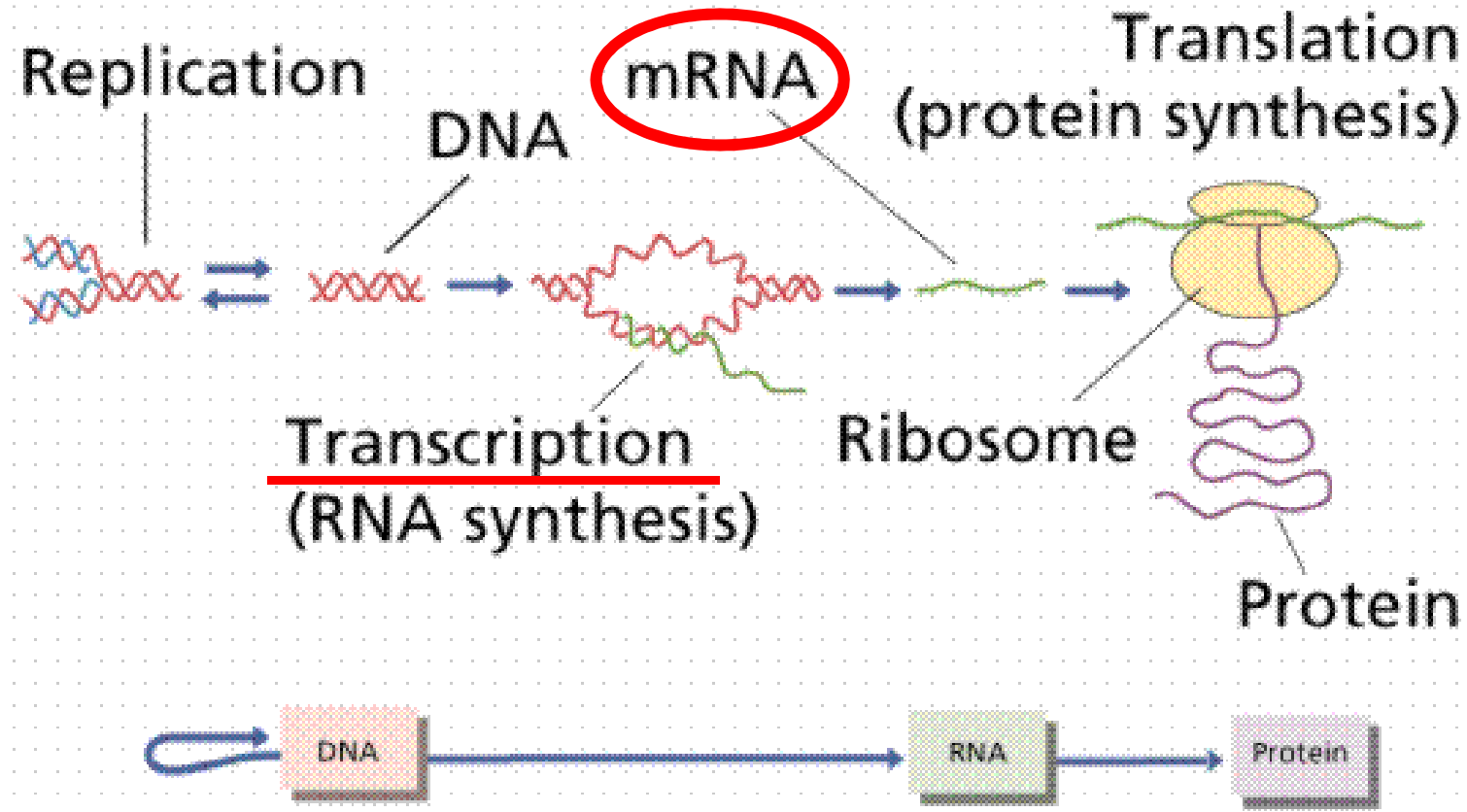


Dal Gene alla Proteina



La determinazione dei livelli di RNA fornisce importanti informazioni su trascrizione e sintesi proteica

RNA totale presente in una tipica cellula di mammifero → **~20–30 picogrammi**

- 96% → RNA non codificante (80-85% rRNA, tRNA e piccoli RNA)

- 4% → RNA codificante (**mRNA citoplasmatico** e precursori hnRNA)

Characterisation of the transcriptome

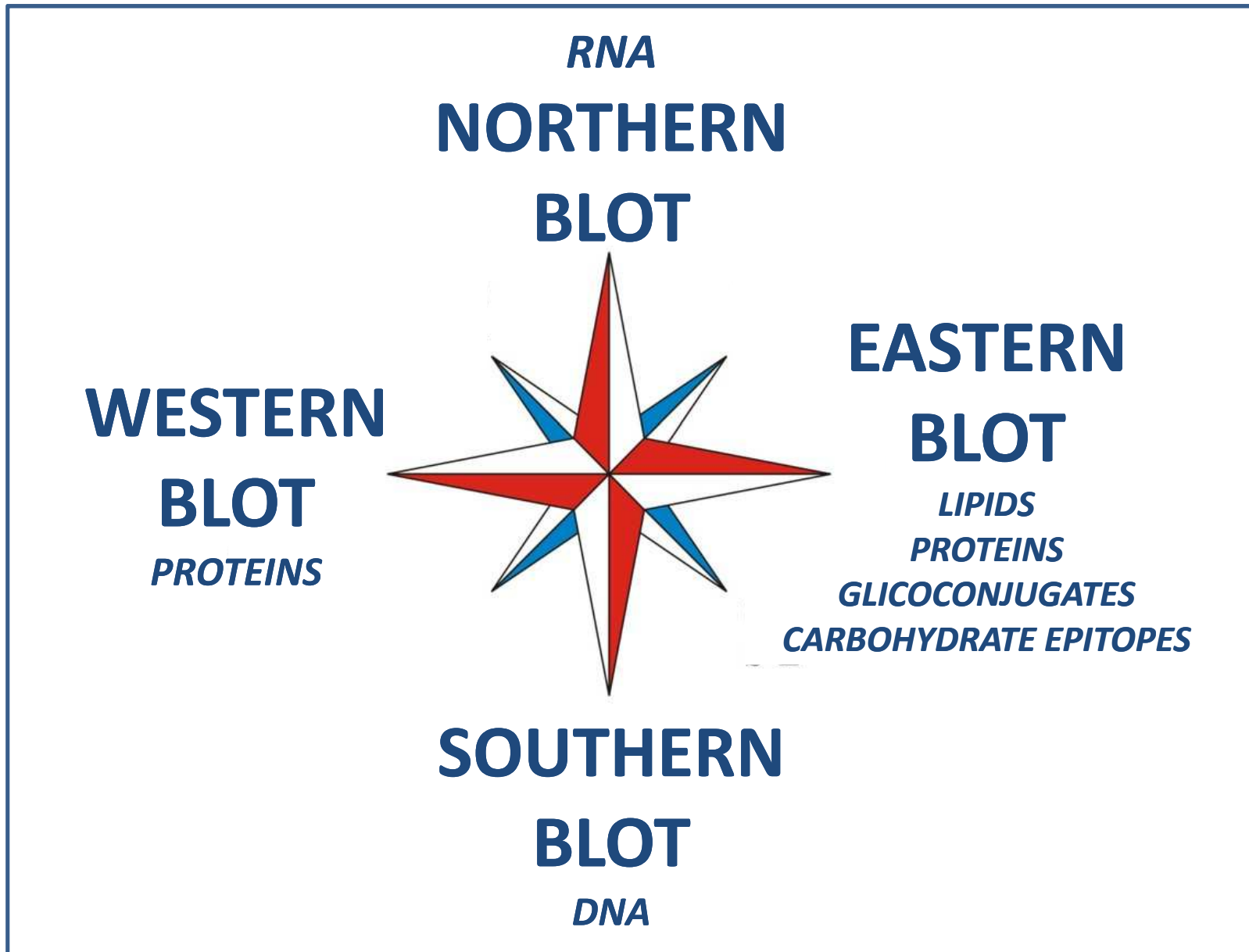
RNA sub-classes in a mammalian cell:

ribosomal RNA	rRNA	80-85%	(5S, 18S und 28S)
transfer RNA	tRNA	10-15%	
messenger RNA	mRNA	1-5%	
average length		1930 bases	
high abundant	<10 genes	10-20000 copies/cell	>1%
intermediate abundant	~500 genes	200-400 copies/cell	0,1%
low abundant	>10000 genes	<20 copies/cell	0.004%

**Non-coding
RNA
(96%)**

**Coding
RNA
(4%)**

Alla ricerca del target....



NORTHERN BLOT

1977 → Alwine et al. mettono a punto la tecnica del **Northern Blot**, procedura equivalente al Southern Blot (1975) ma che utilizza **campioni di RNA**

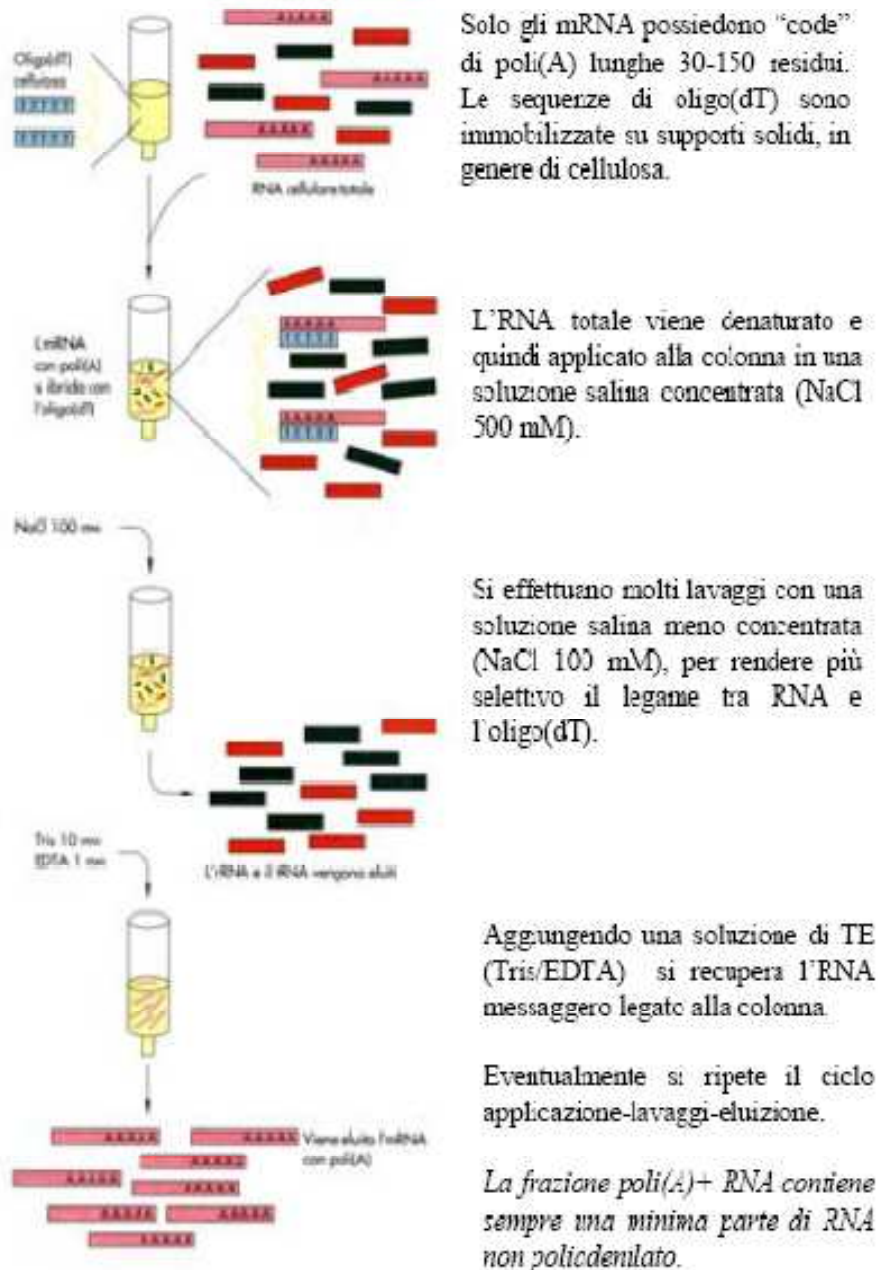
Principio: **IBRIDAZIONE** tra acidi nucleici

- Rilevazione di molecole di RNA
- Analisi quantitativa di RNA
- Studio dell'espressione di singoli geni

NORTHERN BLOT

- Estrazione e purificazione dell'RNA da cellule o tessuti
- Elettroforesi su gel di agaroso denaturante
- Trasferimento (*blotting*) su supporto solido
- Immobilizzazione del campione
- Ibridazione con la sonda
- Lavaggi
- Rilevazione

Purificazione dell'RNA messaggero

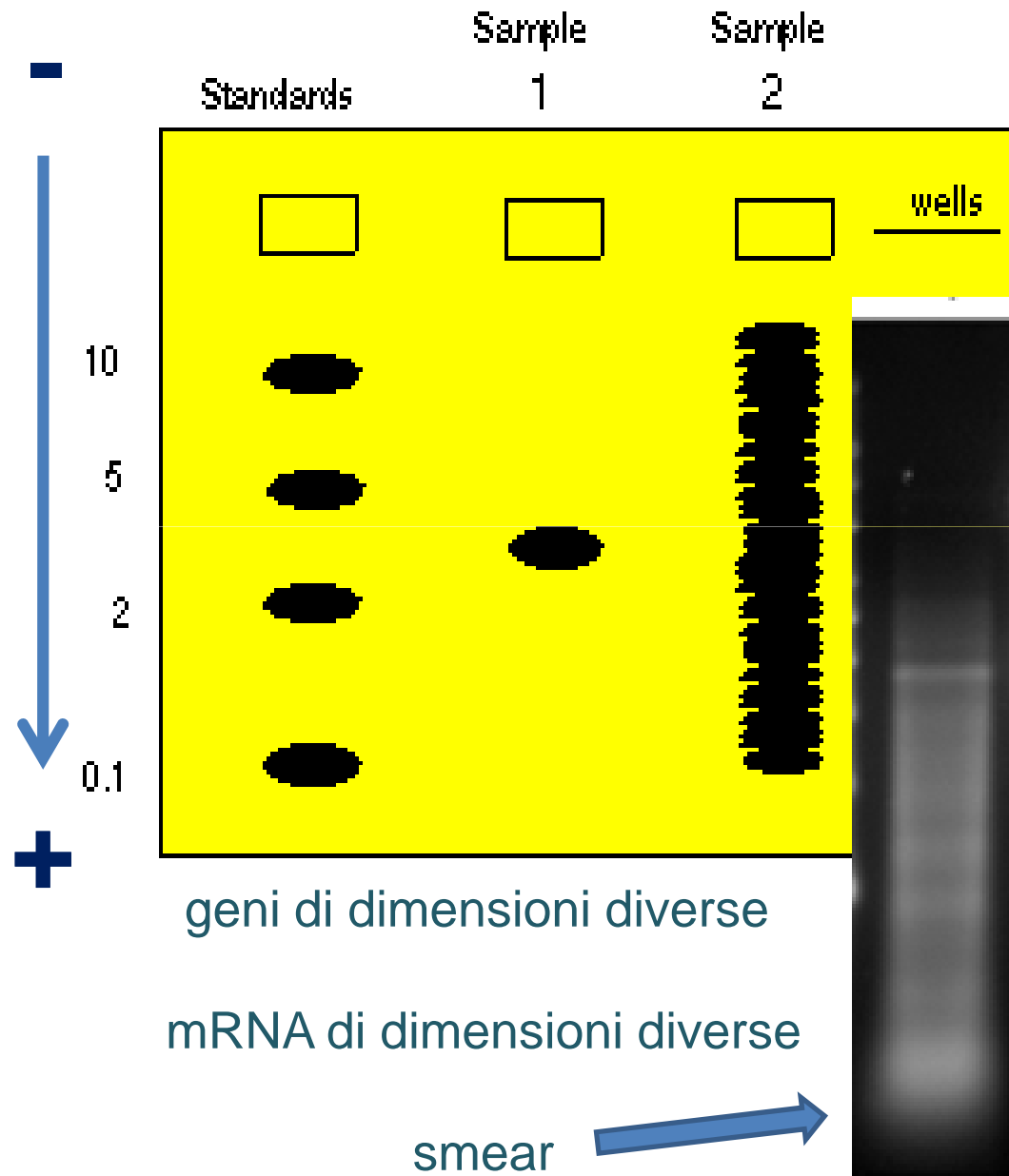


La coda di poly(A) lega le sequenze di oligo(dT) legate al supporto

Legame del solo mRNA (uscita RNA non legato)

Eluizione e recupero dell'mRNA legato alla colonna

• Elettroforesi su gel di agaroso denaturante

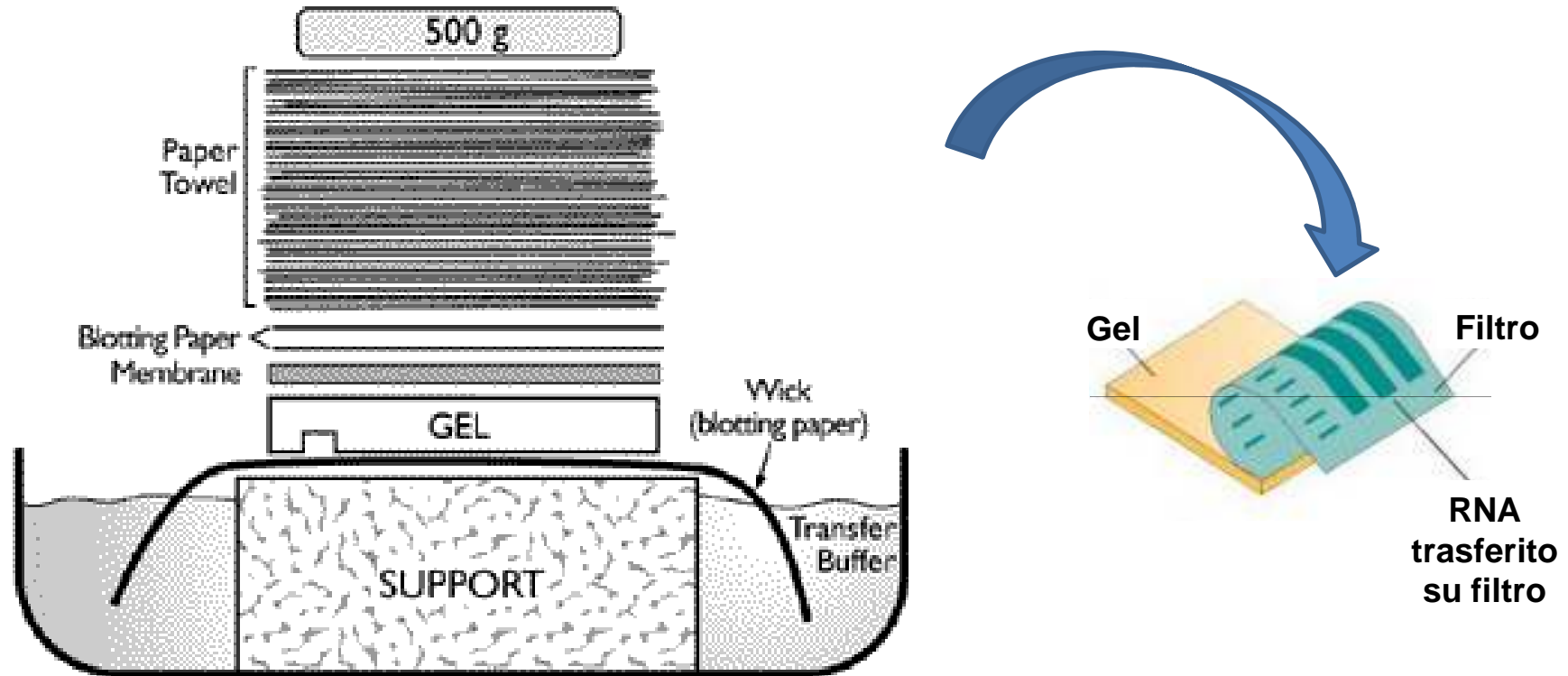


Formaldeide o
gliossale (talvolta
urea 8M)

Mantengono
l'RNA a singola
elica
(no strutture
secondarie)

- **Trasferimento su supporto solido**

Trasferimento per capillarità.....

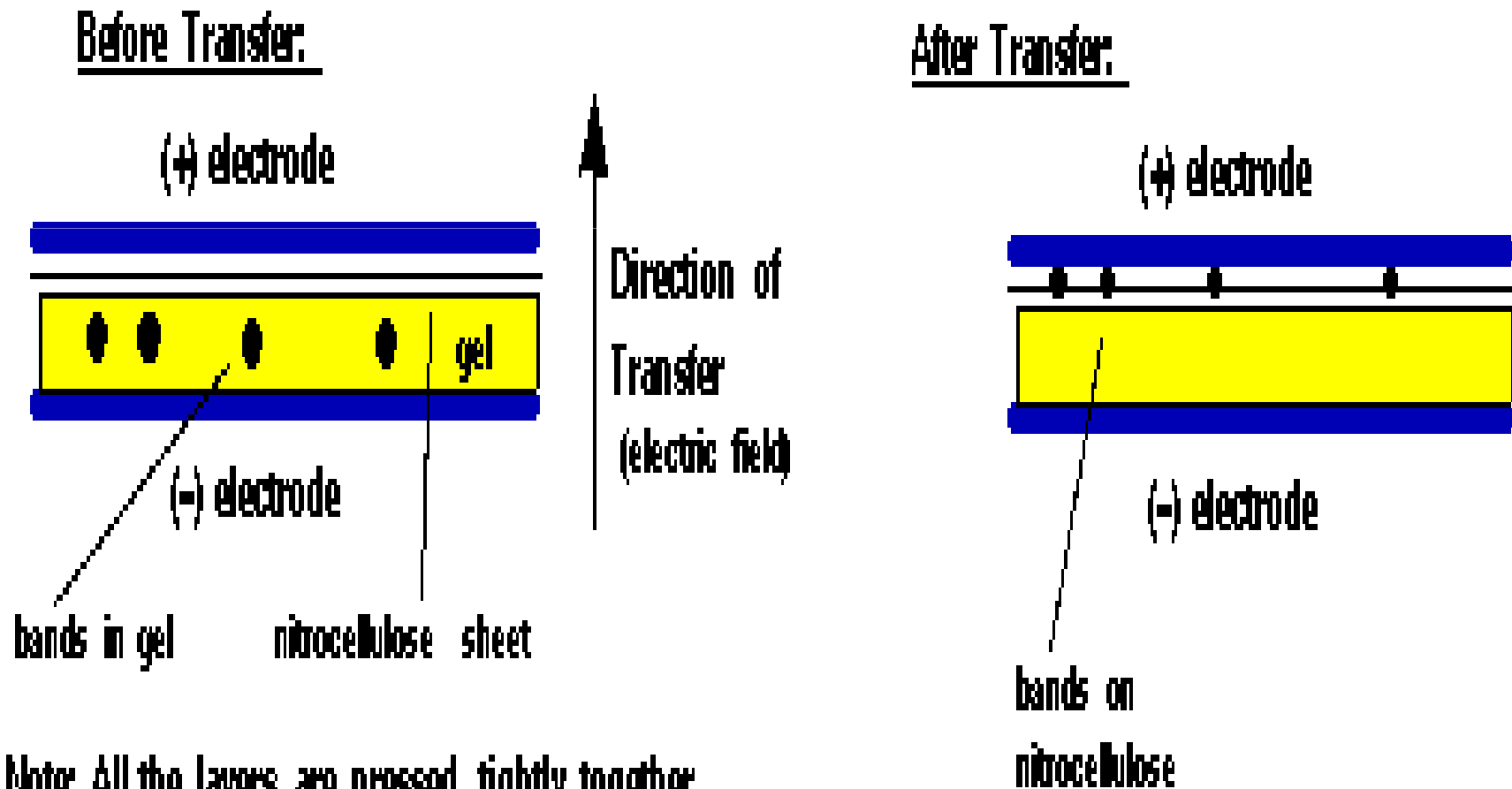


Per un trasferimento efficiente, il gel deve essere sottile e non superare una concentrazione di 1.2% agaroso

- **Trasferimento su supporto solido**

.....o per elettroblotting

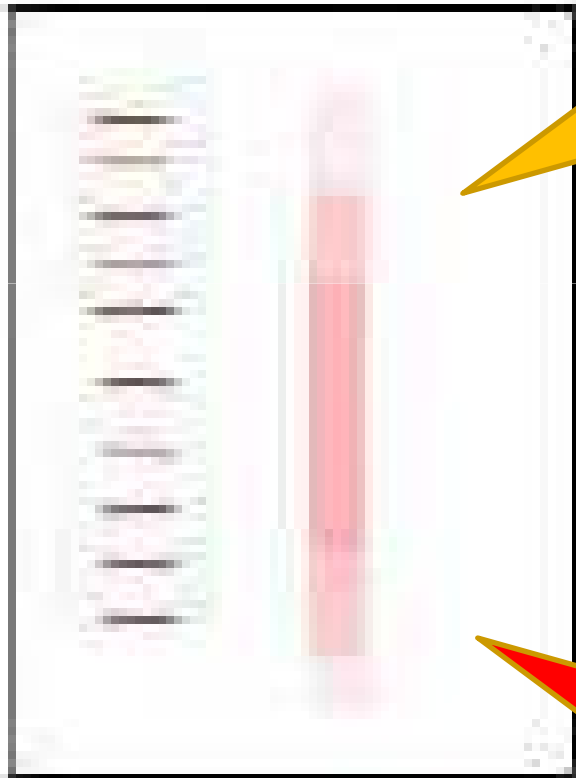
Side View:



Note: All the layers are pressed tightly together.

- **Immobilizzazione del campione**

Per fissare i campioni sul filtro e impedirne il distacco



UV Crosslinking

(1' a 254 nm o 3' a 302 nm)



**legami crociati covalenti
tra con i gruppi amminici
della membrana**



Riscaldamento

(15' a 80°C)

- **Ibridazione con la sonda**

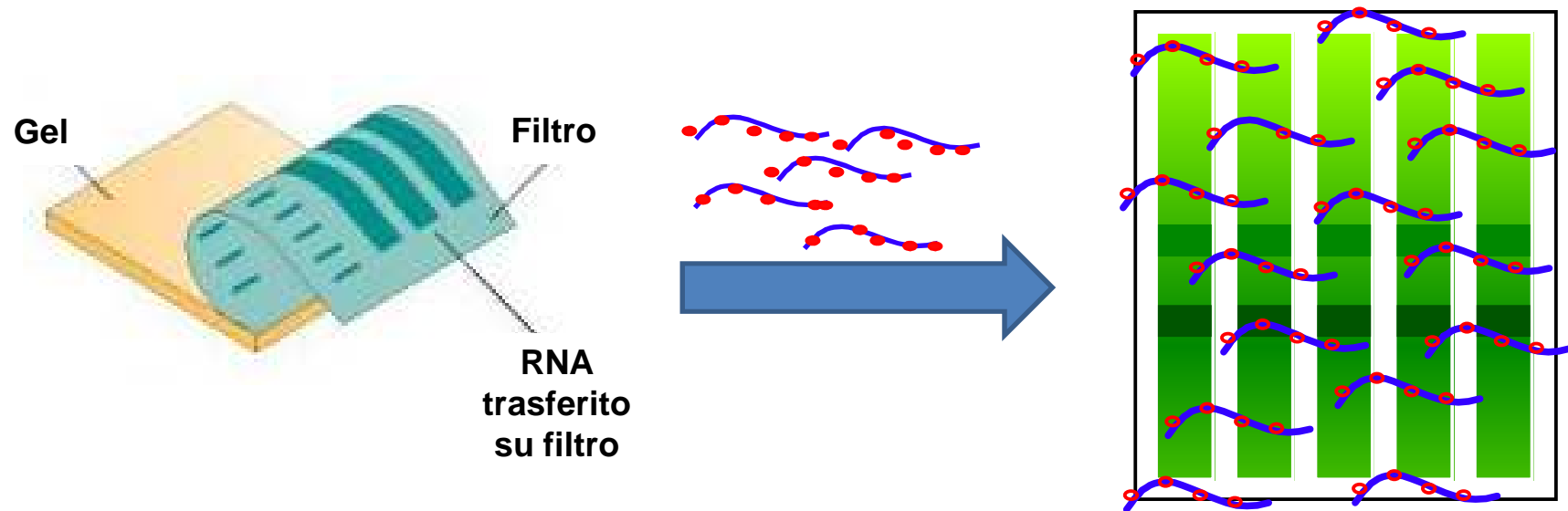
Le sonde impiegate possono essere di **DNA, RNA o oligonucleotidi**

La reazione di ibridazione avviene in presenza di formamide per abbassare la temperatura di incubazione e quindi evitare la degradazione del campione o delle sonde a RNA

CHOICE OF PROBES: RADIOACTIVE - NON RADIOACTIVE

- **Marcatura radioattiva** → nucleotidi marcati con isotopi radioattivi ^{32}P , ^{35}S , ($^{32}\text{PdATP}$, o $^{35}\text{SdATP}$)
- **Marcatura non radioattiva** → nucleotidi marcati con sostanze o molecole non radioattive (**fluorocromi, Digossigenina, biotina**)

• Ibridazione con la sonda



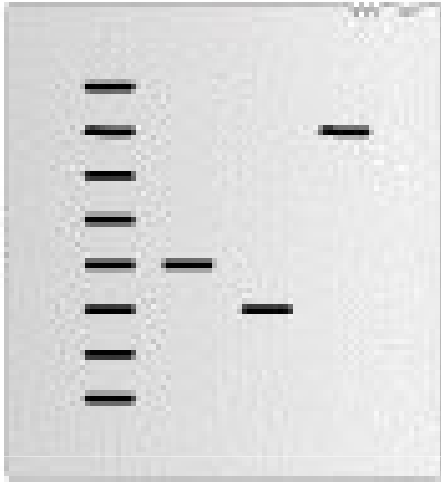
Dopo l'ibridazione vengono fatti diversi lavaggi per eliminare la soluzione di ibridazione e la sonda non legata:

- Lavaggi a bassa stringenza → rimuovono la soluzione di ibridazione e le **sonde non legate**
- Lavaggi ad alta stringenza → rimuovono le **sonde parzialmente legate**

• Rilevazione

Sonda radioattiva →

Esposizione di **lastra autoradiografica**

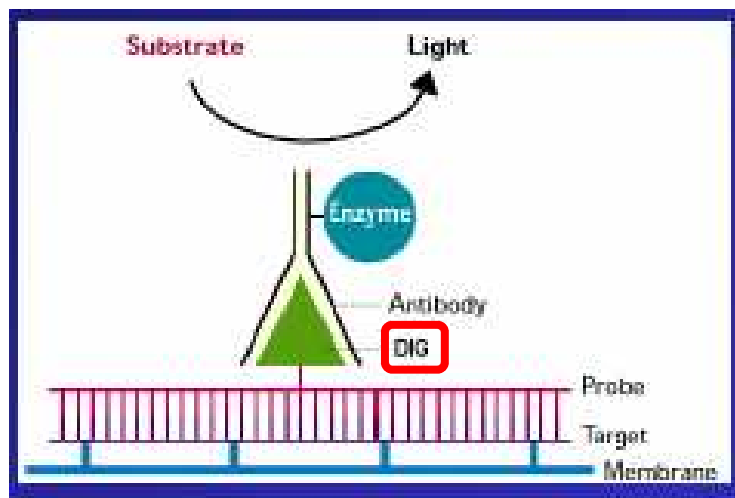


^{32}P → alta energia di emissione, elevata sensibilità ma bassa risoluzione a causa della dispersione del segnale.

^{35}S e **^3H** → bassa emissione, minore sensibilità ma maggiore risoluzione.

Sonda non radioattiva →

Chemiluminiscenza (es. Digossigenina)
Fluorescenza
Produzione di colore



VANTAGGI:

- Eliminazione dei pericoli da radioisotopi
- Sonde stabili rispetto alle sonde marcate con ^{32}P
- Sensibilità simile al radioattivo
- Tempi di rilevazione più brevi
- Riduzioni dei costi

Cosa si analizza con un Northern blot

Presenza di un particolare RNA

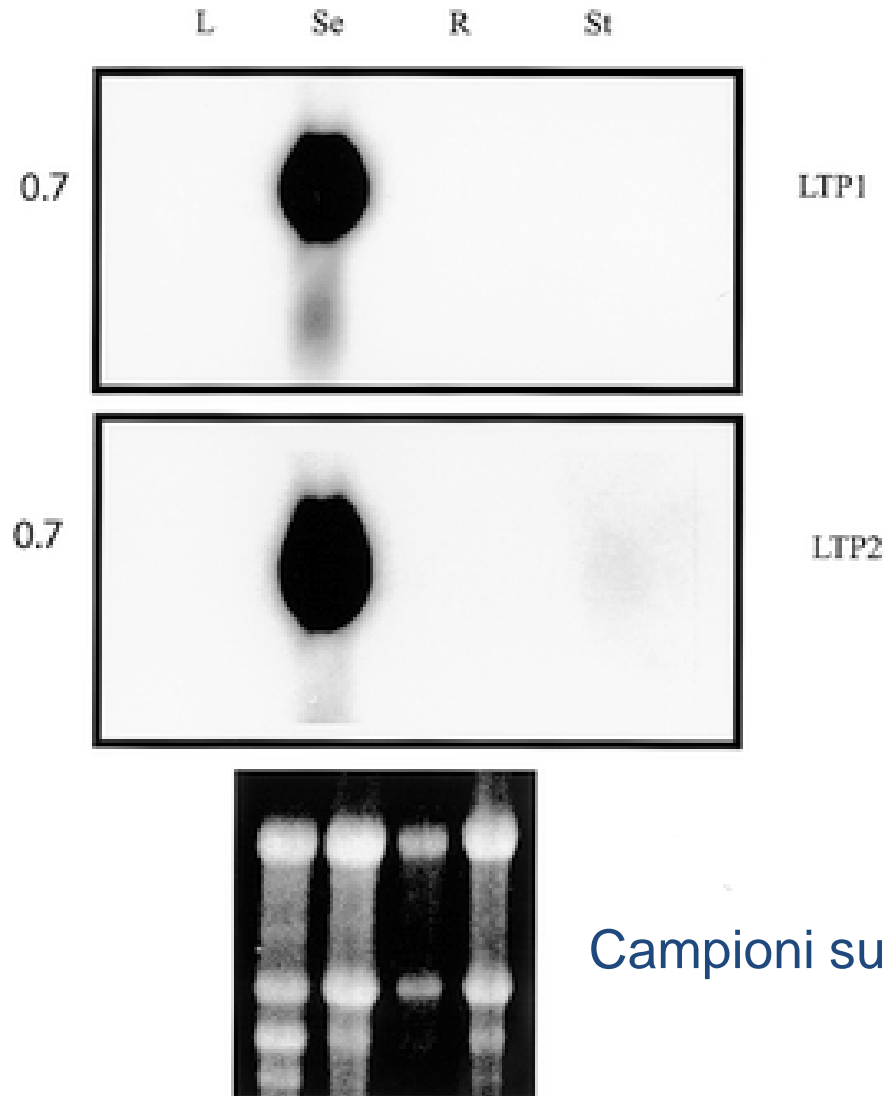


Fig. 5. Northern blot analysis of *E. lagascae* total RNA from leaves (L), germinating seeds (Se), roots (Ro) and stems (St). The blot was hybridized with probes for EILTP1 (top panel) and EILTP2 (middle panel). The bottom panel shows ethidium bromide staining of the gel before blotting. The numbers to the left indicate approximate transcript sizes in kb

A background image of a microarray showing a grid of small, multi-colored spots (green, red, yellow) on a dark background, representing gene expression data.

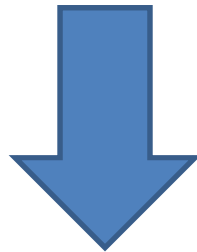
*mRNA expression
profiling using
Microarrays*

Premesse

Ogni singola cellula contiene all'interno del nucleo tutto il materiale genetico che caratterizza un organismo

Non tutti i geni sono attivi allo stesso tempo, in particolare alcuni geni saranno attivi solo in alcuni tipi cellulari e solo in fasi specifiche della vita della cellula

Il numero dei geni espressi all'interno di una cellula ad un determinato istante è enorme (transcrittoma)



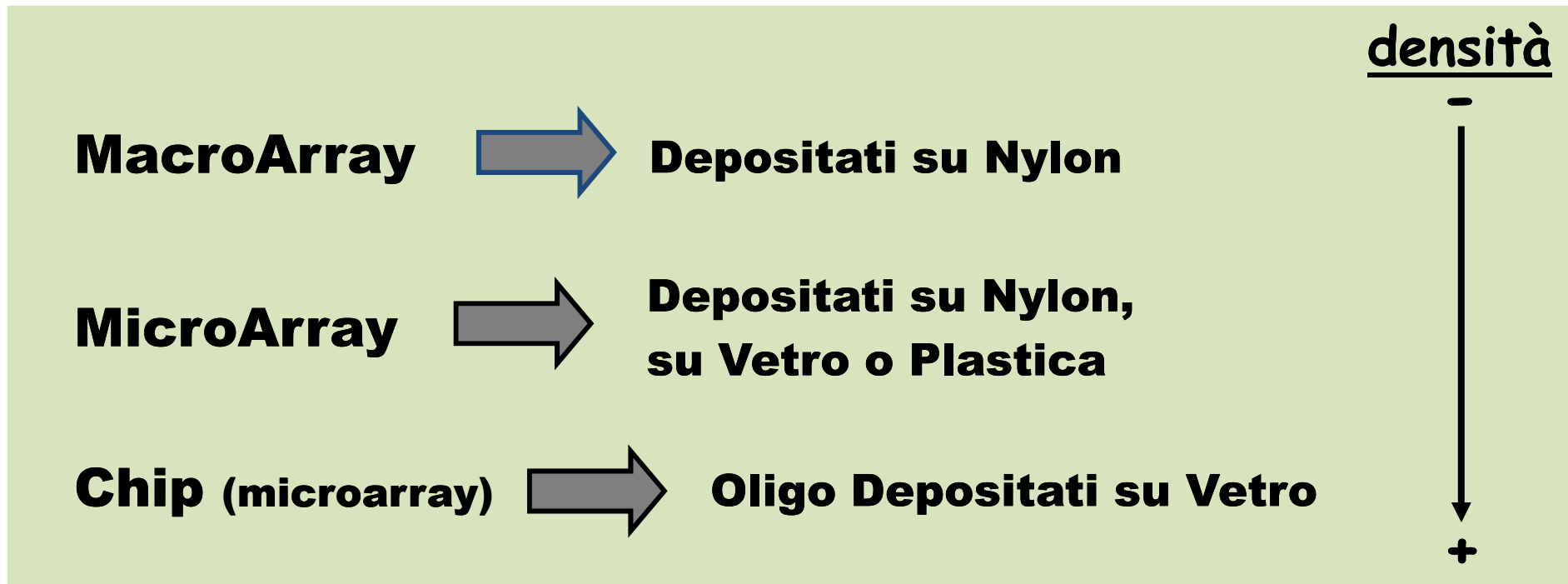
MICROARRAYS

Array = matrice ordinata, tabella

in ogni cella è presente un segmento di DNA di cui si conoscono la sequenza e l'esatta localizzazione

Array a DNA se le sonde legate al supporto sono molecole di DNA

Macro...
Micro... → si differenziano in base al **tipo di supporto** utilizzato
Chip... e alla **densità** di sonde (n° di sonde/ μm^2)



Evoluzione tecnologica

Southern Blot

Ricerca e selezione di sequenze “target” fra le moltissime prodotte per frammentazione del DNA

Macroarray

Ricerca e selezione di sequenze “target” in librerie di DNA noti “spottate” ordinatamente su filtro

Microarray

Ricerca e selezione di sequenze “target” in librerie di DNA noti adese ordinatamente su base solida non-porosa (vetro) ad alta densità

Chip
(microarray
su vetro)

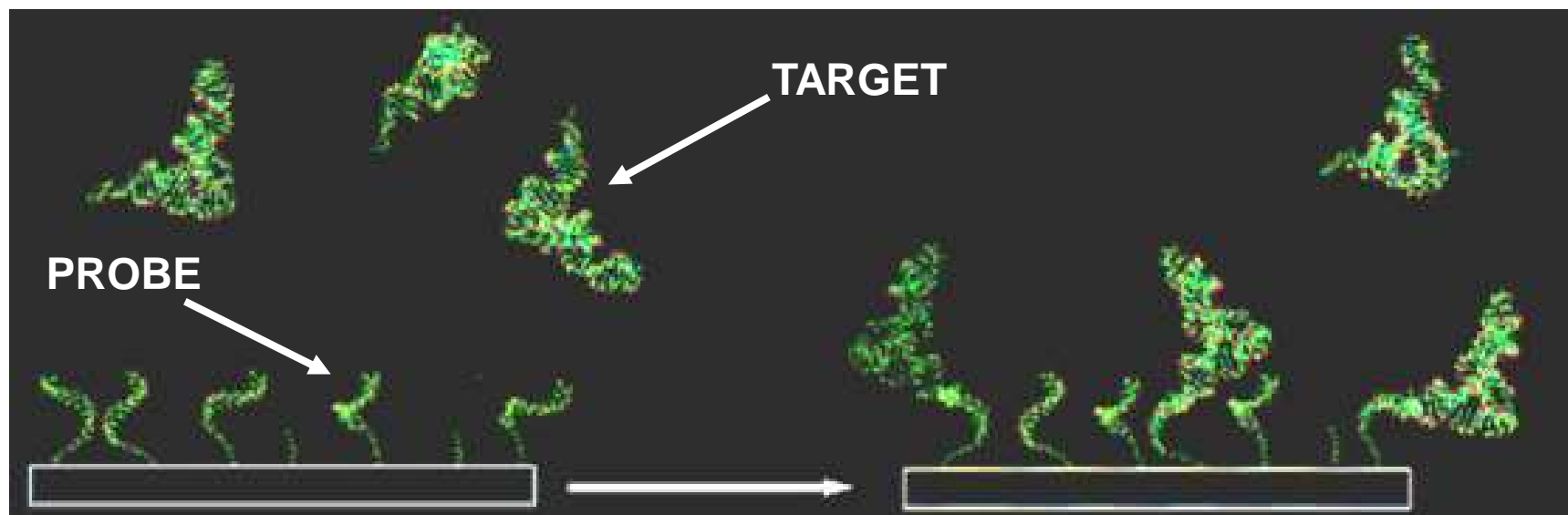
Sintesi diretta su vetro di oligonucleotidi ad altissima densità spaziale

MicroArrays

Tecnologia che sfrutta il **principio dell'ibridazione** degli acidi nucleici (Southern blot);

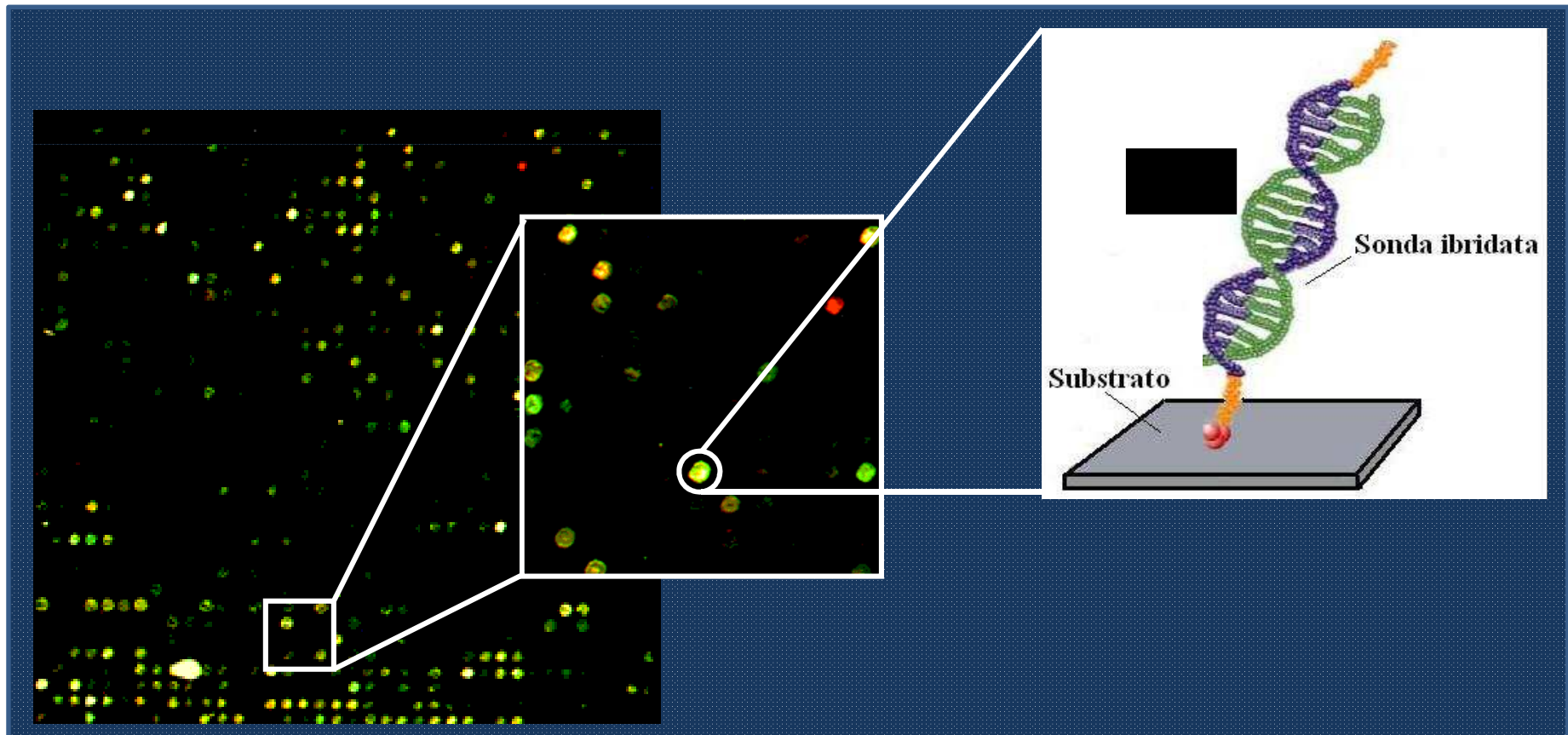
A differenza del Southern, le sonde/probes sono covalentemente legate su di una **superficie solida** (non una membrana di nylon o nitrocellulosa);

Questo consente una notevole **miniaturizzazione** del sistema.

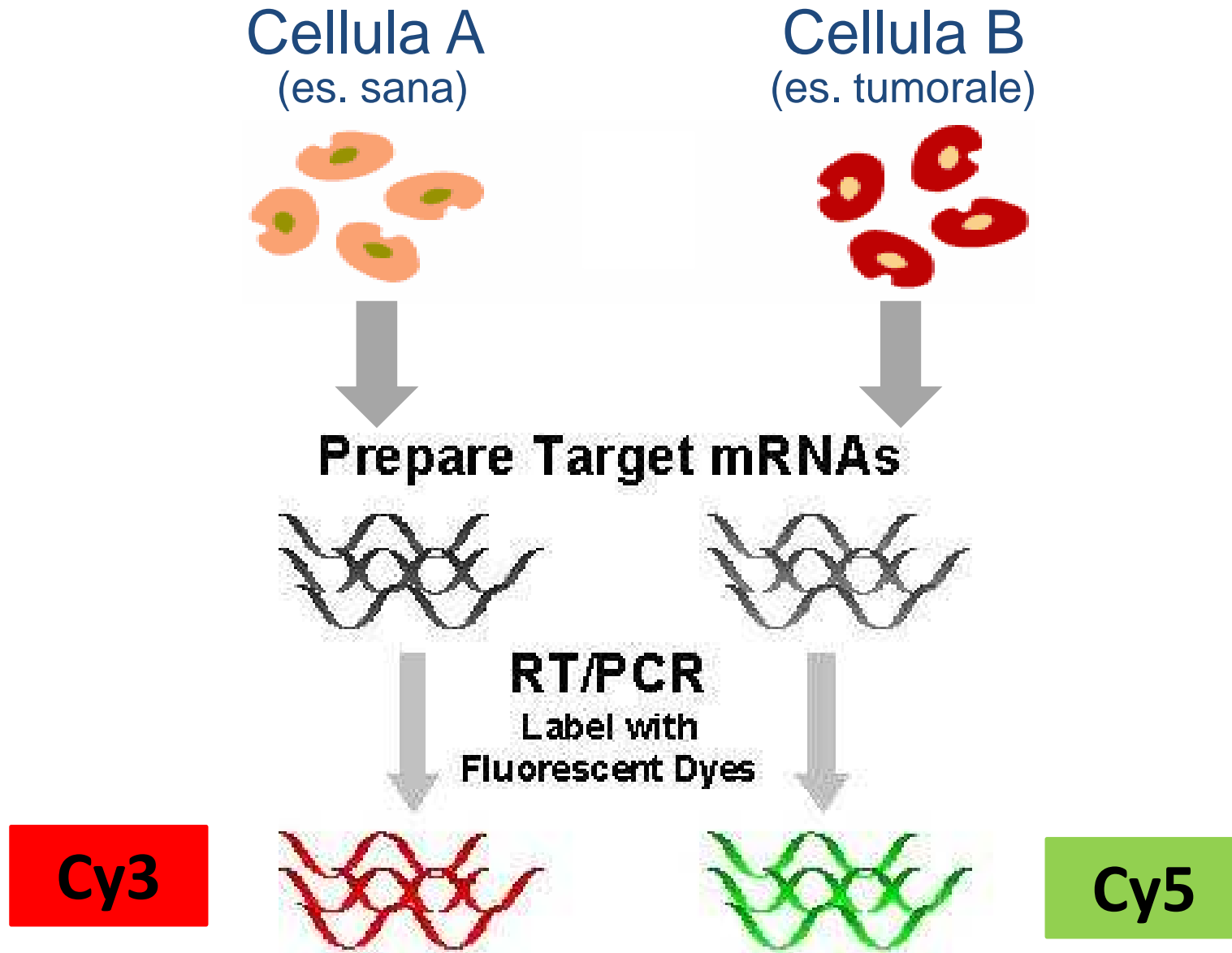


MicroArrays

Grazie alla miniaturizzazione con un singolo microarray possono essere studiati e analizzati migliaia di geni contemporaneamente (fino a 100.000)!

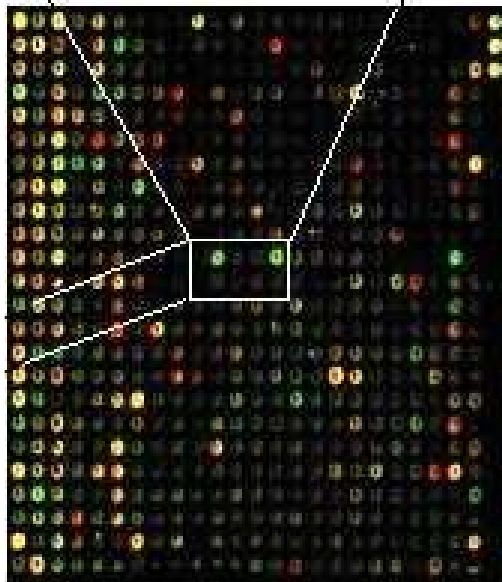
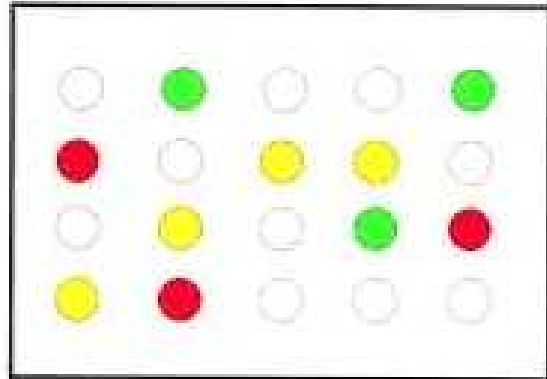


Ibridazione – Uso dei Fluorocromi



Lettura dell'Array

- Sample A > B
- Sample B > A
- Sample A = B



$A > B$

Il gene è espresso a livelli più alti nel campione A (più copie di mRNA prodotte) rispetto al campione B quindi prevale la **fluorescenza rossa**



$A < B$

Il gene è espresso a livelli più bassi (meno copie di mRNA prodotte) nel campione A rispetto al campione B quindi prevale la **fluorescenza verde**



$A = B$

Il gene è espresso a livelli simili nei campioni testati, quindi c'è sovrapposizione si ha **fluorescenza mista (gialla)**

Conclusioni:

Principio: **IBRIDAZIONE** tra acidi nucleici

NORTHERN BLOT

Acidi nucleici target non marcati fissati su un supporto solido vengono incubati con **sonde marcate**

ARRAY

Sonde non marcate fissate su un supporto solido vengono incubate con **acidi nucleici target marcati**
