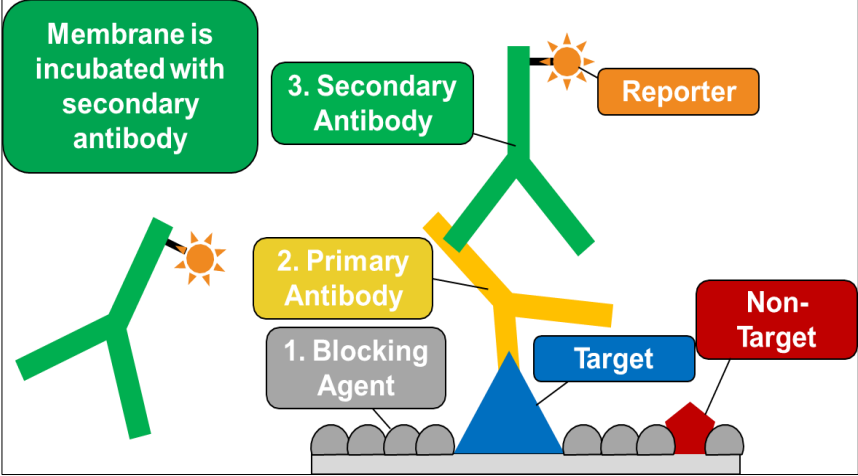
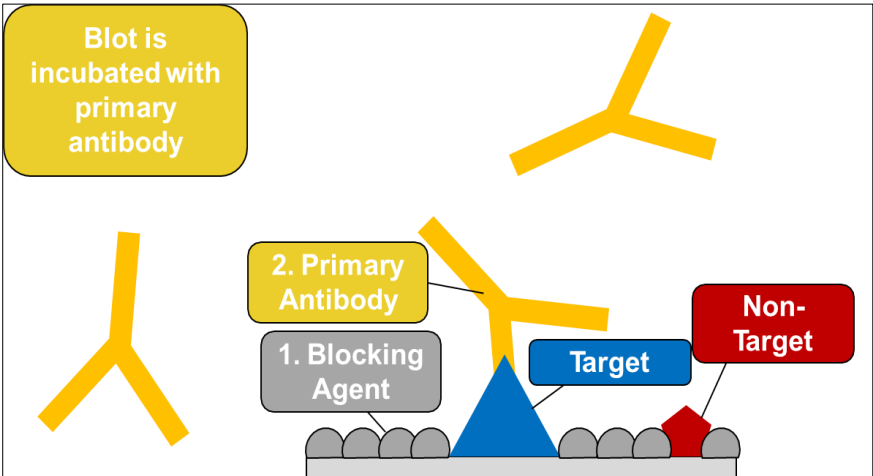


Blocking Agent	Advantages	Disadvantages
Non-fat Milk (1-5%)	cost	phosphoproteins, higher background
Casein (0.5-5%)	stringent, low background	phosphoproteins, low sensitivity
BSA (1-5%)	good for weak signals	cost, IgG can cause background
Fish Gelatin (1%)	non-mammalian source	endogenous biotin
EveryBlot	5 min, all types of blots	proprietary

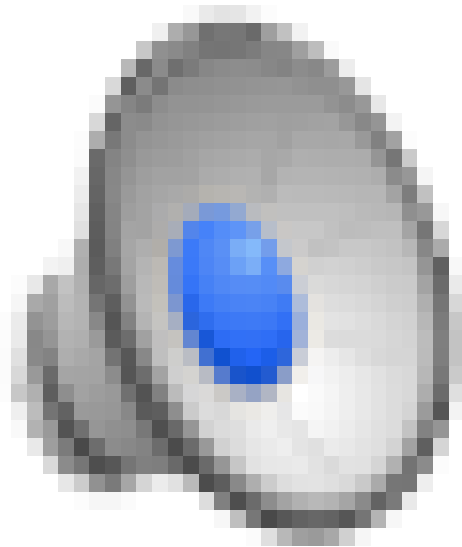
# Bloccaggio della membrana



# Immunodetection



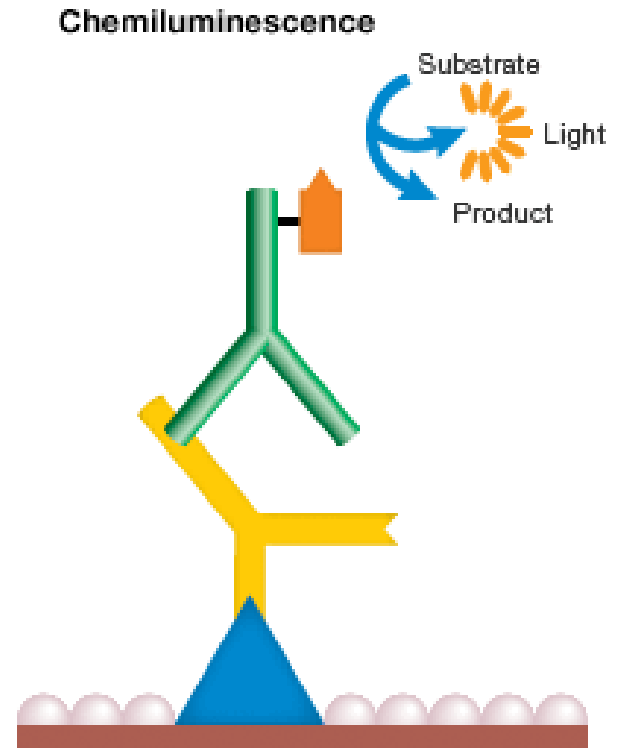
# Incubazione con anticorpo



# Immunodetection

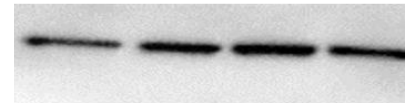
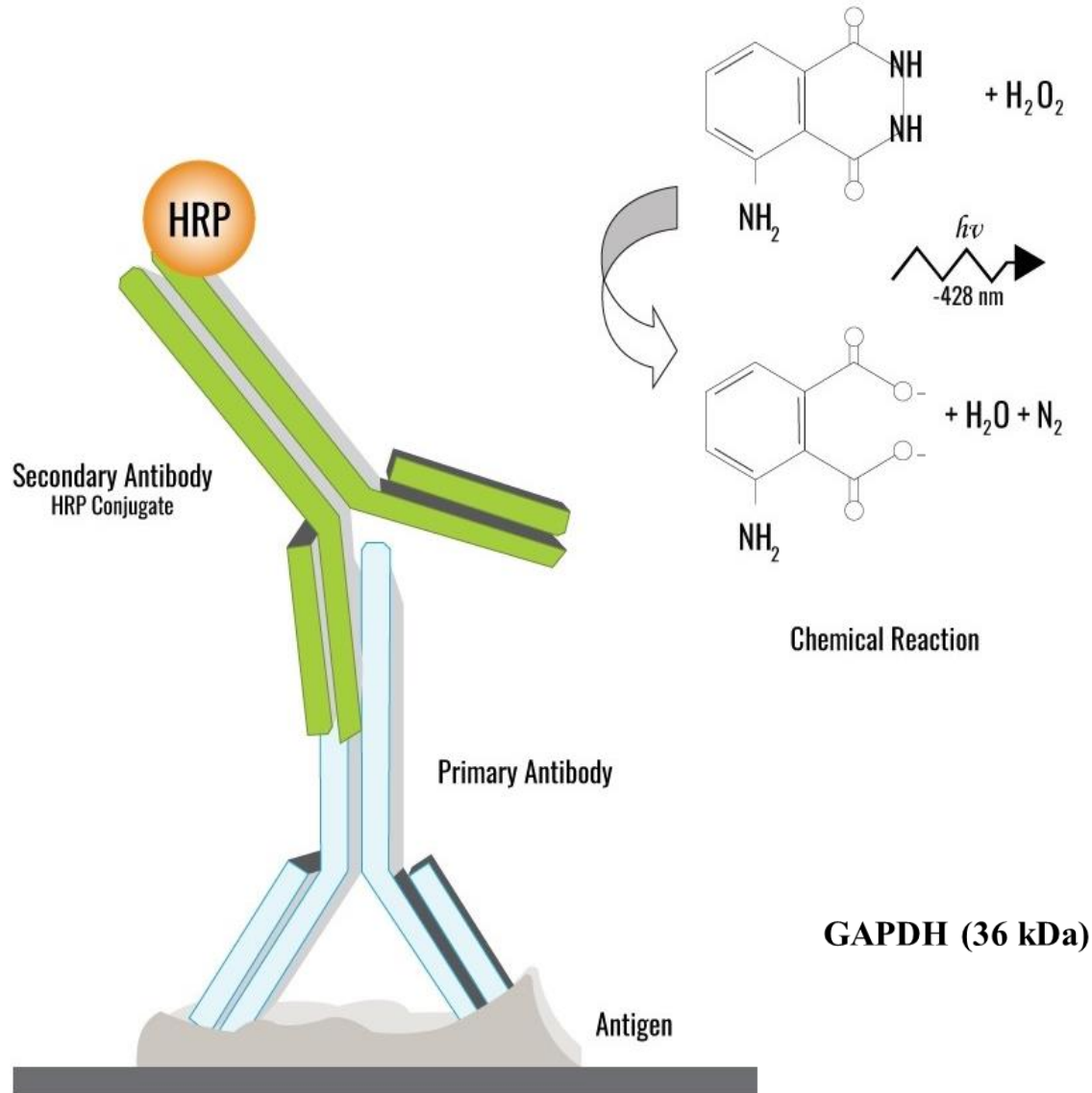
## Chemiluminescence

- Horseradish peroxidase (HRP)
- HRP reacts with substrate to produce light
- Special imaging equipment required
- High sensitivity
- No multiplexing





# Immunodetection

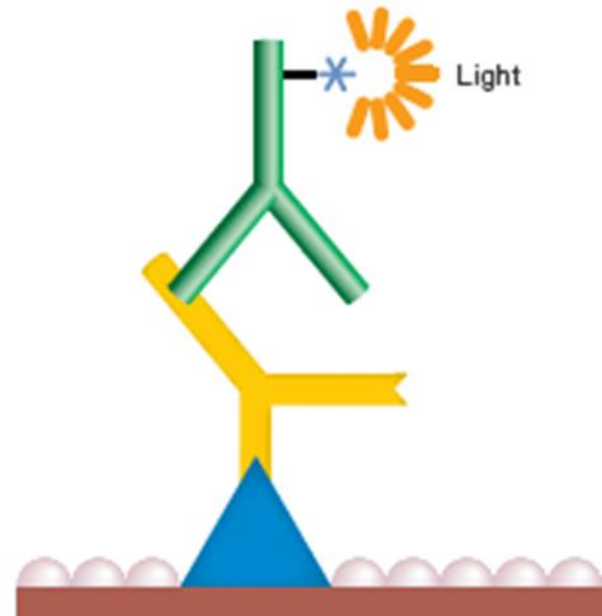


# Immunodetection

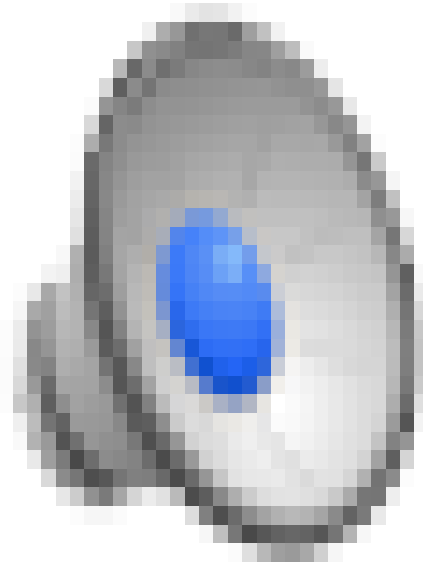
## Fluorescence

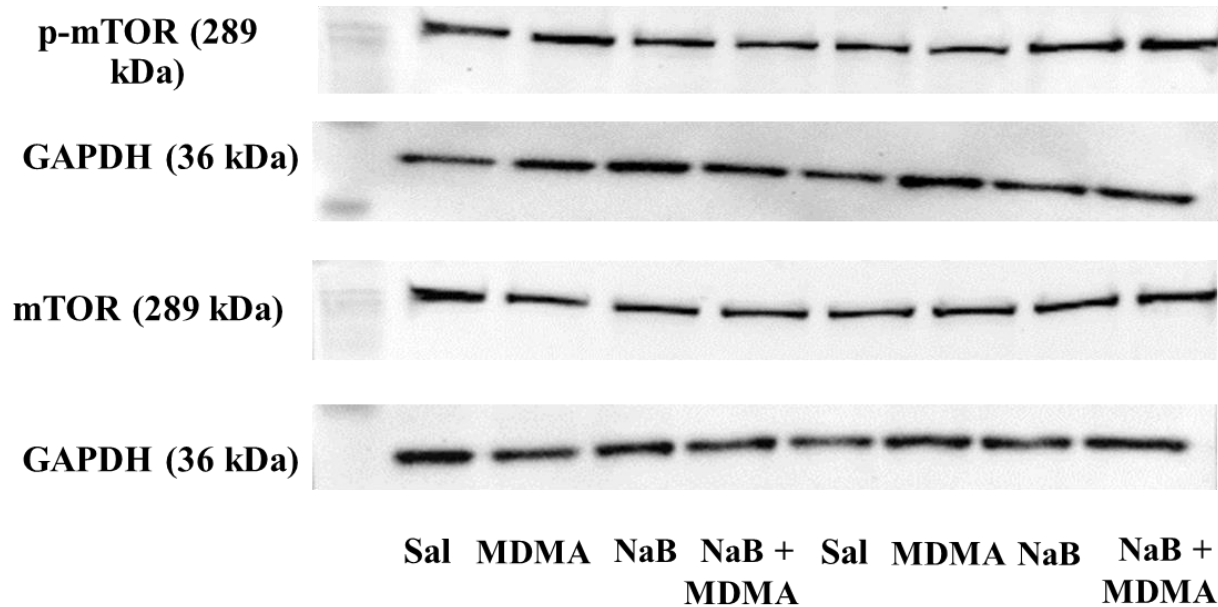
- **Fluorescent dye**
- **No substrate required**
- **Requires special imaging equipment**
- **Moderate to High sensitivity**
- **Fluorescence background**
- **Can multiplex**

C. Fluorescence



# Rivelazione del segnale





## Reasons for detecting multiple proteins:

- Loading control for normalization, i.e. housekeeping protein (not necessary with total protein normalization)
- Detecting different isoforms (e.g. phosphorylation)
- More than one target protein of interest

# Decting Multiple Proteins

## Option 1: Cutting the Blot

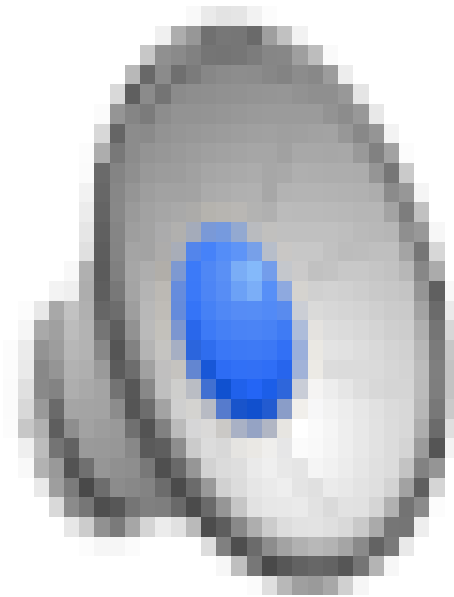
- Cut membrane after transfer and blocking to separate proteins of different MW
- Perform incubation and detection in parallel

## Option 2: Stripping and Reprobing

Re-use blot after standard immunodetection

- Strip antibodies with stripping buffer T
- Re-block and perform next immunodetection
- Develop blot after stripping to ensure there is no residual signal
- Loss of protein from membrane during stripping process

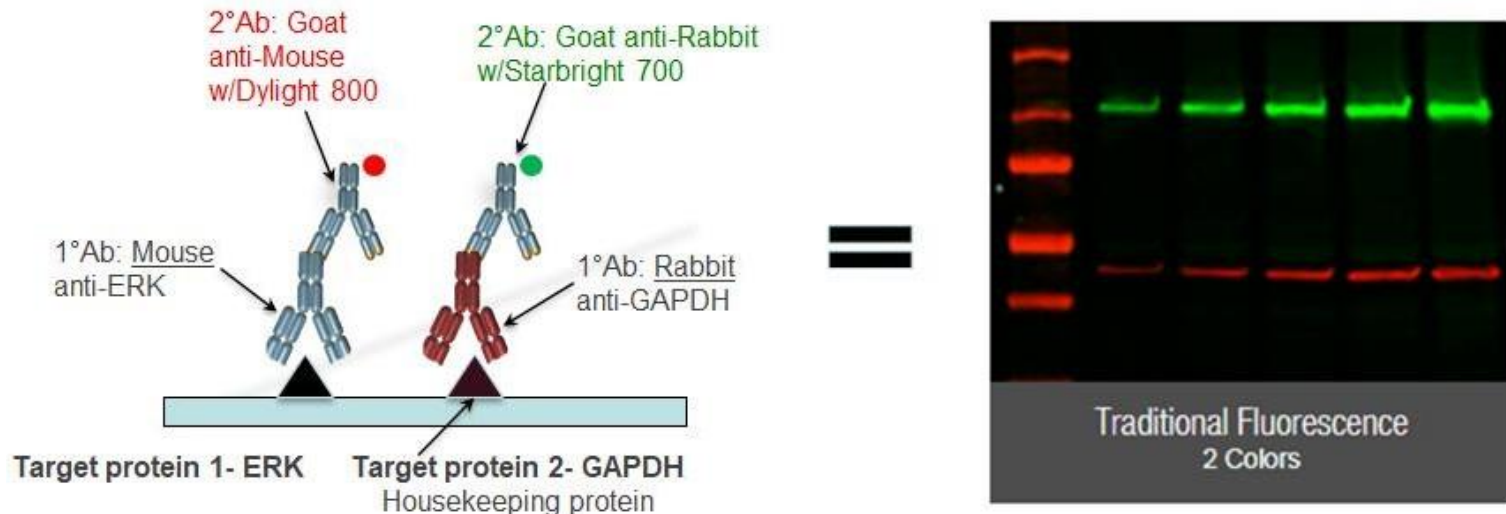
# “Stripping”



# Detecting Multiple Proteins

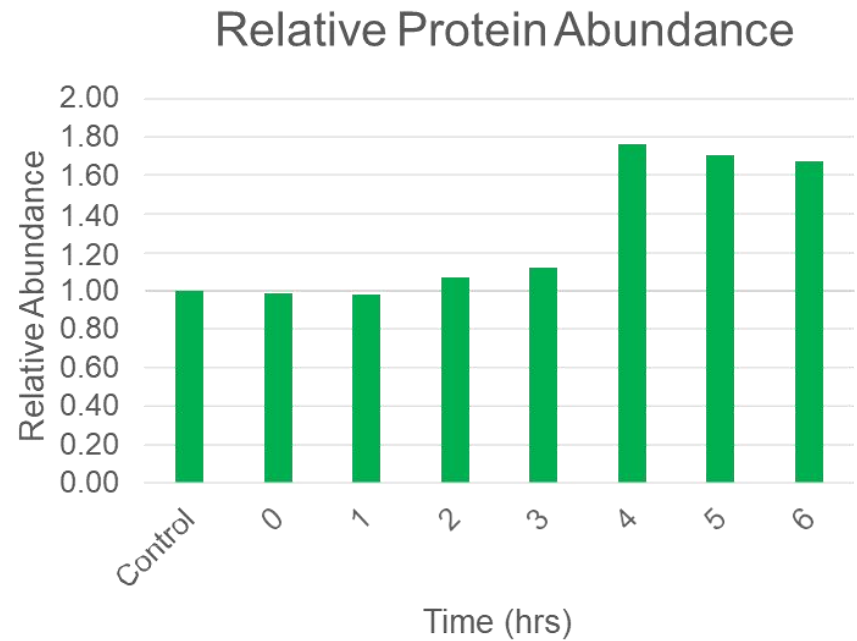
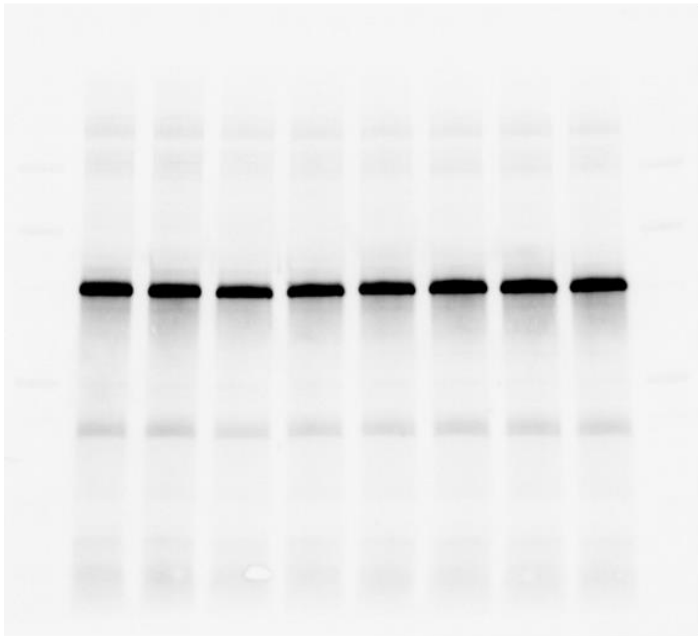
## Option 3: Fluorescence

- Can detect multiple target proteins without cutting or stripping blot
- Use primary antibodies from different species so that secondary Abs only bind to one primary Ab



# Image Analysis

Identify and quantify the target protein band(s) of interest, normalize to loading control and calculate relative abundance





# Image Analysis: loading control

## Housekeeping Protein (HKP)

Measure abundance of single protein by separate immunodetection.

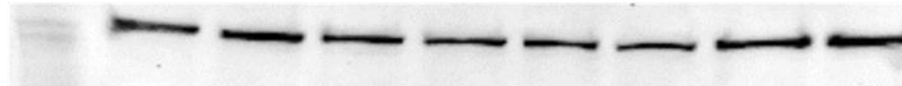
- Must ensure HKP expression does not change with treatment condition (requires extra experiments).
- Common HKPs: GAPDH,  $\beta$  actin, tubulin.
- Requires additional immunodetection.
- Limited linear dynamic range.
- HKPs often change expression.

## Total Protein

Measure total protein on blot.

- Use total protein detection (stain-free, Ponceau S).
- Not affected by changes to expression of a single HKP.
- Wider linear dynamic range.
- Simpler detection than HKP.
- Preferred method for normalization.

p-mTOR (289 kDa)



mTOR (289 kDa)



GAPDH (36 kDa)



# Real Time qPCR

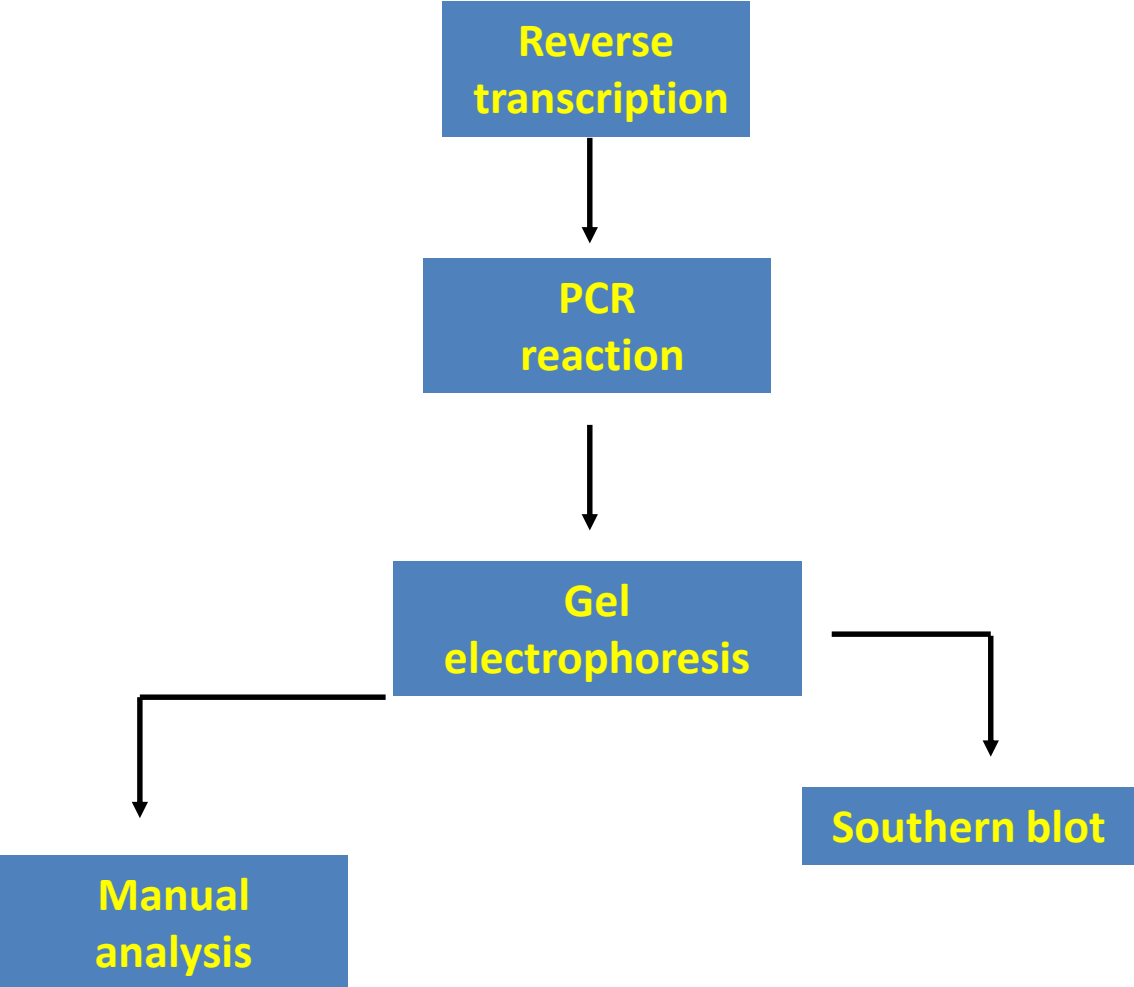
## La PCR

**una tecnologia che consente di amplificare una specifica sequenza di DNA milioni di volte in poche ore**

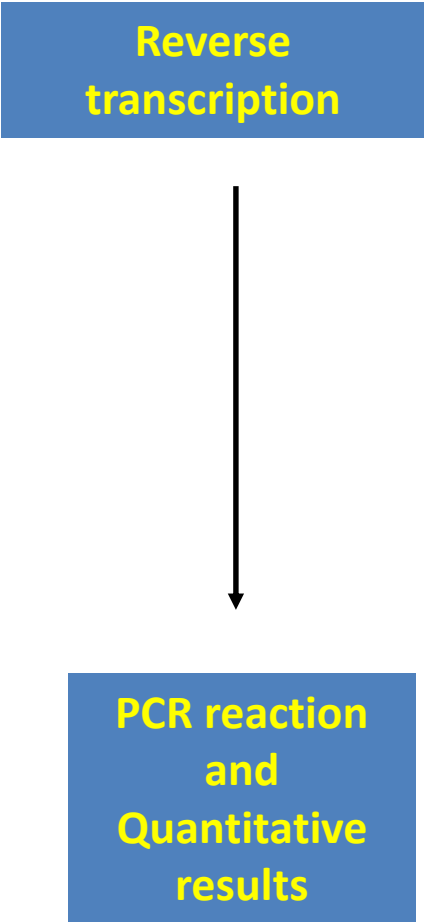
**quando siano note le estremità 5' e 3' della sequenza del gene di interesse**

- 1. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA**
- 2. Amplificazione del cDNA tramite PCR**
- 3. Quantifica dei prodotti amplificati**

# RT-PCR convenzionale



# Real-time RT-PCR



# 1- RETROTRASCRIZIONE (o **reazione di trasrzione inversa**)

è una fase comune sia a quella tradizionale che alla Real Time

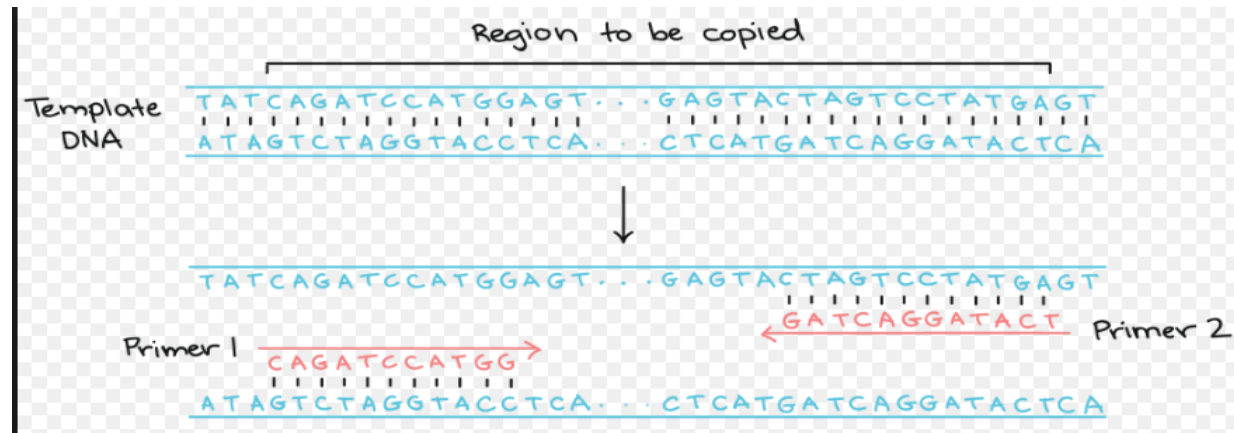
Consente di produrre una molecola di cDNA (**DNA complementare**) partendo da una molecola di RNA, grazie all'utilizzo dell'enzima Trascrittasi Inversa

che viene sfruttata in laboratorio per retrotrascrivere molecole di RNA (essenzialmente mRNA) in DNA complementare.

➤ e che possedendo attività **RNase H =>** degrada gli ibridi DNA-RNA che si formano durante la retrotrascrizione.

## 2- PCR

1. “Stampo”: una piccola quantità di DNA che si vuole amplificare (**templato**)
2. Il cosiddetto “enzima operaio”, l’enzima **Taq Polimerasi che sintetizza il DNA**
3. **“mattoni”**: riserva di nucleotidi liberi costituiti da Adenina, Timina, Citosina, Guanina (**dNTPs** : Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
4. **Primers (oligonucleotidi)**: sequenze di DNA a singola filamento (20-30 nucleotidi) che hanno la funzione di innescare la reazione di sintesi [un primer **Forward** complementare a un filamento di DNA all’inizio della regione bersaglio; l’altro **Reverse** complementare all’altro filamento, alla fine della regione bersaglio]
5. **Probe fluorescente**



## La **DNA Polimerasi** che sintetizza il DNA

è una DNA polimerasi **termostabile** (isolato dal batterio *Termophilus aquaticus*, **Taq polimerasi**), che resiste alle temperature elevate (80-90°C) rimanendo funzionale anche durante la fase di denaturazione a 94°C. Questa proprietà ha permesso l'automatizzazione dell'intera procedura, e un deciso miglioramento della specificità della reazione.

La Polimerasi **catalizza l'inserimento dei dNTP nella catena in formazione;** dispone i dNTP nella corretta sequenza complementare a quella del DNA di interesse.

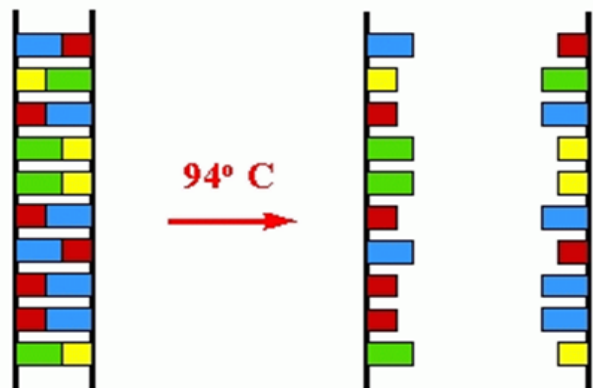
**La PCR avviene in tre fasi successive, ognuna delle quali si svolge ad una temperatura specifica.**

- 1. Denaturazione del template:** si svolge a **94-96°C** per consentire ai 2 filamenti di DNA complementari di separarsi
- 2. Appaiamento dei primers - annealing:** il DNA template rimane denaturato perché gli strands si trovano a concentrazioni troppo basse nella miscela di reazione per potersi ri-appaiare durante il breve periodo di incubazione. I primers si appaiano alle sequenze complementari al gene target
- 3. Elongation - sintesi del DNA:** in cui l'enzima DNA polimerasi aggiunge dNTP in direzione 5'→3'



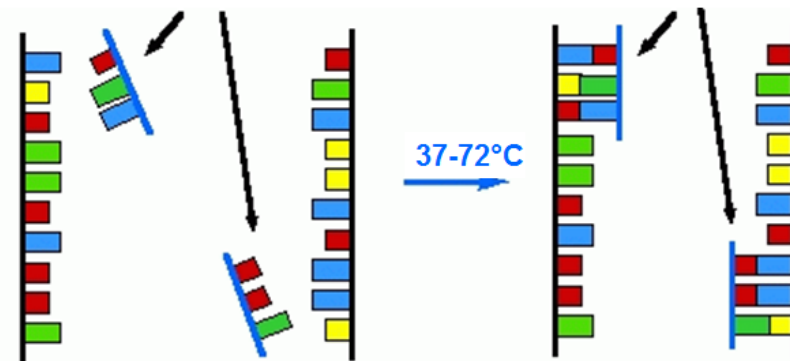
### fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



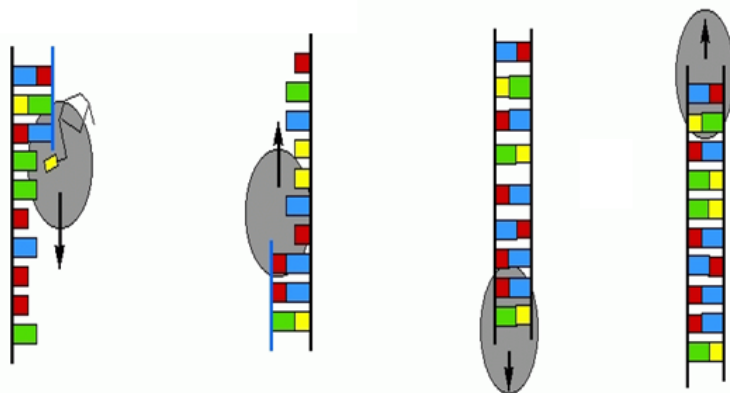
### fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

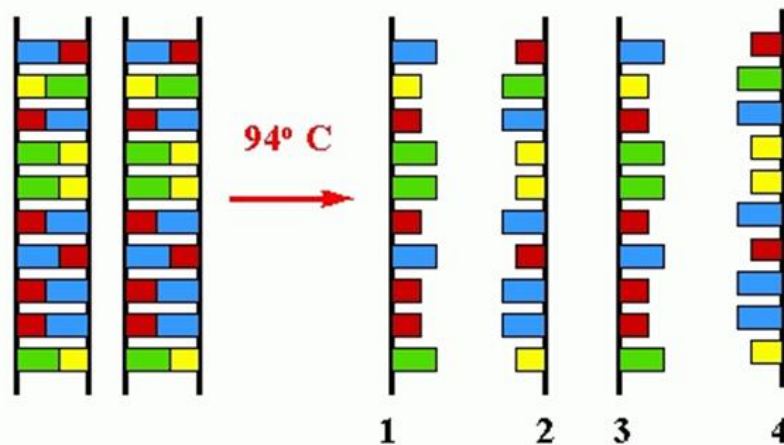


### fase 3: ESTENSIONE

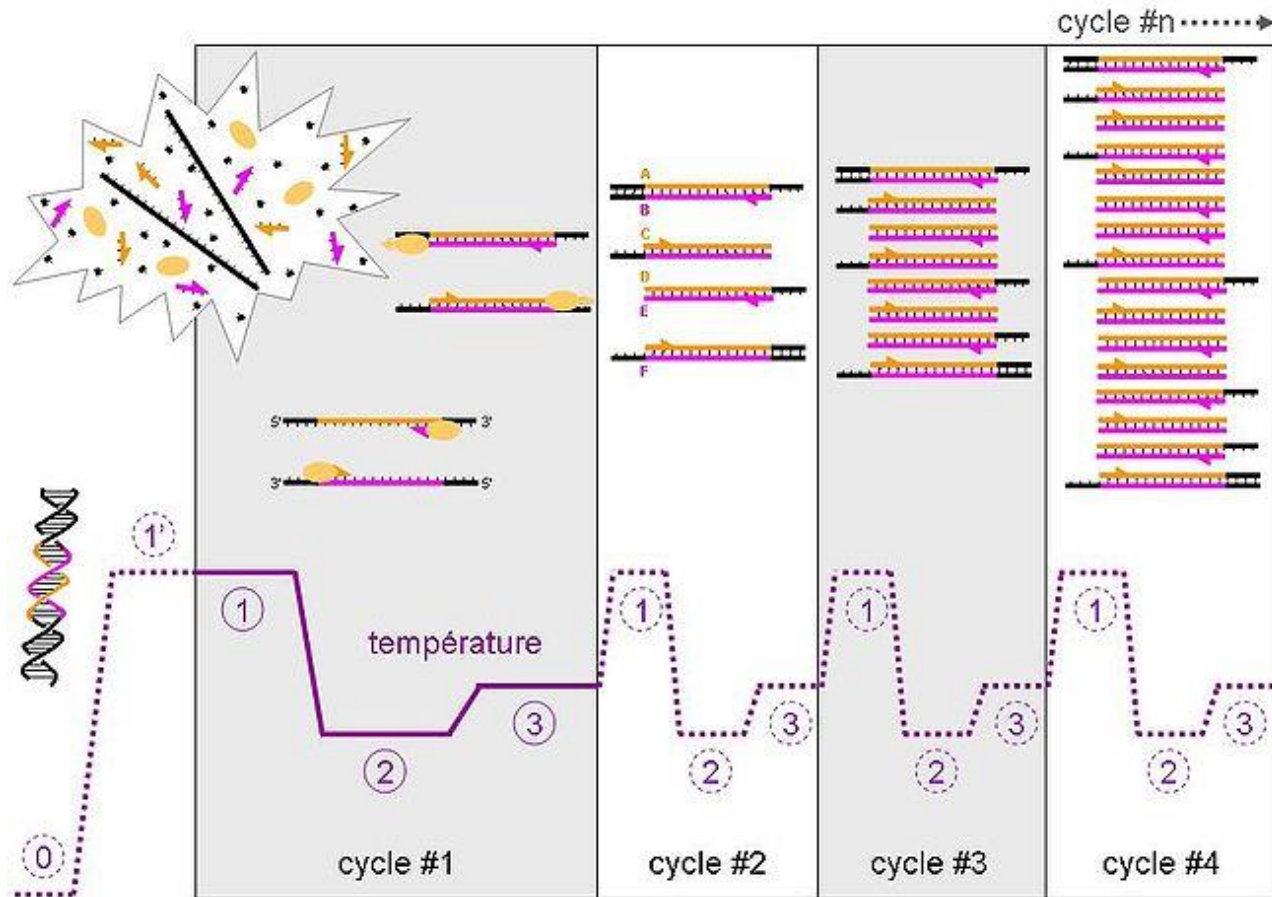
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



### IL PROCESSO SI RIPETE



# AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE



Un ciclo di sintesi risulta in due nuovi strand complementari, che, come le eliche parentali, possono ibridizzare con i primer a seguito di un successivo ciclo di denaturazione e *annealing* e **funzionare quindi a loro volta da template**.

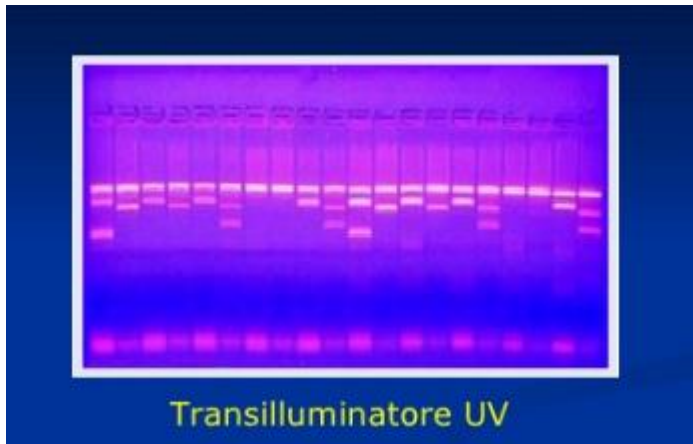
**La quantità del template si duplica ad ogni ciclo** di denaturazione, annealing ed estensione, accumulandosi **in maniera esponenziale**.

## RT-PCR convenzionale

I geni amplificati vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

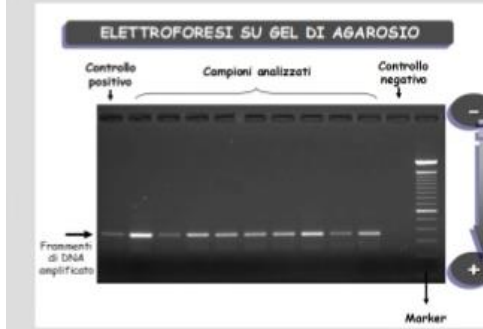
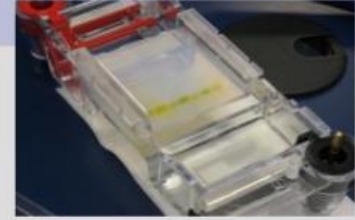
Il risultato dell' elettroforesi viene considerato **positivo** se si rileva il **frammento della lunghezza attesa** e su questo frammento si procede alla quantifica del prodotto di amplificazione (che è appunto il nostro gene d'interesse).

I prodotti di amplificazione vengono visualizzati nel gel mediante trattamento con un colorante fluorescente, come ad es. il bromuro di Etidio (EtBr). **Oggi si usano sostanze più sicure!!**



Elettroforesi su gel d'agarosio:

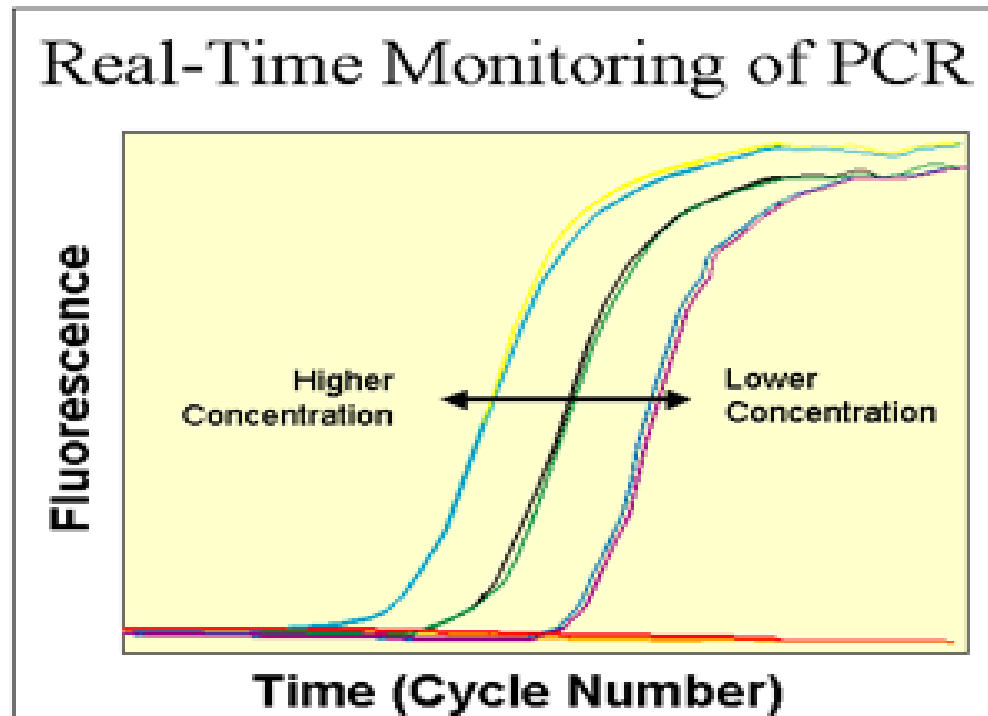
- agarosio 1%
- colorante gel
- loading dye
- marcatore di peso molecolare



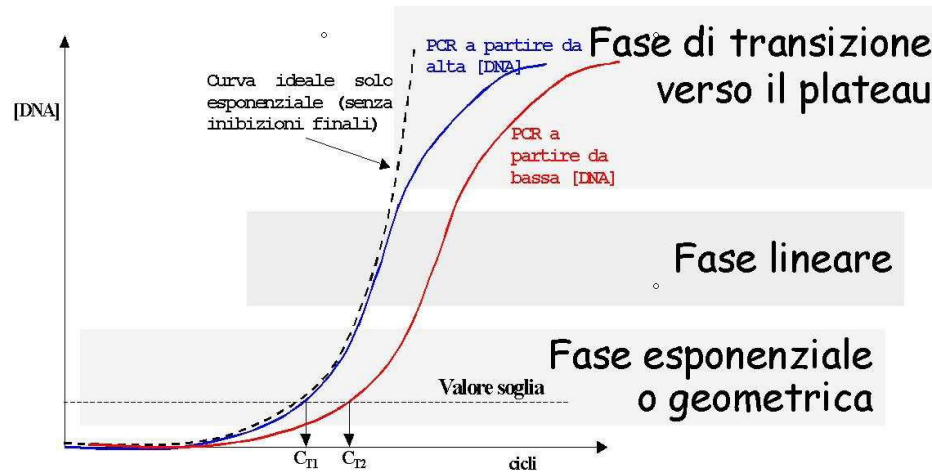
I raggi UV eccitano il bromuro di etidio intercalato tra due molecole di Timina. L'eccitazione UV provoca emissione di fluorescenza

# Perché è chiamata real time PCR?

Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale.



**Fase esponenziale:** i reagenti sono in eccesso, templato e prodotto sono a concentrazioni talmente basse che la rinaturazione del prodotto non compete con il legame dei primers. L'amplificazione procede ad una velocità **esponenziale** costante. L'efficienza è assimilabile al 100%.



**Lineare:** l'efficienza della reazione di amplificazione diminuisce. Il DNA si amplifica più lentamente, i reagenti iniziano ad essere consumati. Il momento in cui la velocità di reazione entra nella fase **lineare** di amplificazione è estremamente variabile.

**Plateau:** La reazione di amplificazione si ferma. Il DNA non viene più amplificato, i reagenti sono tutti esauriti (END-POINT).

# Probes fluorescenti

Esistono numerosi protocolli e **chimiche** diverse per Real-time PCR. Sono tutti basati sulla *detection* di prodotti di PCR attraverso la generazione di segnali fluorescenti.

Quelli usati più frequentemente sono:

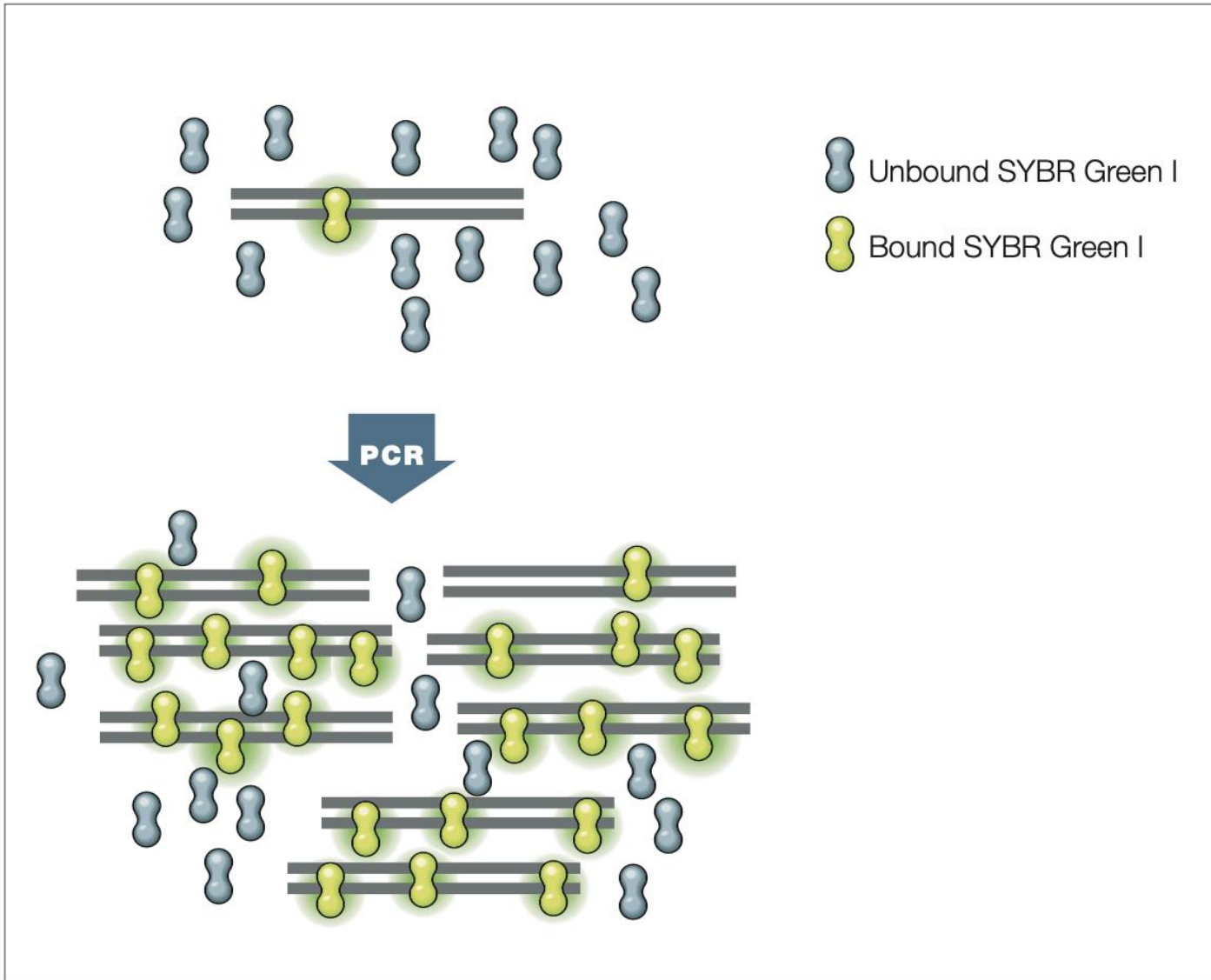
- SYBR GREEN
- TAQMAN PROBES

Il SybrGreen è un colorante fluorescente che ha bassa fluorescenza in soluzione ma emette un forte segnale fluorescente quando si lega al dsDNA, mano a mano che i prodotti di PCR si accumulano, la fluorescenza aumenta.

**E' il metodo più semplice ed economico per fare Real-Time.**



# SYBER GREEN

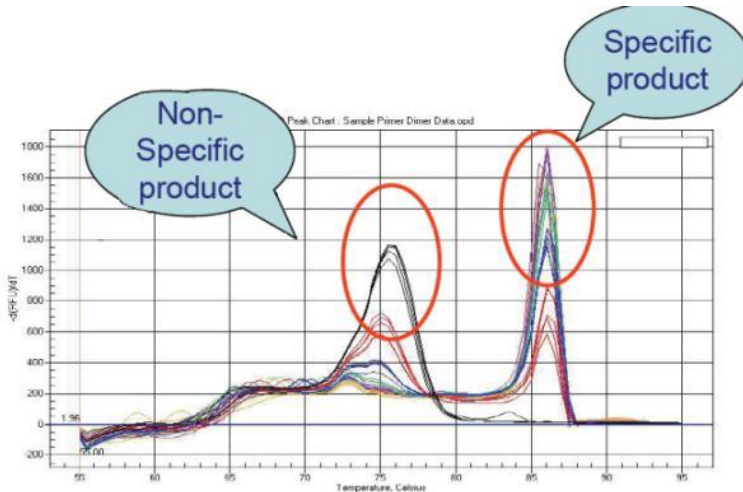


**Fig. 2.1. DNA-binding dyes in real-time PCR.** Fluorescence dramatically increases when the dye molecules bind to dsDNA.

**Poiché il SybrGreen si lega a qualsiasi dsDNA presente nella reazione, compresi i dimeri di primers e i prodotti aspecifici, il che può indurre una sovrastima della concentrazione del target.**

## **ANALISI della CURVA di MELTING**

**Consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici.**



Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza.

La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla  $T_m$  (temperatura di melting a cui i primers si disaccoppiano dal template) del prodotto



# TaqMan Probes

Le sonde TaqMan sono oligonucleotidi disegnati, esattamente come i primers delle PCR, per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare

Il sistema TaqMan è costituito da 2 primers + 1 sonda (probe)

Il probe è costituito da un oligonucleotide marcato con fluorocromi alle estremità 5' e 3'

• *Fluorocromo 5'* →

REPORTER

R = possiede un elevata energia ed è in grado di emettere fluorescenza

• *Fluorocromo 3'* →

QUENCHER

Q = è una molecola a bassa energia con il ruolo di spegnere la fluorescenza di R.

**l'aumento della fluorescenza emessa da R è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati.**

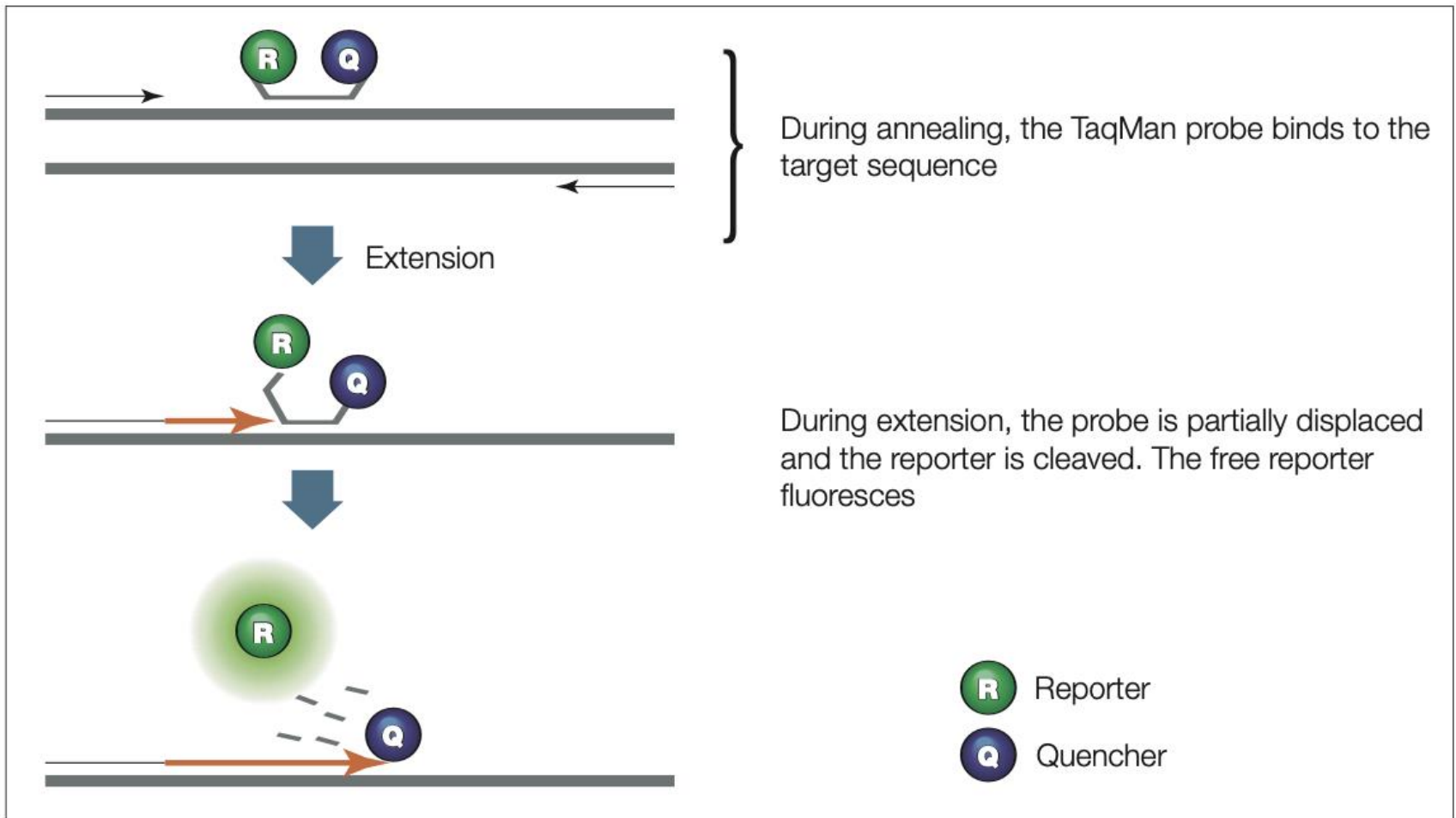


Fig. 2.3. TaqMan assay.

## Analisi Quantitativa relativa

Questo tipo di approccio viene usato soprattutto in studi di gene-expression.

L'approccio si basa sull'uso di uno **standard interno** che in genere è un house-keeping gene (gene che non “dovrebbe” variare nell'espressione), dotato delle seguenti caratteristiche:

- Stesso numero di copie in tutte le cellule
- Espresso in tutte le cellule

I più usati sono:

- ✓ **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)**
- ✓ **Beta-actina**

# Metodo comparativo del $\Delta\Delta C_t$

La quantità del target viene normalizzata rispetto al controllo endogeno (**house-keeping gene**) ed espressa relativamente ad un campione di **controllo**.

$$\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ campione} - C_t \text{ reference}) - \text{media campione controllo}$$

## 4.2.3.1 The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) Method

The  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method for relative gene expression analysis is widely used and easy to perform. This method assumes that both target and reference genes are amplified with efficiencies near 100% and within 5% of each other. Before using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, it is essential to verify the assumptions by determining the amplification efficiencies of the target and the reference genes. The amplification efficiency of the target and the reference gene can be determined by the method outlined in Section 1.1.3.

Once you have established that the target and reference genes have similar and nearly 100% amplification efficiencies, you can determine the relative difference in expression level of your target gene in different samples using the steps below:

First, normalize the  $C_T$  of the target gene to that of the reference (ref) gene, for both the test sample and the calibrator sample:

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$$
$$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$$

Second, normalize the  $\Delta C_T$  of the test sample to the  $\Delta C_T$  of the calibrator:

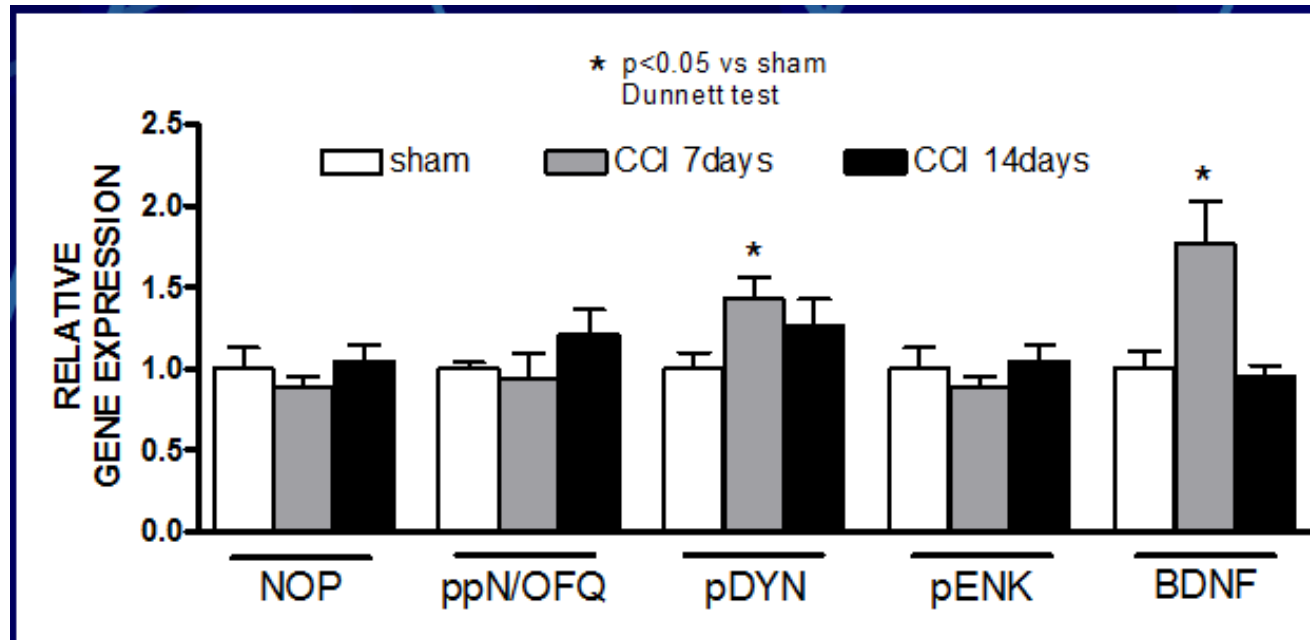
$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$$

Finally, calculate the expression ratio:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Normalized expression ratio}$$

The result obtained is the fold increase (or decrease) of the target gene in the test sample relative to the calibrator sample and is normalized to the expression of a reference gene. Normalizing the expression of the target gene to that of the reference gene compensates for any difference in the amount of sample tissue.

# Esempio di analisi quantitativa tramite PCR dei geni di interesse in un modello di dolore neuropatico



Sham= falsamente operati

CCI 7days= operati e sacrificati al giorno 7

CCI 14days= operati e sacrificati al giorno 14

# Tutti gli impieghi della Real Time PCR:

- ✓ Clonaggio DNA e cDNA, di geni o frammenti genici
- ✓ Mutagenesi *in vitro*
- ✓ Ingegnerizzazione DNA
  
- ✓ Test diagnostici per la presenza di agenti infettivi
- ✓ Diagnosi prenatale di malattie genetiche
- ✓ Analisi di predisposizione genetica a patologie
  
- ✓ **analisi di variazioni di sequenza alleliche**
- ✓ **sequenziamento di DNA e cDNA**
  
- ✓ Quantificazione delle differenze nell'espressione genica
- ✓ Identificazione di cambiamenti nell'espressione di geni sconosciuti
- ✓ Analisi forense di situazioni criminose (scienze forensi)
- ✓ Controllo di qualità industriale

**Due modi per agire sui geni e i loro prodotti:  
modificare il DNA o eliminare l'mRNA**

**1**



**Tramite la terapia genica  
o DNA editing (o *genome editing*)**

**2**



**Tramite l'impiego di aODN  
*Small interfering RNA (siRNA)***

**1** Lo studio delle basi genetiche associate ad una malattia attraverso l'impiego delle moderne strategie di sequenziamento, ha permesso di associare diverse mutazioni a specifiche condizioni patologiche.

Da queste osservazioni sono nate nuove strategie volte a :

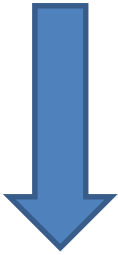
- Inserire una sequenza di DNA codificante per una proteina non funzionante o mancante → **terapie genica**
- Sostituire il DNA mutato con una sequenza genica corretta → **DNA editing**





# I primi approcci volti a modificare il DNA hanno sfruttato:

→ il meccanismo di ricombinazione del DNA, che presentava alcune difficoltà come la frequenza con cui poi veniva espresso il prodotto. Nonostante l'utilizzo di enzimi di restrizione ancora era difficile tagliare con precisione il DNA



## Problematiche superate con la CRISPR-Cas9

Questo approccio permette di:

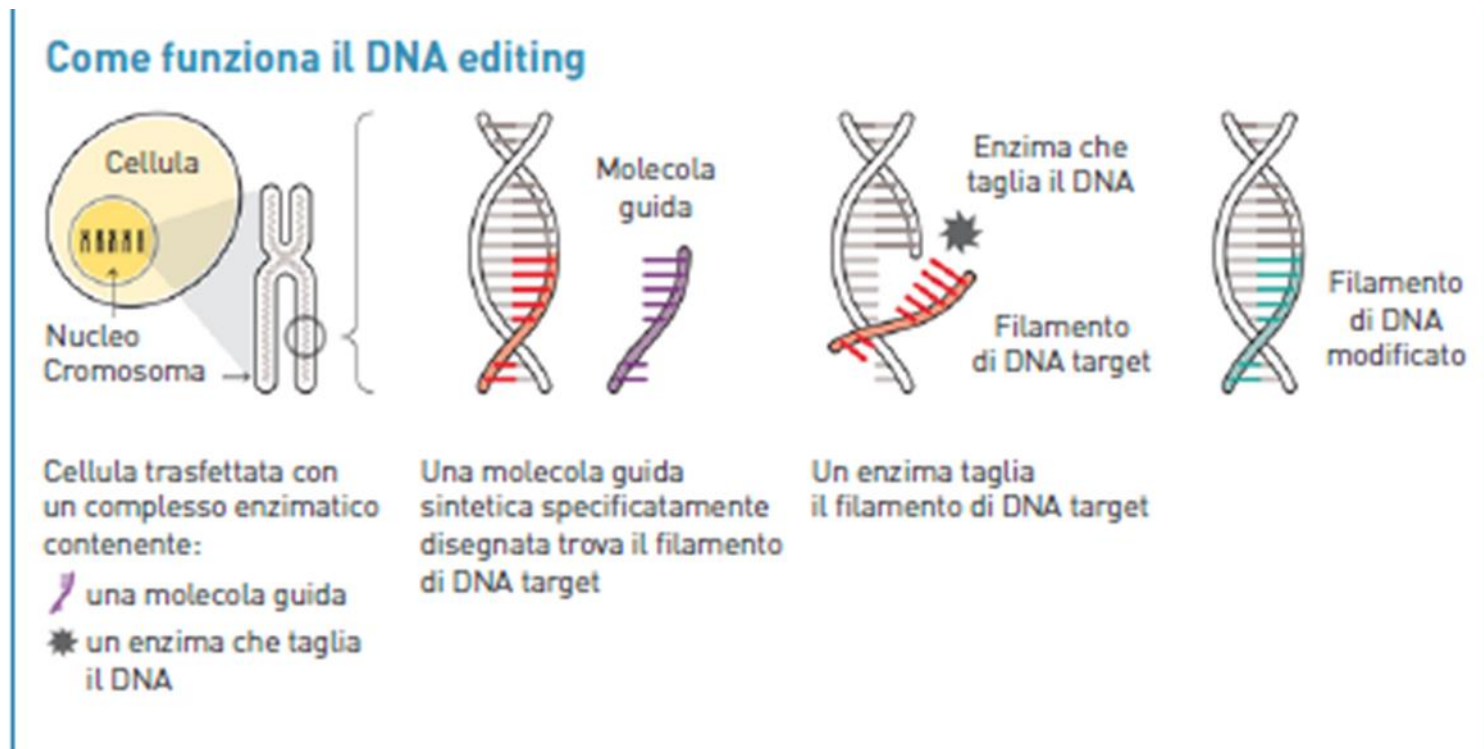
- 1) eliminare una sequenza di DNA
- 2) introdurre o correggere una mutazione
- 3) inserire una sequenza di DNA
- 4) attivare o reprimere l'espressione di un gene.

Questo approccio presenta ad oggi alcune limitazioni ed è legato anche ad aspetti etici e alla necessità di un'attenta valutazione del bilancio rischio/beneficio.

# Il complesso CRISPR-Cas9 è un complesso formato da :

Una proteina Cas9 ad attività enzimatica e una sequenza di RNA

Trae origine da un meccanismo di immunità adattativa che i batteri hanno conservato per riconoscere e proteggersi da DNA esogeno.

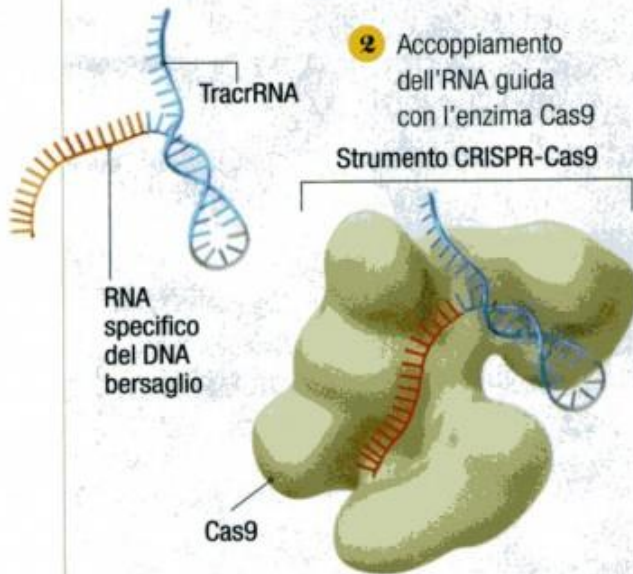


# Come funziona lo strumento CRISPR-Cas9

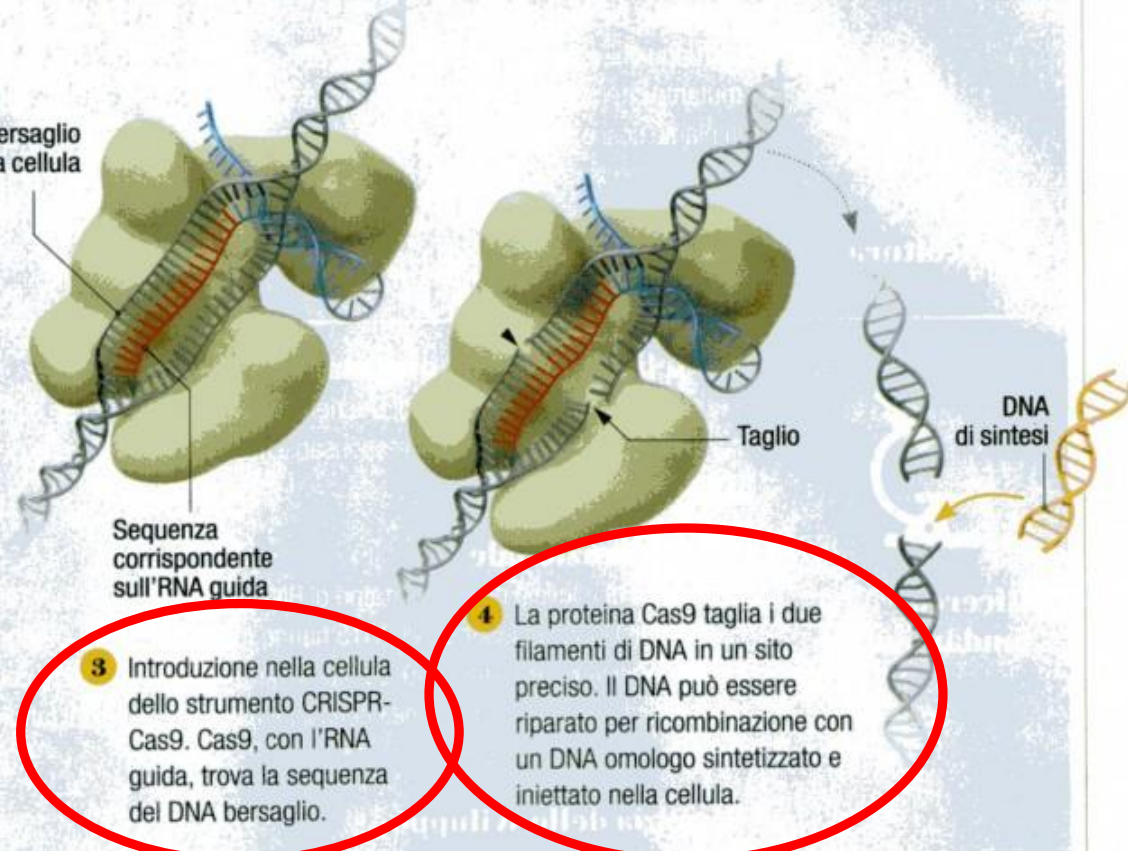
I batteri hanno sviluppato un'arma precisa ed efficace, CRISPR-Cas9, contro le invasioni virali. I biologi l'hanno sfruttata per farne forbici molecolari che tagliano, nelle cellule, il DNA in un sito bersaglio. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedono enzimi spe-

cifici in ciascuna situazione, lo strumento CRISPR-Cas9 utilizza la stessa proteina, l'enzima Cas9, per ogni situazione. Il solo elemento specifico da costruire è un RNA, che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare. E gli RNA sono molto più semplici da sintetizzare degli enzimi.

- 1 Costruzione di un RNA guida per fusione delle sequenze di un RNA batterico (tracrRNA) e di un RNA specifico (complementare) della sequenza del DNA bersaglio.



DNA bersaglio nella cellula



## 2 Agendo sull'RNA andiamo ad agire su un prodotto, senza quindi modificare il codice genetico.

La tecnica di interferenza dell'RNA deriva dal concetto generale che:

**Un RNA in presenza di una catena complementare di RNA forma un doppio filamento molto stabile che non può essere tradotto**

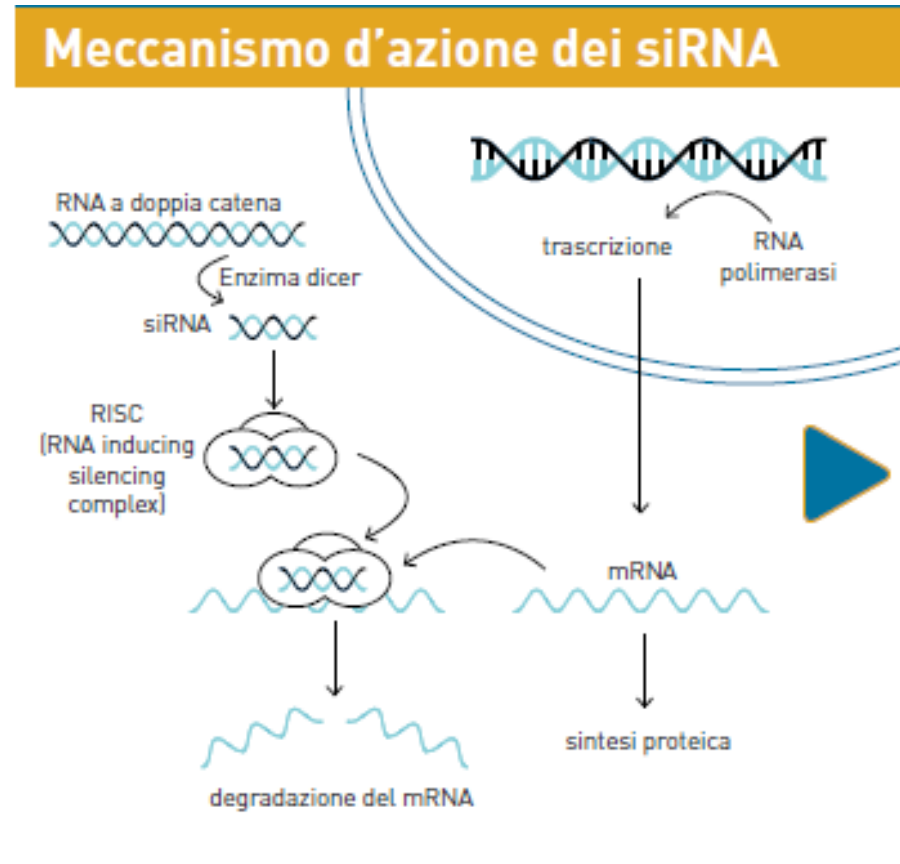
**= sintesi proteica abolita**

**Andrew Fire and Craig Mello  
nel 2006 premio Nobel**

Scoprirono che quando una cellula è esposta ad un **RNA a doppio filamento** si può avere un silenziamento genico specifico perché:

**1<sup>^</sup>- si attivano delle RNA endonucleasi che lo tagliano in piccoli frammenti** perché lo riconoscono come estraneo (**siRNA**)

**2<sup>^</sup>- i siRNA si associano al complesso RISC che li guida verso l'RNA complementare → a cui si legano favorendone la degradazione**



**SILENZIAMENTO POST-TRASCRIZIONALE**

# **Analisi delle modifiche istoniche**

# Chip = CHROMATIN IMMUNO PRECIPITATION

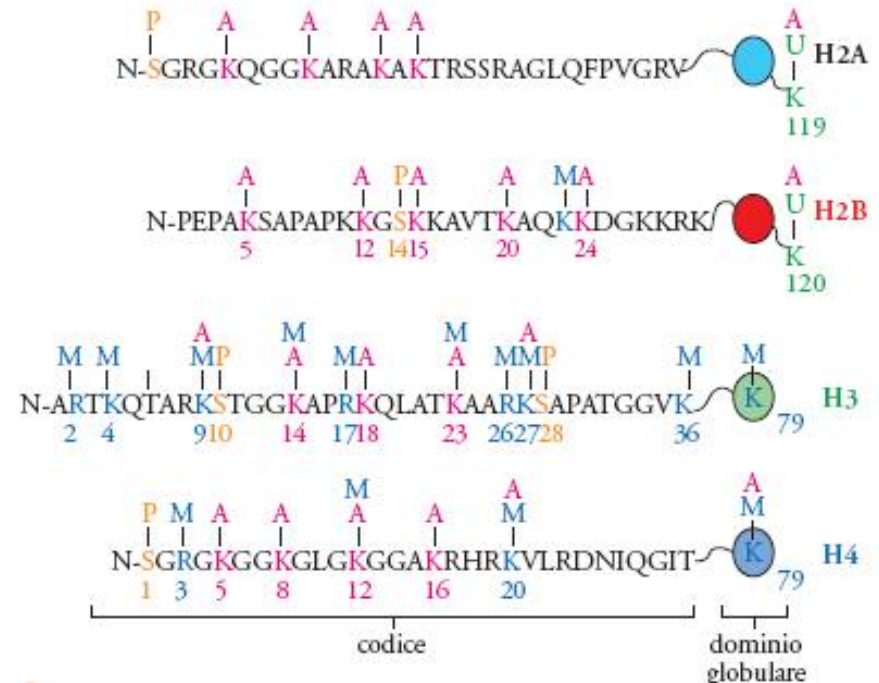
Tecnica che serve a fornire informazioni sulle interazioni DNA e proteine

## ISTONI:

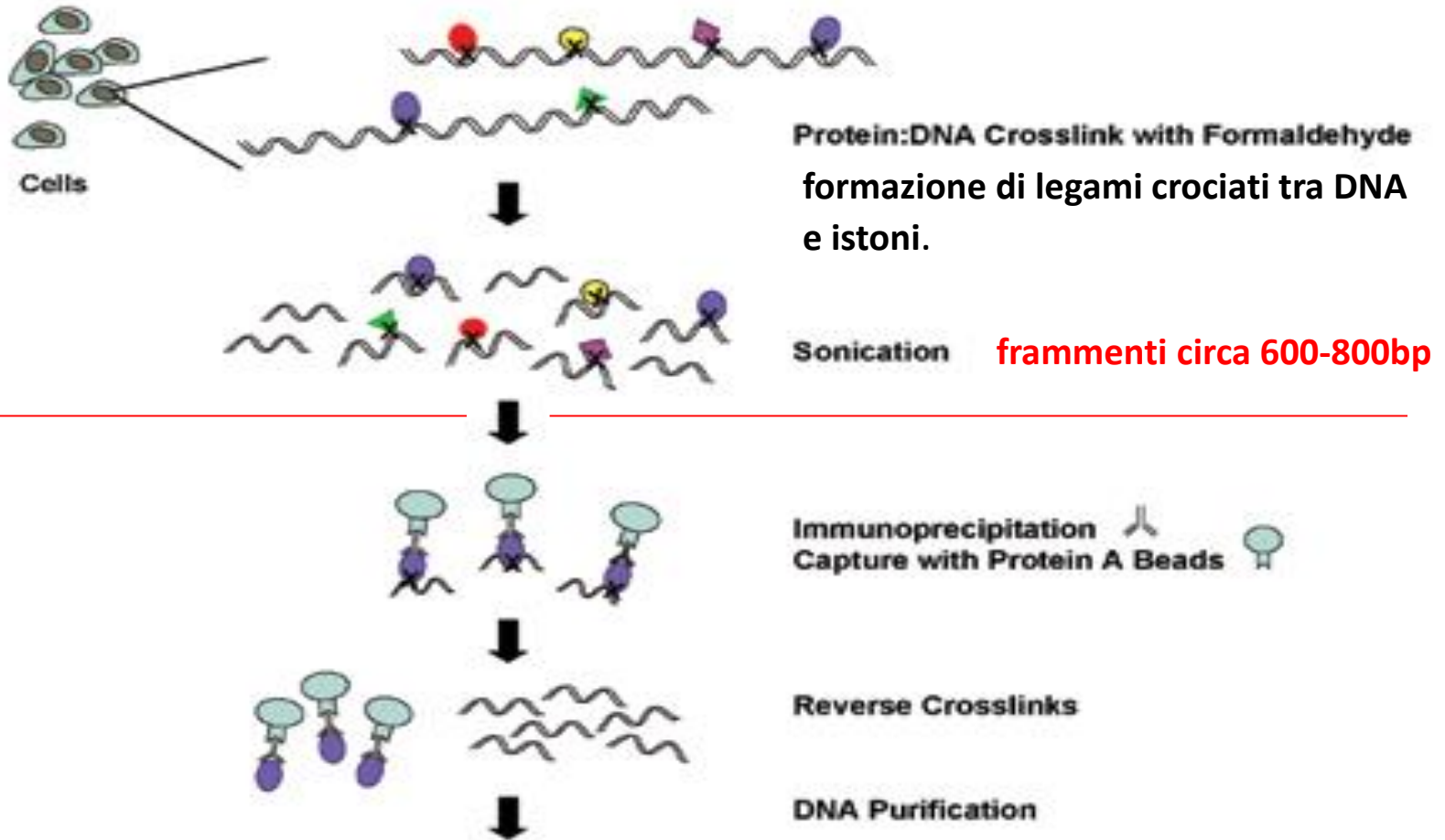
Sono proteine basiche con cariche + (Lys e Arg) costituiscono la componente strutturale della cromatina; ruolo fondamentale nel suo compattamento

Le code N-Terminali degli istoni possono subire una serie di modificazioni (acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione).

Il livello di queste modifiche può essere misurato all'interno di un campione biologico (cellule-sistema in vitro; o tessuti) tramite ChIP



## 1^ Estrazione della cromatina



## 2^ Immunoprecipitazione e purificazione prodotti

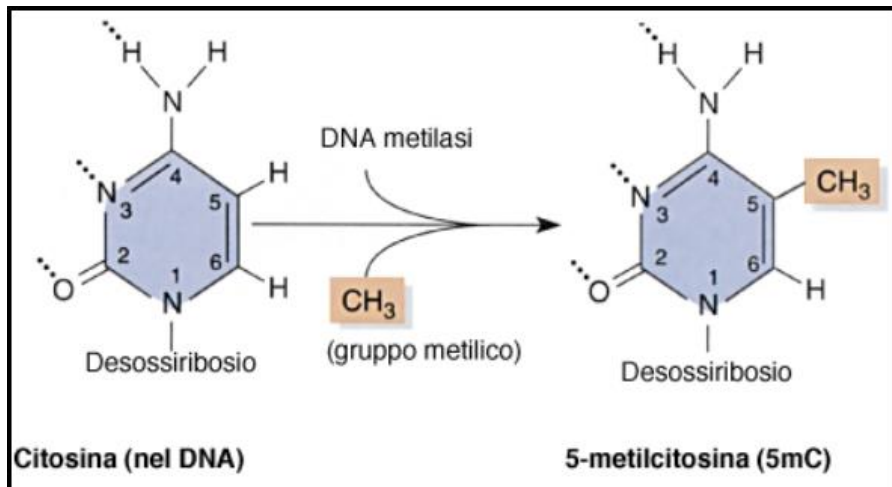
## 3^ Real Time PCR

# Analisi del grado di Metilazione del DNA

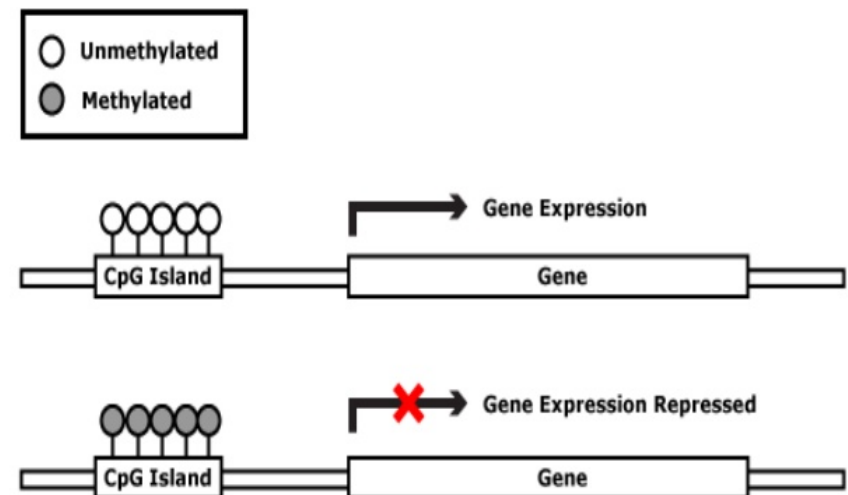
Dei circa 3 miliardi di coppie di basi che costituiscono il genoma di mammifero, circa il **40% sono coppie CG e il 2-7% di esse è metilato.**

Nelle cellule eucariotiche la metilazione è a carico della Citosina (C) delle **isole CpG** che sono tratti di genoma, nei quali le sequenze CpG sono 10 volte più frequenti, si trovano soprattutto in prossimità dei siti di inizio della trascrizione.

L'enzima DNA metiltrasferasi (DNMT) opera una metilazione in posizione 5 della citosina



## DNA Cytosine Methylation



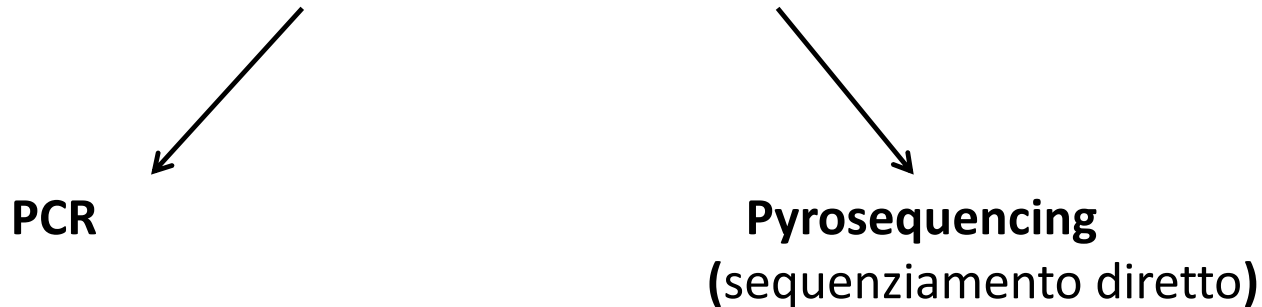


# La metilazione del DNA è associata al silenziamento genico

Esistono diverse metodiche per valutare il grado di metilazione di un gene:

- Metodiche **ELISA** che valutano il grado totale di metilazione in un campione biologico
- **Tecnica della bisulfitazione** → una reazione chimica che causa la deaminazione delle citosine, ma non quella delle metil-citosine.

In seguito è possibile analizzare la percentuale di metilazione attraverso



Le ultime due possono essere effettuate con precisione in specifiche regioni promotore dei geni di interesse.

**Pyrosequencing** è quella che più delle altre permette una quantificazione accurata di ogni singola citosina e una variabilità tra i diversi run molto bassa