

Maria Antonietta Lepore

**Principali tecniche  
di biologia  
molecolare clinica**



Copyright © MMIX  
ARACNE editrice S.r.l.

[www.aracneeditrice.it](http://www.aracneeditrice.it)  
[info@aracneeditrice.it](mailto:info@aracneeditrice.it)

via Raffaele Garofalo, 133 a/b  
00173 Roma  
(06) 93781065

ISBN 978-88-548-2440-9

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,  
di riproduzione e di adattamento anche parziale,  
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie  
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: aprile 2009

## Indice

<i>Introduzione</i>	7
Estrazione e purificazione di DNA	9
Elettroforesi su gel e ibridazione Southern blotting	11
Marcatura di sonde	15
Reazione polimerasica a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR)	19
Costruzione di genoteche e clonaggio di sequenze di DNA	23
Sequenziamento di DNA	25
Estrazione e purificazione di RNA	29
Sonde a DNA e RNA: tecnologia di ricombinazione	33
Sintesi di oligonucleotidi	37
Clonazione di DNA	39

Tecnologia del DNA ricombinante e analisi del DNA	41
Mutazioni e tecnologia di rilevazione	47
Replicazione del DNA	51
RNA messaggeri	61
Sintesi proteica	67
Ibridazione Southern, Northern, Western blotting	73
<i>Bibliografia</i>	77

## Introduzione

La finalità di questo libro è descrivere lo sviluppo delle principali tecniche di biologia molecolare in contesti ad alta intensità di ricerca.

L'utilizzo delle biotecnologie molecolari è fondamentale per il coinvolgimento nello sviluppo delle tecniche innovative.

Le tecniche di biologia molecolare costituiscono il principale ambito di applicazione dei risultati della ricerca di base svolta in campo biologico–molecolare e biomedico.

Per poter riuscire a valorizzare compiutamente le nuove conoscenze scientifiche, è necessario che l'impegno nella ricerca biomolecolare promuova un significativo sprono biotecnologico focalizzato su nuove metodiche ad elevato potenziale applicativo.

Questo libro ha, quindi, una duplice finalità: presentare un quadro generale delle principali tecniche di biologia molecolare, sottolineando il loro ruolo strategico nella ricerca; analizzare la possibilità di sviluppo delle tecniche biomolecolari con metodiche di sempre più facile applicazione.

Allo scopo di favorire un uso appropriato delle tecnologie biomolecolari, molte di queste sono veloci e sensibili e, di solito, è sufficiente una piccola quantità di materiale di partenza.

Affinchè si possa offrire una corretta applicazione, è opportuno conoscere non soltanto l'aspetto tecnologico, ma anche l'aspetto clinico.



## Estrazione e purificazione di DNA

Per estrarre il DNA da una cellula è necessario disgregare le membrane, plasmatica e nucleare, per liberarne il contenuto, mediante sostanze detergenti, coadiuvate da lavoro meccanico con pestelli a mano oppure ausili meccanici.

Il lisato cellulare viene, così, trattato con proteasi (proteinasasi K), per inattivare le proteine contaminanti la preparazione di acidi nucleici.

Dopo incubazione con proteasi e RNasi, quest'ultime degradano specificatamente l'RNA, si fanno 2 estrazioni con fenolo e 1 con cloroformio.

Il DNA resta, in questo modo, nella fase acquosa, invece le proteine si ripartiscono nella fase fenolica.

La fase acquosa viene recuperata e il DNA viene precipitato con sali (sodio acetato) e 2,5 volumi di etanolo assoluto.

Il DNA precipitato, visibile sotto forma di gomitolo biancastro, viene recuperato dopo centrifugazione; il surnatante eliminato e il pellet di DNA viene lavato con etanolo al 75% per eliminare l'eccesso di sali.

Il DNA così ottenuto viene sciolto in acqua, lasciandolo per 1 ora alla temperatura di 37°C oppure overnight alla temperatura di 4°C.

Per determinare la quantità di DNA e la sua concentrazione, si sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire i raggi

ultravioletti (UV) alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Le proteine assorbono UV alla lunghezza d'onda di 280 nm e, quindi, si può determinare il grado di purezza del DNA mediante il rapporto di assorbimento delle lunghezze d'onda 260 nm/280 nm.

Quanto più il rapporto è vicino a 1,6 tanto maggiore è il grado di purezza del DNA.

Se questo rapporto è superiore a 2,0 significa che c'è contaminazione da RNA.

Se, invece, il valore del rapporto è inferiore a 1,2 vi è contaminazione da proteine.

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi batterici capaci di tagliare, cioè, idrolizzare il DNA a doppia elica.

Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA esogeno (DNA fagico) in siti specifici chiamati siti di restrizione.

Il DNA è purificato e i prodotti della digestione, chiamati frammenti, sono separati mediante elettroforesi in gel di agarosio e successiva colorazione con bromuro di etidio, colorante specifico che si intercala tra le basi del DNA, evidenziandolo.

Si ottengono, così, bande diverse, il cui peso molecolare è determinato per confronto con frammenti a peso molecolare noto.

Infatti, ogni corsa elettroforetica deve contenere un frammento di lunghezza e peso molecolare noto.

L'elettroforesi ci permette di identificare con precisione la localizzazione dei siti di riconoscimento degli enzimi utilizzati, ottenendo una mappa di restrizione.

Il DNA substrato di una endonucleasi di restrizione deve essere privo di impurità e viene ottenuto con estrazione fenolo/cloroformio seguito da precipitazione con etanolo.

Le reazioni di digestione avvengono alla temperatura di 37°C.



## Elettroforesi su gel e ibridazione Southern blotting

Per analizzare i frammenti di DNA ottenuti per digestione da parte di endonucleasi di restrizione, si utilizza elettroforesi in gel di agarosio 1% oppure 1,5%, in base alla grandezza e al peso molecolare dei frammenti da identificare.

La velocità di migrazione dei frammenti di DNA è inversamente proporzionale al loro peso molecolare.

La dimensione dei frammenti viene stimata confrontando la migrazione dei frammenti in esame con quella di un frammento standard di peso molecolare noto.

Infatti, ogni corsa elettroforetica deve includere un frammento di controllo di DNA umano di lunghezza nota.

Questi frammenti vengono evidenziati immergendo il gel in una soluzione di bromuro di etidio, colorante specifico per il DNA, osservandolo per transilluminazione con luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 254 nm.

Il bromuro di etidio è un fluorocromo che si lega specificamente al DNA, intercalandosi tra le sue basi.

Si visualizzano, così, le bande di DNA, dove ogni banda di DNA corrisponde ad un frammento.

Se nel gel vi sono più di 50 frammenti, oppure se la quantità di DNA in ogni frammento è inferiore a 40 ng di DNA e, quindi, non si possono visualizzare le bande di interesse, è necessario trasferire il DNA dal gel ad un foglio di nylon o di nitrocellulosa, mediante la tecnica del Southern blotting.

Dalla procedura Southern blotting si possono ottenere 3 tipi di informazioni:

- 1) la presenza o l' assenza di uno specifico frammento di DNA;
- 2) le dimensioni dei frammenti di DNA rilevati forniscono informazioni sulla posizione dei siti di restrizione e riflettono la mappa fisica della regione di DNA;
- 3) il numero di copie di un determinato frammento di DNA può essere stimato comparandolo con un campione normale.

La tecnica del Southern blotting è indispensabile se si deve analizzare il DNA genomico di un individuo, perché la digestione con un enzima di restrizione origina milioni di frammenti che corrono sul gel come una strisciata continua.

In questo modo non è possibile visualizzare alcuna banda in modo diretto, con la colorazione con bromuro di etidio.

Nel Southern blotting il DNA viene trasferito, dopo l'elettroforesi, dal gel su un foglio di nylon o di nitrocellulosa, grazie alla pressione di capillarità di un tampone attraverso un supporto solido assorbente.

A tale scopo, il gel di agarosio, su cui sono migrati i frammenti di DNA digerito con enzimi di restrizione, viene posto in una soluzione a pH alcalino, NaOH, che ha azione denaturante perché solo il DNA a singola elica si lega stabilmente al filtro di nylon o nitrocellulosa e solo le singole eliche sono in grado, successivamente, di ibridizzare con sonde radioattive specifiche.

Per il trasferimento su filtro si utilizza una vaschetta contenente una soluzione salina neutra ad alta forza ionica; un foglio di carta assorbente viene posto su una lastra di vetro o plexiglas, posta nella vaschetta in modo da rimanere immerso nel tampone.

Sulla carta assorbente viene posto il gel e sul gel un foglio di nylon o di nitrocellulosa delle stesse dimensioni.

Sul filtro vengono posti molti strati di carta assorbente e, su questi, un peso da 1 Kg.

Il tampone sale, per capillarità, dal gel trascinando con se i frammenti di DNA che restano fissati al filtro a contatto diretto con il gel, nella esatta posizione in cui sono stati localizzati dalla corsa elettroforetica.

Un trasferimento completo richiede 16–21 ore.

Successivamente, il filtro viene trattato in modo da fissare il DNA mediante riscaldamento alla temperatura di 80°C sotto vuoto (nel caso di nitrocellulosa) oppure esposizione alla luce UV (nel caso del filtro di nylon).

Una sonda marcata viene ibridizzata al DNA presente sulla membrana, in condizioni definite di temperatura, legandosi ai frammenti di DNA che hanno la stessa sequenza della sonda.

Se la sonda è marcata con isotopi radioattivi, la localizzazione dei frammenti marcati sulla membrana viene rivelata con l'autoradiografia.