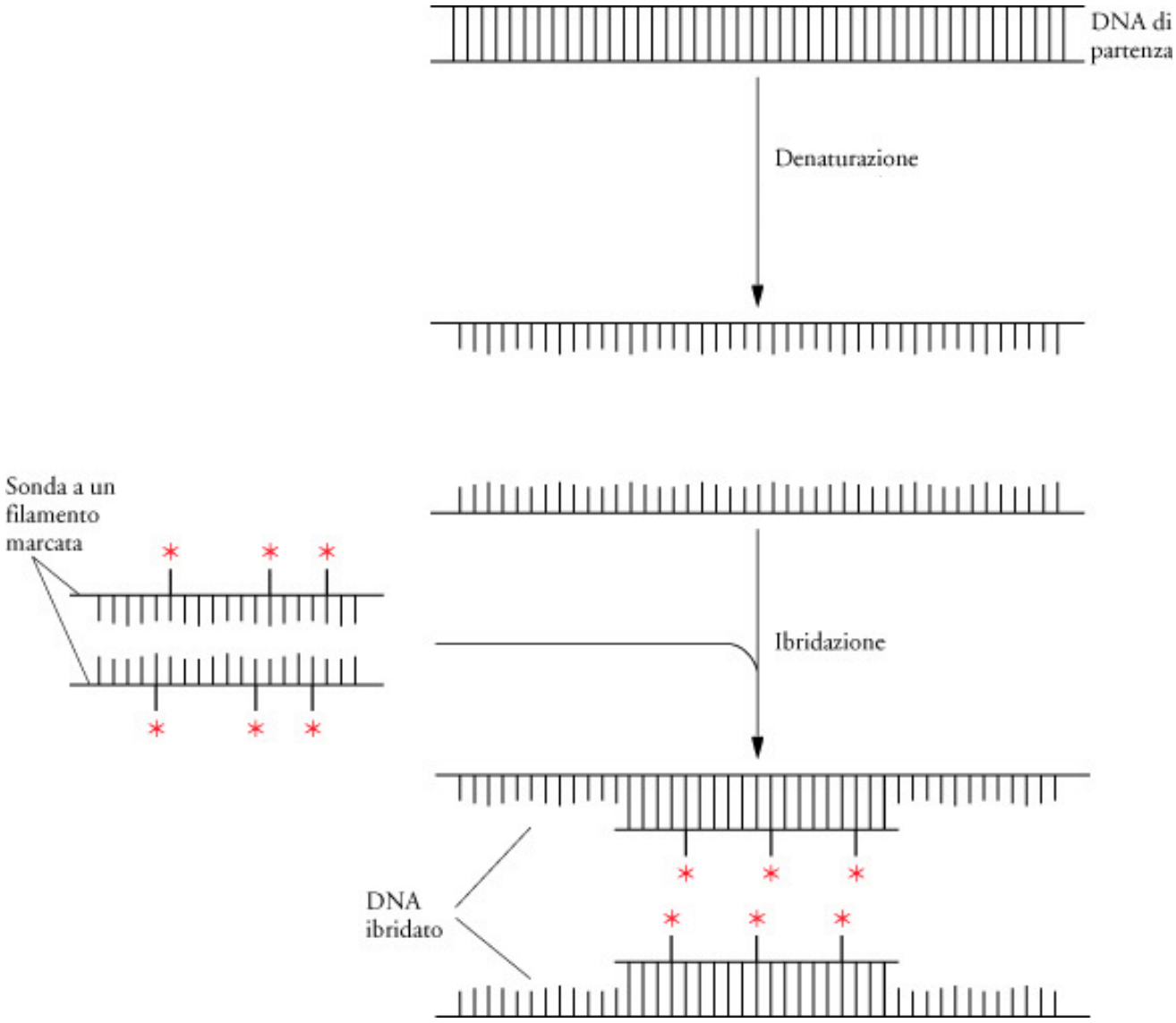
Ibridazione

Tecniche di ibridazione:
dal southern blot agli arrays

Biologia Molecolare settembre 2009

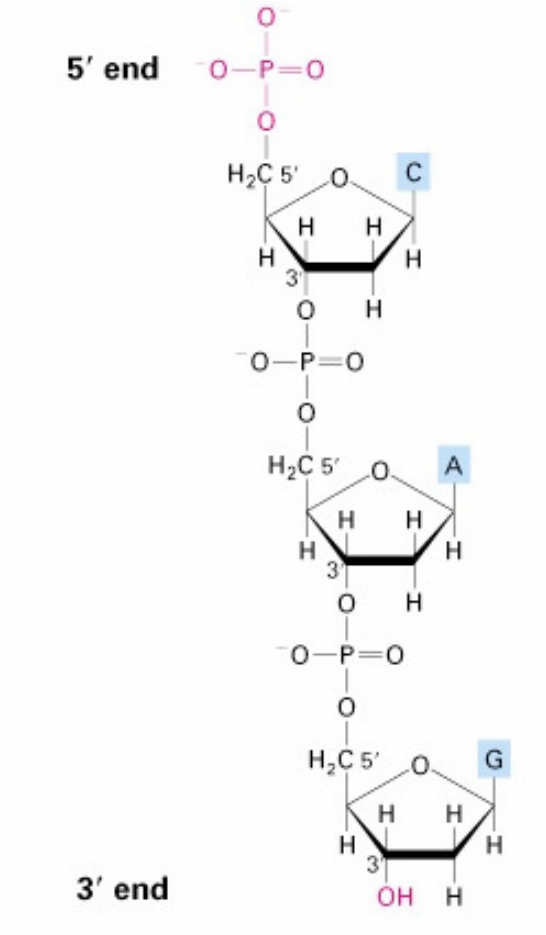

DNA di partenza
Denaturazione
Sonda a un filamento marcata
Ibridazione
DNA ibridato

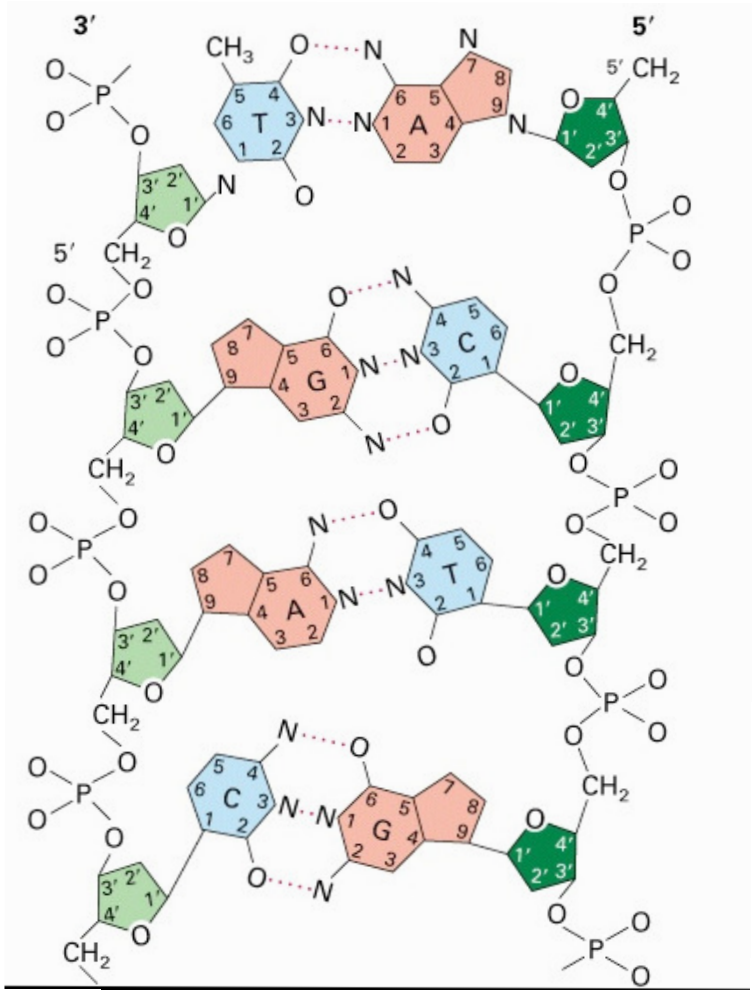
separazione reversibile (denaturazione),

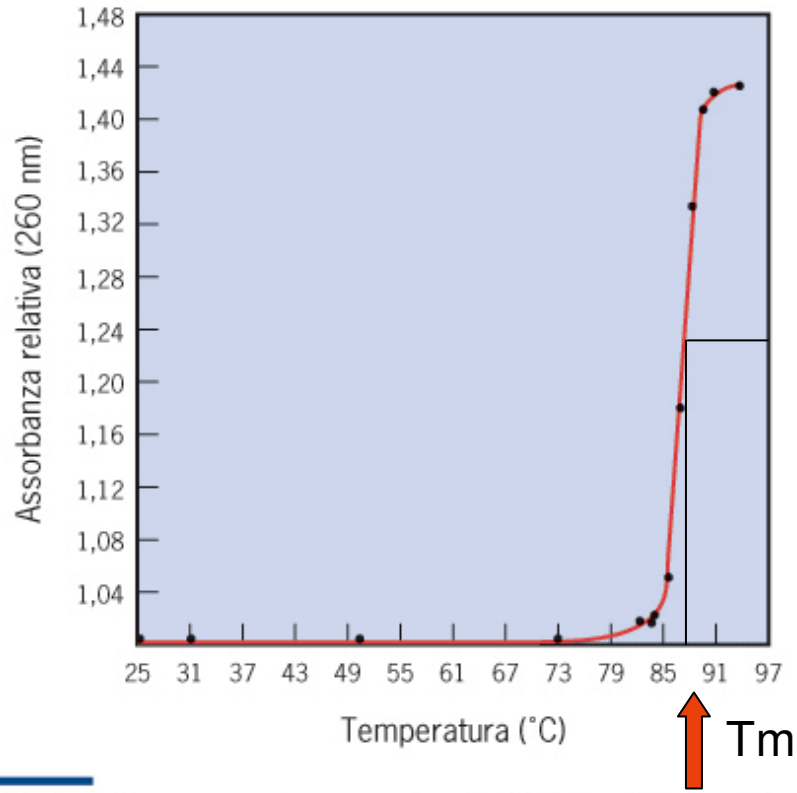
es a 95°C- i legami covalenti dello scheletro zucchero-fosfato non vengono intaccati, i legami idrogeno tra le basi complementari o idrofobici tra i piani delle basi sono interrotti

Riassociazione (rinaturazione)

specifica a temperature e concentrazioni saline opportune







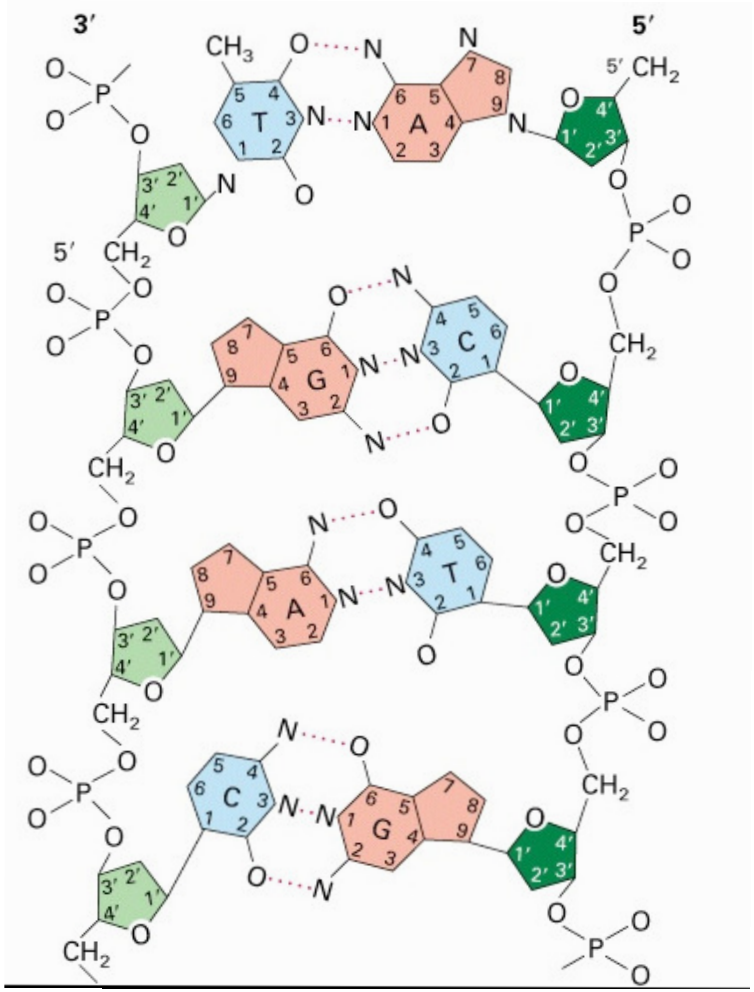
50%

Tm Temperatura melting

FIGURA 10.15 **Denaturazione termica del DNA.** Curva di denaturazione termica del DNA del batteriofago T6 in sodio citrato 0,3 M. La denaturazione del DNA (separazione dei filamenti) si verifica nell'ambito di un piccolo intervallo di temperatura, specialmente per i DNA più semplici di piccoli virus. Il punto mediano della curva ad S di assorbanza viene definito temperatura di denaturazione (melting temperature), T_m. (DA J. MARMUR E P. DOTY, J. MOL. BIOL. 3:593, 1961, COPYRIGHT 1961, PER GENT. CONC. DELL'EDITORE ACADEMIC PRESS).

Gerald Karp
Biologia cellulare e molecolare
EdiSES

La forza dei legami della coppia CG è maggiore di quella della coppia AT, essendo stabilizzate da tre e da due legami idrogeno rispettivamente.



La Tm
dipende dai legami idrogeno tra le basi complementari e dalle interazioni idrofobiche fra basi adiacenti

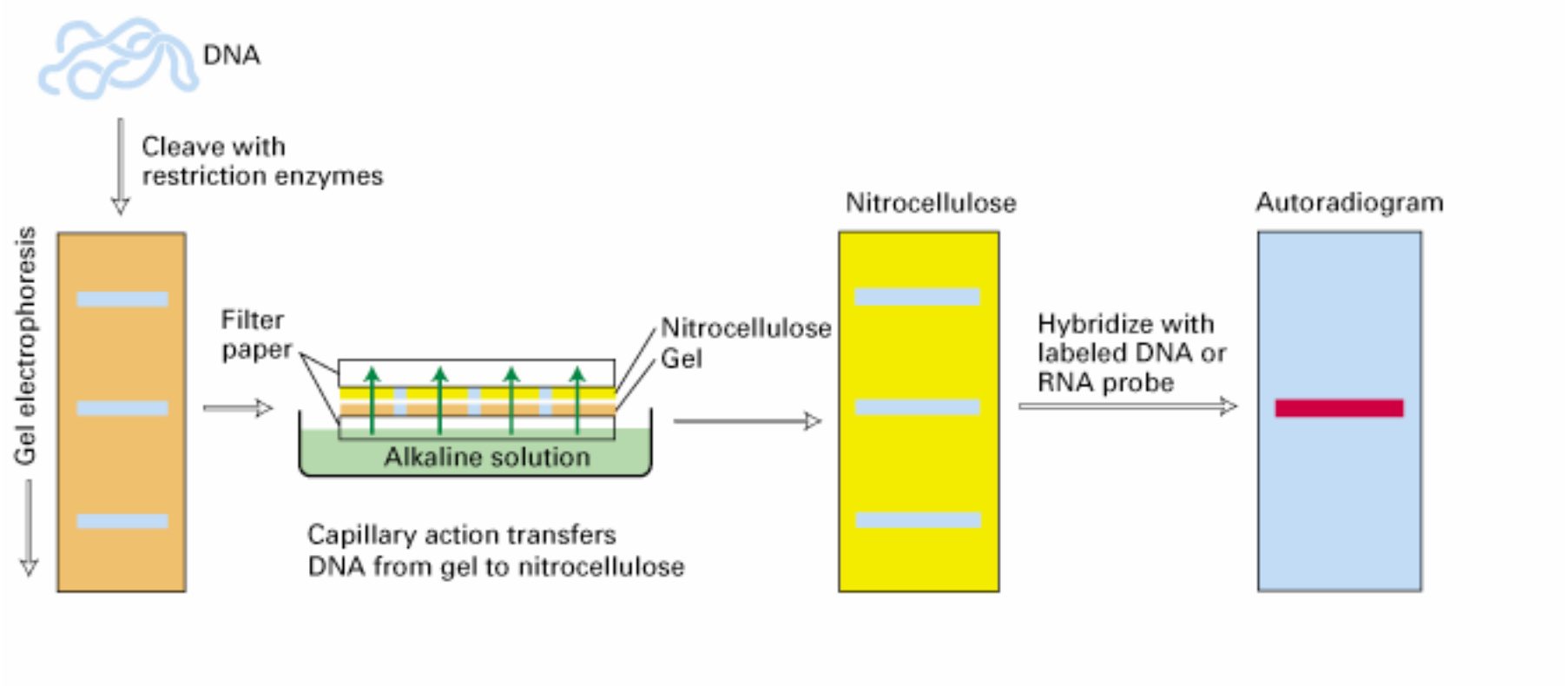
La forza dei legami idrogeno è contrastata dalla repulsione elettrostatica delle cariche negative dello scheletro zucchero-fosfato.
In presenza di Sali la repulsione elettrostatica è contrastata da una nuvola di contro-ioni. Diminuendo la concentrazione salina aumenta la repulsione elettrostatica dei gruppi fosfati e rimangono appaiate solo le interazioni più forti.

Ibridazioni molecolari

Le tecniche di ibridazioni molecolare su fase solida, (membrane di nitrocellulosa, nylon, nitrocellulosa rinforzata da nylon) permettono di identificare specifiche molecole di acidi nucleici con grande **specificità** e **sensibilità**

Il **Southern blot**, fu elaborato nel 1975 da EM Southern
per il DNA e successive tecniche analoghe studiate per RNA e proteine furono chiamate, per analogia, Northern e Western blot rispettivamente.

Tecnica	sonda/bersaglio	marcatura più diffusa
Southern blotting	DNA su DNA	DNA o oligonucleotidi radioattivi o fluorescenti
Northern blotting	DNA su RNA	DNA o oligonucleotidi radioattivi
Western blotting	proteine su proteine	anticorpi coniugati ad enzimi o chemioluminescenti


DNA
Cleave with
restriction enzymes
Gel electrophoresis
Filter
paper
Nitrocellulose
Gel
Alkaline solution
Capillary action transfers
DNA from gel to nitrocellulose
Nitrocellulose
Hybridize with
labeled DNA or
RNA probe
Autoradiogram

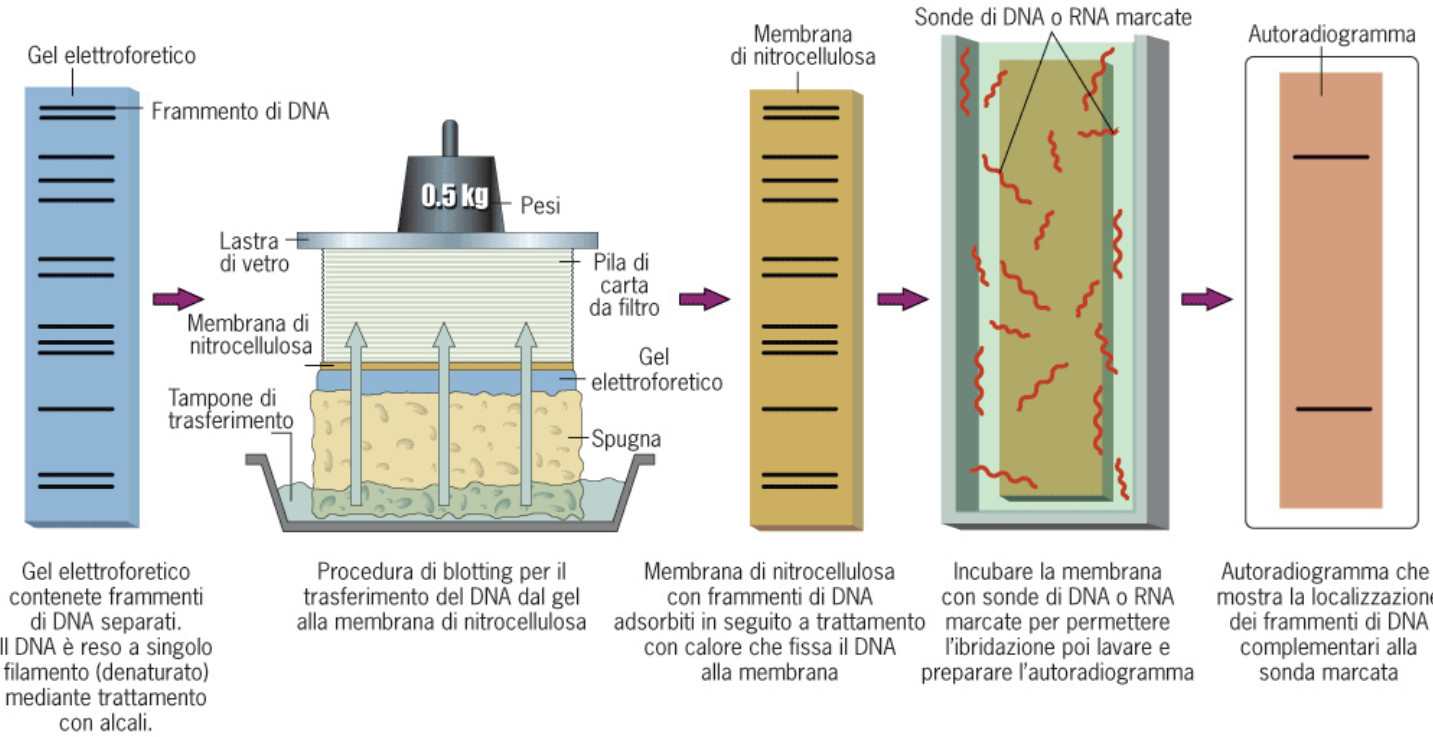
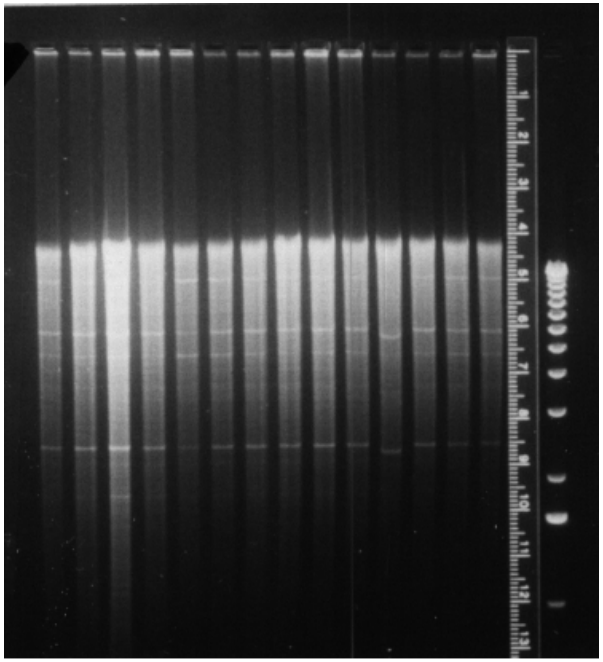
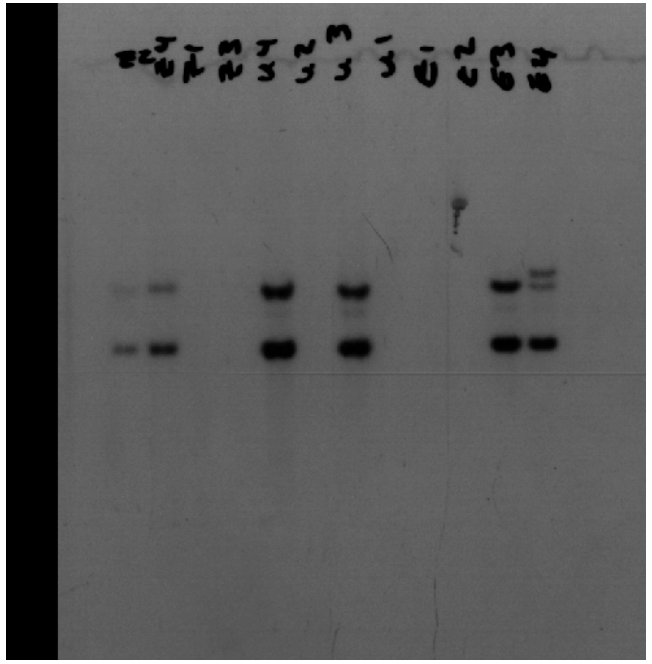


FIGURA 18.36 Determinazione della localizzazione di frammenti specifici di DNA in un gel elettroforetico per mezzo del Southern blot. Frammenti di DNA frazionati sono denaturati e trasferiti (blottati) su una membrana di nitrocellulosa, che viene incubata con sonde di DNA (o RNA) marcate radioattivamente, e la localizzazione degli ibridi molecolari è rilevata tramite autoradiografia. Durante il blotting l'azione di forze capillari spinge il tampone di trasferimento a risalire verso tovaglioli di carta da filtro. Mentre il tampone attraversa il gel, i frammenti di DNA si dissolvono e vengono trascinati verso la superficie della membrana adagiata sul gel.

Esempio di corsa su gel e rivelazione





- 0.7% agarose gel (14t plus molecular weight marker) in the far right lane DNA has been digested with the EcoRI restriction enzyme). DNA does not appear as a series of discrete bands but rather as a smear.

•The DNA was transferred to nitrocellulose and then probed with a radioactive fragment of DNA and revealed with X-ray film.

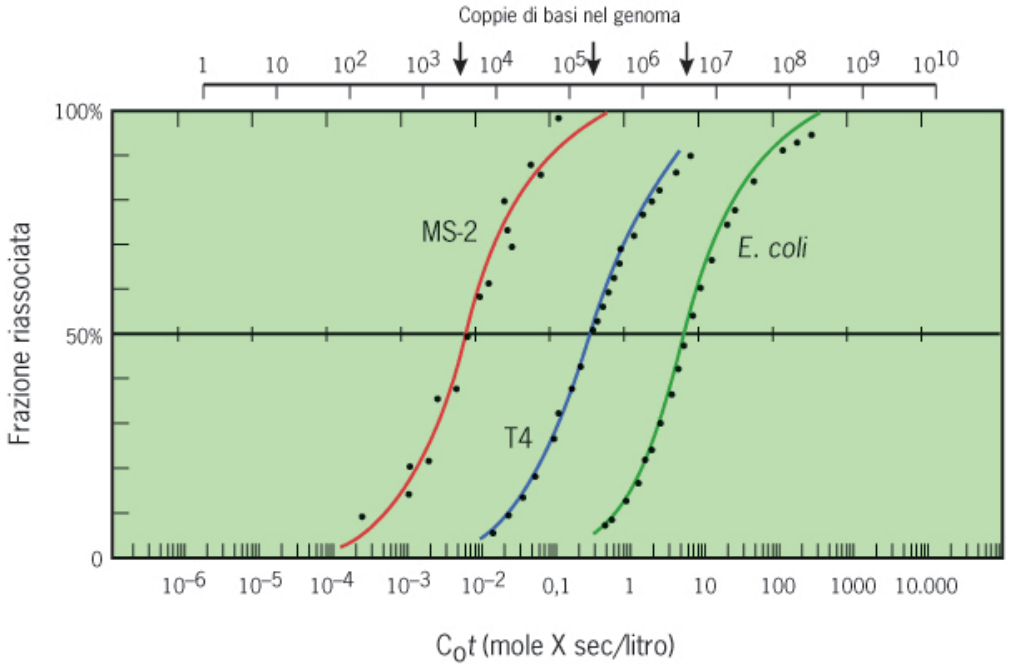
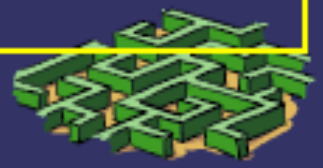


FIGURA 10.16 Cinetica di rinaturazione di DNA virali e batterici. Le curve mostrano la rinaturazione di filamenti tagliati di DNA da due virus (MS-2 e T4) e un batterio (*E. coli*). (La formazione del DNA a doppio filamento è riportata rispetto a C_0t, un termine che combina due variabili, tempo di incubazione e concentrazione del DNA. Una soluzione contenente una alta concentrazione di DNA incubata per un breve periodo avrà la stessa C_0t di una a bassa concentrazione incubata per un periodo più prolungato; entrambe avranno la stessa percentuale di DNA rinaturato). La grandezza del genoma, cioè il numero di paia di basi nucleotidiche in una copia dell'informazione genetica totale dell'organismo, è indicata dalle frecce poste sulla scala numerica superiore. La forma delle curve di rinaturazione è molto semplice e mostra una sola pendenza. Però, il tempo perché la rinaturazione abbia luogo è molto differente e dipende dalla concentrazione dei frammenti complementari, correlata a sua volta alla grandezza del genoma. Più grande è il genoma, più bassa è la concentrazione dei frammenti complementari in soluzione e maggiore è il tempo richiesto per il completamento della rinaturazione.

Evoluzione tecnologica

Southern Blot

Ricerca e selezione di sequenze "target" fra le moltissime prodotte per frammentazione da DNA

Chip (microarray su vetro)

Sintesi diretta su vetro di oligonucleotidi ad altissima densità spaziale