

Il contributo della Biologia Molecolare in Sanità Pubblica

A cura del Laboratorio di Biologia Molecolare (Ref. Dr.ssa S. Boccia)

Istituto di Igiene (Dir. Prof. G. Ricciardi)

Facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli"

Università Cattolica del "S. Cuore", Roma

Cos'è la Biologia Molecolare:

Alla base della Biologia Molecolare vi è lo studio degli acidi nucleici, ovvero DNA ed RNA e i metodi di essa cui la si serve per studiarli. Questa disciplina ha vissuto negli ultimi 20 anni sotto un enorme impulso che, con il completamento del progetto genoma, ha aperto numerose prospettive nello studio di problematiche sia ambientali che legate all'uomo. Le acquisizioni del settore della Biologia Molecolare permettono infatti di affrontare temi di grande attualità come le biotecnologie, la bioinformatica, la sicurezza sanitaria, gli OGM, la biodegradazione, la valutazione del rischio biologico nell'ambiente e ancora la suscettibilità individuale alle malattie multifattoriali ed infettive.

Principali tecniche in Biologia Molecolare:

PCR, ELETTROFORESI SU GEL AGAROSIO, IBRIDAZIONE, PFGE, AP-PCR

PCR (REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI)

"Talvolta le buone idee vengono proprio quando non le si cerca", e fu così che Kary B. Mullis escogitò, in un contesto alquanto originale, un processo in grado di produrre un numero illimitato di copie di geni. (Le Scienze, n.262, giugno 1990). La reazione a catena della polimerasi è oggi una tecnica comunemente nota come PCR (Polimerase Chain Reaction) e le sue vastissime applicazioni hanno rappresentato una svolta nell'approccio ai problemi di biologia applicata, confermata dall'assegnazione del premio Nobel per la Chimica nel 1993. La vera intuizione di Mullis fu quella di alternare cicli di denaturazione e amplificazione a diverse temperature sfruttando un enzima termostabile.

La Reazione a Catena della Polimerasi è basata su meccanismi fondamentali esistenti in natura e sulle leggi della replicazione del DNA, e permette di amplificare "in vitro" un segmento di DNA che si trova tra due regioni di sequenza nota. La DNA polimerasi utilizza il DNA a singola elica (ssDNA) come matrice per la sintesi di una nuova catena complementare. Il ssDNA si ottiene riscaldando il DNA a delle temperature vicine al punto di apertura della doppia elica. Il punto di partenza della DNA polimerasi è rappresentato da due oligonucleotidi, detti primer, complementari a due sequenze che fiancheggiano il segmento da amplificare. I primer sono oligonucleotidi di circa 17-24 basi con caratteristiche ben precise quali, ad esempio, un contenuto in G e C almeno del 40% o simile a quello del frammento da amplificare. È necessario che il primer complementare al 3' sia perfettamente omologo, dato che la sintesi del nuovo

filamento parte da questo punto. Esistono dei software che aiutano nella costruzione dei primer (ref.), ma la validazione sperimentale e l'analisi dei prodotti di PCR e' essenziale per verificarne l'effettiva utilita'.

Con la presenza di piu' coppie di primer e' possibile amplificare contemporaneamente diversi frammenti di DNA (PCR multipla), anche se le condizioni di reazione possono essere di piu' difficile determinazione.

Parametro fondamentale e' la temperatura di "melting" o di apertura della doppia elica (T_m), cioe' la temperatura alla quale la meta' del DNA si trova sotto forma di singola elica. La temperatura di melting dipende esclusivamente dalle basi che compongono il DNA di interesse. Per un DNA con un tenore in GC elevato, il punto di melting e' piu' elevato rispetto ad un DNA ricco in AT, dato che le basi A e T si appaiano con due legami idrogeno, mentre le basi G e C si appaiano con tre legami idrogeno, e necessitano quindi di una maggior energia, in questo caso termica, per separarsi.

$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ $T_{ann} = T_m - 5$

dove T_{ann} e' la Temperatura di "annealing", cioe' la Temperatura alla quale i primer legano specificamente solo il loro tratto complementare (re-ibridazione). In genere, maggiore e' la T_{ann} , maggiore e' la specificita' dei primer.

Il tampone di amplificazione, venduto gia' pronto dalle varie ditte fornitrici, determina le condizioni di reazione (vedi sezione Reagenti per la composizione del tampone). In particolare la concentrazione di $MgCl_2$, venduto anche separatamente, influisce significativamente sulla resa e sulla specificita' dell'amplificazione. Concentrazioni ottimali sono attorno al 1.5mM. Un eccesso di Magnesio determina un accumulo di prodotti non specifici., mentre una bassa concentrazione diminuisce la resa.

I nucleotidi trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), i mattoni che andranno a formare i nuovi frammenti di DNA, vengono utilizzati alla concentrazione di circa 50-200uM ciascuno, e sono in grado di sintetizzare da 6.5 a 25ug di DNA. I desossiribonucleotidi sono in grado di legare lo ione magnesio, determinando cosi' la quantita' di $MgCl_2$ libero e quindi disponibile.

L'enzima che permette l'amplificazione e' la Taq polimerasi. La prima polimerasi termoresistente fu isolata dal batterio *Thermus Aquaticus*, organismo che vive nelle sorgenti calde, la cui DNA polimerasi ha un optimum di temperatura attorno ai 72C, ed e' stabile fino ai 95C.

Tra le DNA polimerasi piu' utilizzate troviamo Taq/Ampli Taq DNA polimerasi, AmpliTaqGold-DNA Polimerasi, Vent, DeepVent, Pfu e Ultra-DNA polimerasi.

Per una reazione di amplificazione sono necessarie da 1 a 4 unita' per 100ul di volume. Superando questa soglia si potrebbe verificare una diminuzione nella resa e una produzione di frammenti non specifici.

Una serie ripetuta di cicli che comprendono la denaturazione del template, l'appaiamento dei primer e la sintesi di un nuovo filamento da parte della DNA polimerasi, porta all'accumulo esponenziale del frammento i cui estremi sono rappresentati dai primer stessi.

Nella tappa di denaturazione il DNA a doppia elica viene denaturato al calore (94-96C) per poter ottenere le due singole catene separate.

Nella tappa di appaiamento (annealing) il DNA viene raffreddato e reibridato grazie ad un eccesso di primer. La qualita' e la specificita' della PCR dipende principalmente dall'ibridazione primer/DNA bersaglio.

La tappa di estensione prevede l'incorporazione dei dNTPs grazie alla DNA polimerasi che sintetizza una nuova catena in direzione 5'- 3', perfettamente complementare a quella originale.

L'estensione avviene attorno ai 72C. Durante il primo ciclo si formano molecole di lunghezze non definite, che dipendono dal tempo previsto per la fase, e queste si amplificano linearmente e non esponenzialmente, come invece accade per le catene delimitate da entrambi i primer, che costituiscono la specie maggioritaria alla fine dell' amplificazione.

Partendo da x copie di matrice di DNA si possono ottenere, dopo n cicli di amplificazione, $2(n)x$ molecole di DNA a doppia elica, considerato un rendimento del 100% per ogni ciclo di amplificazione.

Il "thermal cycler" e' lo strumento che consente di programmare il numero desiderato di cicli alle varie temperature. Ve ne sono di vari tipi: apparecchi che riscaldano e raffreddano con l'aiuto di liquidi, che riscaldano per resistenza elettrica e raffreddano con l'aiuto di liquidi o di semiconduttori (elemento di Peltier), oppure apparecchi le cui superfici metalliche nere si riscaldano grazie alla luce e che dispongono di un sistema di raffreddamento ad aria.

Essendo la PCR una tecnica estremamente sensibile, il problema principale e' la contaminazione.

Si distinguono tre tipi di contaminazione: carry over, presenza di DNA da preparazioni precedenti e prodotti di degradazione di reazione di decontaminazione.

Gli accorgimenti che limitano il problema della contaminazione sono:

- realizzare gli esperimenti in ambiente riservato
- conservare separatamente i materiali e i reagenti per la PCR
- indossare guanti monouso e camice da laboratorio
- evitare la contaminazione di soluzioni madre aliquotandole in grande quantita'
- utilizzare punte con filtro
- esporre i posti di lavoro a raggi UV (254nm) durante la notte, o prima di effettuare l'esperimento.

REAGENTI

Tampone di amplificazione 10X: (500mM KCl, 100mM Tris HCl pH8,3, 15mM MgCl₂, 0.1% gelatina)
sol madre dNTPs (2-10mM di ciascun nucleotide)
sol madre di primers (circa 20mM ciascuno)
Taq polimerasi (circa 5U/ul)
Acqua bidistillata sterile

ESEMPIO DI REAZIONE

35ul di acqua bidistillata
5ul di tampone di amplificazione 10X
5ul dNTPs 2mM (dATP,dTTP,dGTP,dCTP, 2mM ciascuno)
1ul di ciascun primer (0.25uM, circa 0.5ug)
1U di Taq in circa 2ml di tampone di amplificazione
1ul di DNA da amplificare (circa 100ng)

Cicli di temperature:

- a) 5min a 95°C
- b) 1min a 55°C
1min a 72°C
30sec a 94°C
da ripetere per 25-30 cicli
- c) 1min a 55°C
- d) 10min a 72°C
- e) refrigerare a 4°C

APPLICAZIONI

Le applicazioni piu' note sono l'identificazione genetica di gocce di sangue, saliva, sperma in medicina forense, l'analisi di mutazioni in oncogeni attivati-RFLP, diagnosi di malattie genetiche, identificazione di sequenze di organismi patogeni (HCV,HIVeccc) in campioni clinici e ambientali.

Le piu' frequenti applicazioni nell'ambito delle procedure di clonaggio sono l'amplificazione di DNA clonato, la produzione di sonde specifiche per geni non ancora clonati mediante amplificazione di particolari segmenti di cDNA, la produzione di librerie di cDNA a partire da piccole quantita' di RNA messaggero. Anche nel campo dell' analitica alimentare la PCR ha aperto nuovi campi di applicazione come la messa in evidenza di organismi geneticamente modificati e di contaminazione microbica, come l'analisi dell'autenticita' degli alimenti e il controllo della sicurezza degli alimenti stessi.

ELETTROFORESI SU GEL AGAROSIO

L'elettroforesi su gel di agarosio e' un metodo semplice e veloce che permette di separare, e quindi identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. I frammenti migrano, nel campo elettrico che attraversa il gel, dal polo negativo a quello positivo, in funzione delle cariche elettriche conferitegli dai gruppi fosfato. La velocita' di migrazione dipende: 1) dalle dimensioni dei frammenti 2) dalla percentuale dell'agarosio nel gel 3) dal voltaggio applicato. Frammenti lineari piu' piccoli migrano piu' velocemente rispetto a quelli piu' grandi, mentre, a parita' di peso molecolare, il DNA circolare migra piu' velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta super avvolta (super coiled DNA).

Attrezzatura richiesta: Apparato per elettroforesi orizzontale, Power supply, Forno a microonde, Transilluminatore a raggi UV

Reagenti: Agarosio, TBE 1X, Ficoll loading buffer 6X

IBRIDAZIONE- SOUTHERN BLOT

Dopo essere stati separati per dimensione su gel di agarosio, i frammenti di DNA vengono denaturati e trasferiti dal gel di agarosio ad una membrana di nitrocellulosa (Hybond ecc) o di nylon, secondo il metodo descritto da E. Southern(ref.). Il metodo prese il nome di Southern Blot ed in seguito, per un gioco di parole, vennero ideati il Northern Blot, per il trasferimento del RNA, e il Western Blot per indicare il trasferimento di proteine da gel a supporto solido. La denaturazione del DNA serve per ottenere frammenti a singola elica (ssDNA), condizione necessaria per permettere la successiva ibridazione con una sonda di acidi nucleici marcata, mentre il trasferimento su un supporto solido piu' maneggevole e piu' facilmente conservabile favorisce le operazioni, considerato che la sonda potrebbe essere marcata con fosforo radioattivo (32P). Tramite un sistema di rivelazione del segnale appropriato, i frammenti complementari legati alla sonda marcata vengono visualizzati su una lastra autoradiografica, e sara' quindi possibile effettuare un'analisi di tipo qualitativo o semiquantitativo. Questa tecnica viene utilizzata per identificare eventuali mutazioni, per verificare la presenza di una certa sequenza di DNA, per analizzare i polimorfismi in lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP), considerato che i siti di restrizione possono variare da un individuo all'altro.

TRASFERIMENTO DEL DNA

Materiale: SSC 20X, Soluzione denaturante (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M), Soluzione di trasferimento(SSC10X, NaOH 0.1M)

- Immergere il gel nella soluzione denaturante e lasciarlo in agitazione per 30min
- Aspirare la soluzione denaturante e lavare brevemente il gel in acqua
- Immergere il gel nella soluzione di trasferimento per almeno 10min.
- Tagliare una membrana (nylon, nitrocellulosa,ecc) e tre fogli di carta 3MM delle stesse dimensioni del gel. Bagnare la membrana con la soluzione di trasferimento.
- Riempire una vaschetta con liquido di trasferimento; sopra la vaschetta posizionare, come indicato in figura, una piattaforma leggermente piu' grande del gel e costruire un ponte con una striscia di carta 3MM le cui estremita' peschino nel liquido di trasferimento.
- Porre sopra questa struttura, nell'ordine indicato, il gel, la membrana e i 3 fogli di carta 3MM precedentemente imbevuti nella soluzione di trasferimento. Eliminare eventuali bolle d'aria muovendo una pipetta pasteur come fosse un mattarello
- Appoggiare uno spessore di almeno 10-15cm di tovagliolini di carta sopra i fogli di carta 3MM.
- Porre una lastra di vetro e un peso sopra i tovagliolini in modo tale che la struttura non risulti sbilanciata, e permettere un passaggio omogeneo del liquido. Sono da evitare i contatti tra il ponte di carta 3MM e i tovagliolini, meglio se si circonda il gel con strisce di parafilm o celophan.
- Lasciare trasferire per tutta la notte, facendo attenzione che il liquido di trasferimento non bagni tutti i tovagliolini, in tal caso metterne un nuovo spessore.
- A trasferimento avvenuto, fare un segno indelebile sulla membrana in modo tale da poterla identificare ed orientare.
- Lavare brevemente la membrana in SSC 2X e lasciarla asciugare all'aria.
- Se la membrana e' di nitrocellulosa occorre una cottura in stufa per 2 ore a 80C.
- La membrana si puo' utilizzare per l'ibridazione o conservare indefinitamente a temperatura ambiente, tenendo presente che la nitrocellulosa e' piu' fragile del nylon.

SONDE DI DNA

Le sonde utilizzate in Southern e Northern Blot venivano prodotte tramite inserimento in vettori plasmidici. I plasmidi sono elementi extracromosomiali autoreplicanti formati da una molecola di DNA circolare a doppia elica. Sfruttando la presenza di siti di restrizione, si può inserire un frammento esterno di DNA, in questo caso la nostra sonda, all'interno del plasmide. L'aggiunta di DNA plasmidico a una coltura di batteri privi di plasmidi in presenza di Ca^{2+} comporta che il DNA plasmidico venga captato dalle cellule batteriche che si replicheranno velocemente producendo molte copie del plasmide introdotto. Quest'ultimo si replicherà all'interno di batteri sfruttando i meccanismi di replicazione dell'ospite. Per selezionare i plasmidi che hanno effettivamente incorporato la sonda, viene inserito, assieme al frammento di interesse, anche un gene che conferisce antibiotico resistenza, ovviamente la crescita dei batteri avverrà in un terreno selettivo. I plasmidi utilizzati oggi sono sintetizzati in laboratorio, e possiedono quindi tutte le caratteristiche necessarie, in termini di siti di restrizione, geni per l'antibiotico resistenza ecc. Con l'avvento della PCR le sonde vengono sintetizzate direttamente da un filamento stampo con l'utilizzo di primer specifici.

MARCATURA DELLA SONDA

Vi sono varie metodiche per la marcatura della sonda, che vanno dall'utilizzo del radioattivo a quello di materiale fluorescente. Fino ad alcuni anni fa la tecnica radioattiva più utilizzata e' stata quella dei "random primer". Il tratto di DNA di interesse serviva da stampo per la sintesi di un filamento complementare marcato. Veniva utilizzata una miscela di esanucleotidi a sequenza casuale, tra i quali almeno uno risultava complementare ad un tratto del DNA stampo. La DNA polimerasi iniziava dai primer complementari la sintesi del nuovo filamento, aggiungendo i quattro nucleotidi, uno dei quali era marcato con ^{32}P in posizione alfa. La reazione di marcatura sfruttava il frammento di Klenow della DNA Polimerasi I, frammento che manca di attività esonucleasica 5'-3', garantendo così che i nucleotidi marcati incorporati non venissero rimossi come monofosfati.

A marcatura avvenuta era preferibile rimuovere i nucleotidi non incorporati per diminuire il segnale aspecifico durante l'ibridazione. La separazione avveniva tramite gel filtrazione. Le resine più utilizzate sono la Sephadex G 50 r la Biogel P 60. Molti kit commerciali attualmente disponibili permettono la marcatura della sonda in modo più efficiente e veloce di quanto si possa fare utilizzando i singoli componenti.

Sempre più utilizzati sono invece i metodi di marcatura alternativi al radioattivo. Descriviamo qui i principi della marcatura con Digossigenina (DIG). Ne esistono essenzialmente tre: "3' end labeling", "3' tailing" e "5' end labeling". Inserire figura 5'-----3'dig, 5'-----3'dig dig, dig 5'----3' da manuale Boehringer

Durante la marcatura "3' end labeling" l'enzima Terminal Transferasi aggiunge un dideossinucleotide coniugato con Digossigenina (DIG-ddUTP) all'estremità 3' della sonda. I dideossinucleotidi sono analoghi sintetici dei deossinucleotidi trifosfati che vengono incorporati nella catena nascente di DNA ma ne impediscono l'ulteriore allungamento. (ref)

La marcatura "3' tailing", prevede l'aggiunta all'estremità 3', sempre tramite Terminal Transferasi, di una coda contenente residui ripetuti di Digossigenina-11-dUTP. Questo metodo, utilizzato nei nostri laboratori, e' circa dieci volte più sensibile del precedente in virtù del numero maggiore di residui DIG che verranno in seguito rivelati, ma occorrono alcuni accorgimenti tecnici per evitare segnali non specifici.

Gli oligonucleotidi possono essere marcati anche al 5'. Il "5' end labeling" comprende due passaggi: la sonda viene sintetizzata con un residuo aminico al 5', e un estere Digossigenina-NHS vi viene poi legato covalentemente. La specificità della sonda e' simile a quella ottenuta con il primo metodo.

La rivelazione del segnale avviene grazie ad un anticorpo anti-digossigenina, coniugato con un enzima che, in presenza di un substrato adeguato, emette dei fotoni (chemiluminescenza) che sono in grado di impressionare una lastra autoradiografica. I principali enzimi utilizzati sono la fosfatasi alcalina e la "Horse radish Peroxidase". La rapidità con cui la luce emessa impressiona la lastra e' decisamente maggiore rispetto a quella del ^{32}P , e la sensibilità e' pressoché uguale.

Rispetto all'utilizzo del radioattivo i vantaggi della marcatura con Digossigenina sono una più facile manipolazione, non occorrono particolari sistemi di protezione come schermi e maschere in plexyglass, , i tempi di rivelazione del segnale sono minori e la sensibilità del metodo equivale a quella del radioattivo. Non riportiamo alcun protocollo esemplificativo, rimandando alle istruzioni riportate dai singoli kit.

IBRIDAZIONE DELLA MEMBRANA CON LA SONDA

Per ibridazione si intende quel fenomeno di appaiamento di due filamenti di DNA, o di un filamento di DNA e uno di RNA, complementari. La sonda marcata e la membrana, contenente i frammenti di DNA immobilizzati e denaturati, vengono incubate in condizioni ben calibrate, in modo tale da favorire soltanto l'ibridazione dei tratti perfettamente complementari. Questa condizione viene definita di "alta stringenza". La stringenza dipende principalmente dalla forza ionica, minore e' la concentrazione ionica, maggiore e' la stringenza.

Il primo passaggio e' la preibridazione della membrana, si utilizza del DNA di sperma di salmone per saturare tutti i siti che potrebbero legare la sonda in modo aspecifico. Si procede con l'ibridazione, che avviene in condizioni tali da favorire i legami deboli tra le basi complementari (bassa stringenza). Si eseguono poi dei lavaggi in condizioni di stringenza crescenti in modo tale da sfavorire i legami aspecifici mantenendo quelli tra basi perfettamente complementari. Un rapporto ottimale tra segnale specifico e fondo non specifico e' favorito quindi da un'alta stringenza e dalla presenza di SDS o ssDNA, che evitano il legame aspecifico tra DNA e membrana.

L' ibridazione puo' essere svolta in vari contenitori: buste di plastica quando si utilizzano pochi filtri, scatole in plastica per ibridare molti filtri in maggiori volumi di soluzione di ibridazione, tubi in vetro che necessitano di un'apparato rotatorio per poter distribuire uniformemente il volume della soluzione di ibridazione, generalmente piccolo, sulla membrana.

Al termine del procedimento la rivelazione del segnale avviene tramite cassetta autoradiografica.

Riportiamo un protocollo generale che prevede l'utilizzo del radioattivo.

Reagenti: SSC 20X, SDS 10%, Soluzione Denhart 100X, DNA di sperma di salmone (ssDNA) 10mg/ml, Soluzione di pre-ibridazione e ibridazione (SSC5x, Soluzione di Denhart 5x, SDS 0.5%, SDS 0.5%, ssDNA 20ug/ml)

Protocollo:

-Chiudere il filtro in una busta di plastica sigillabile a caldo, assieme alla soluzione di preibridazione (circa 5ml per 100cm² di filtro) e al ssDNA denaturato (scaldato a 100 C per 5min).

Eliminare le eventuali bolle d'aria.

-Preibridare il filtro a 65 C per circa 1-2 ore lasciandolo in agitazione

- La sonda di DNA marcata viene denaturata per 5min a 100 C.

- Aprendo un lato della busta si aggiunge la sonda alla soluzione di pre-ibridazione. Vengono utilizzati almeno 10(6) cpm/ml

- Richiudere la busta facendo attenzione alle bolle d'aria.

- Far proseguire la ibridazione a 65 C per circa 12 ore (il tempo di ibridazione va calibrato per i singoli casi) in agitazione.

- Eliminare la soluzione nei rifiuti radioattivi liquidi ed estrarre il filtro dalla busta.

- Si eseguono i seguenti lavaggi in un vassoio posto su piano basculante:

1) SSC 2x, SDS 0.1% per 10min a temperatura ambiente

2)SSC 1x, SDS 0.1% per 15min a 65 C

3)SSC 0.1x, SDS 0.1% per 10min a 65 C

- Far asciugare il filtro all'aria per qualche minuto ed avvolgerlo in una pellicola di carta trasparente

-Esporre il filtro ad una lastra autoradiografica in una cassetta con schermo intensificante. Occorrono alcune prove per determinare il tempo di esposizione al fine di ottenere un buon segnale. La prima esposizione dura in genere 12 20 ore (tutta la notte)

Accorgimenti: La formazione di bolle di aria impedisce l'ibridazione in alcuni punti del filtro, e' necessario eliminarle ad ogni passaggio. Utilizzando le buste di plastica occorre fare attenzione alla fuoriuscita di liquido radioattivo quando si apre o si chiude la busta. Per rendersi conto se i lavaggi a stringenza crescente sono stati sufficienti si puo' utilizzare un contatore Geiger, passandolo sul filtro dovrebbe segnalare una zona ad elevata radioattivita' (segnale specifico) su un fondo a bassa radioattivita'. Dopo l'ultimo lavaggio il contatore non dovrebbe contare sopra il livello di fondo. Se la radioattivita' rimane alta si effettua un altro lavaggio, facendo attenzione a non perdere il segnale specifico. Doppi guanti e schermi di plexyglass sono gli accorgimenti base per la manipolazione di materiale radioattivo. Inoltre un sistema di stoccaggio deve provvedere alla differenziazione dei rifiuti solidi e liquidi.

AP-PCR (arbitrary primer polymerase chain reaction)

Nella AP-PCR un singolo primer (10-15 mer) di sequenza nucleotidica arbitraria è usato per amplificare random segmenti di DNA di microrganismo.

Es. di alcuni primer usati per amplificare frammenti di DNA ipervariabile (già usati nel DNA fingerprinting come sonde) M13- sequenza di minisatellite; GTG5- sequenza di microsatellite.

Le bande risultanti da un AP-PCR visualizzabili su gel agarosio sono il risultato dell'amplificazione di segmenti di DNA fiancheggiati da due regioni che legano il primer e che sono esattamente complementari ad esso. I siti di legame del primer devono essere abbastanza vicini così che l'amplificazione proceda lungo tutto il segmento di DNA che li attraversa. La AP-PCR non richiede che si conosca prima la biologia molecolare del microrganismo indagato. Generalmente la AP-PCR si esegue utilizzando sullo stesso campione almeno 2-3 primer arbitrari alla volta di modo da confermare i risultati eventualmente ottenuti con un primo primer di scelta.

Note per una amplificazione AP-PCR: Concentrazione di $MgCl_2$ un po' più alta del normale (2-3 mM $MgCl_2$) può aumentare la stabilità dell'interazione primer/ template. Prove per ottimizzare la concentrazione del template. Prove per vedere a quale temperatura di annealing appaiono bande specifiche e riproducibili.

CICLI di PCR:

- 2 cicli a temperature di annealing basse per permettere il legame a bassa stringenza con il template.

Es: 94°C(5:00)-40°C(5:00)-72°C(2:00)

- 30 cicli ad alta stringenza. Es: 94°C(1:00)-50°C(1:00)-72°C(2:00)

La AP-PCR soffre di alcune limitazioni perché la PCR usata per produrre frammenti spesso crea artefatti nei prodotti. Questioni: un mismatch tra il primer e il DNA genomico da amplificare dovuto a un polimorfismo nel DNA target può creare mancata amplificazione- cambiamenti nei parametri di PCR come: rapporto primer/template, temperatura di annealing, concentrazione di $MgCl_2$, concentrazione del DNA, contaminazione da RNA, possono causare la comparsa/scomparsa di bande.

Qualunque sia la sorgente, nell'AP-PCR possono esserci artefatti di bande:

- falsi +: bande che compaiono in un lane ma che non dovrebbero esserci

- falsi -: bande che non compaiono ma che dovrebbero esserci Solo condizioni di reazione standardizzate accuratamente garantiscono prodotti di amplificazione riproducibili. Una possibilità per ridurre i bias è di ripetere per ogni campione 2-3 volte indipendentemente la procedura di estrazione, amplificazione, elettroforesi, così da accertarsi che non ci siano artefatti prima di procedere al confronto

PFGE

Questa tecnica consente la separazione di grandi molecole di DNA. Gli approcci convenzionali per l'elettroforesi su gel (tipicamente in gel di agarosio) possono risolvere molecole di DNA fino a circa 50Kb; in ogni caso, queste tecniche non sono in grado di separare frammenti di DNA sensibilmente più grandi. Per superare tale limitazione, sono stati sviluppati metodi in cui la direzione del campo elettrico applicato al DNA all'interno di un gel di agarosio viene periodicamente alternata. La PFGE può essere usata per separare frammenti di DNA grandi fino a 10Mb ed è quindi utilizzata per stabilire mappe di restrizione a largo raggio usando enzimi di restrizione a taglio raro, in modo da rilevare certi tipi di mutazioni che causano malattie genetiche mediante l'inserzione in cloni di grandi dimensioni.