

CAPITOLO 2

TECNICHE DI ANALISI GENETICA

MOLECOLARE

L'indagine genetica e molecolare ha lo scopo di individuare le mutazioni geniche responsabili dell'estrinsecazione della FC o caratterizzare i soggetti portatori sani del gene mutato, specialmente nelle famiglie con individui che manifestino la patologia. Essa prevede i seguenti steps:

- I) Estrazione del DNA da linfociti presenti nel sangue venoso in EDTA o da tampone buccale.
- II) Determinazione della purezza di DNA estratto.
- III) Amplificazione del DNA ottenuto, con l'ausilio della tecnica della PCR.
- IV) Verifica della corretta amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%.
- V) Rilevazione delle eventuali mutazioni studiate mediante Reverse Dot Blot.

2.1 METODICHE PER ESTRAZIONE DEL DNA

2.1a Estrazione del DNA con metodica fenolo-cloroformio

Questa metodica, ormai obsoleta, viene effettuata in tre giorni.

PRIMO GIORNO

Si prelevano 10 mL di sangue intero in una falcon sterile da 50 mL, contenente, come anticoagulanti, 2 mL di ACD (=una soluzione contenente Acido citrico, Citrato trisodico, Destrosio ed acqua) o EDTA (=Acido etilendiaminotetracetico) e la si pone in congelatore per una notte a -20°C o a -80°C.

SECONDO GIORNO

Si scongela il sangue, inserendo la falcon in un bagnomaria a 37°C, e lo si diluisce nel rapporto di circa 1:5 con 45 mL di SOLUZIONE LISANTE.

Preparazione della soluzione lisante:

10 mL di TRIS [=Tris(idrossimetil)aminometano] 2M; 10 mL di EDTA 0.5M e 980 mL di H₂O sterile.

- Un litro di soluzione di TRIS 2M, a sua volta, viene preparato facendo sciogliere 242 g di TRIS (PM=121.1 g/mol) in 800 mL di H₂O distillata e, infine, si porta a volume di 1000 mL con H₂O distillata.
- Un litro di soluzione di EDTA 0.5M, invece, è preparato immettendo in 800 mL di H₂O distillata 146.15 g di EDTA (PM=292.3 g/mol) e, infine, si porta al volume di 1000 mL con H₂O distillata.

Le provette vengono mantenute in ghiaccio per 10 minuti; agitate delicatamente e centrifugate per 10 minuti a 6000 rpm. Viene aspirato il sovranatante; si ripetono i lavaggi con la soluzione lisante fino a distinguere nitidamente i leucociti ed, all'ultimo passaggio, si aspira il surnatante, lasciando 15 mL nella falcon.

A questo punto, si aggiungono 750 µL di Sodio Dodecil Solfato (SDS: ha l'obiettivo di sciogliere i lipidi delle membrane cellulari per permettere il rilascio del contenuto della cellula) e 150 µL di proteinasi K.

- Proteinasi K: confezioni da 100 mg liofilizzati. Aggiungere 5 mL di H₂O sterile, preparare delle aliquote da 1 mL e congelare a -20°C.
- SDS: preparare una soluzione al 10%.

Infine, si pone il tutto per una notte in bagnomaria a 37°C con agitatore, il quale permette un delicato ondeggiamento della falcon secondo il suo asse maggiore.

TERZO GIORNO

Si aggiunge alla falcon 1.5 mL di TRIS 2M, precedentemente preparato, ed 1 mL di fenolo equilibrato (=solvente organico non miscibile con acqua, il quale causa la coagulazione delle proteine presenti nella miscela e quindi la formazione di uno strato acquoso separato, estremamente viscoso ed elastico, contenente principalmente DNA).

Preparazione del fenolo equilibrato:

Si aggiungono a 500 mL di fenolo 1 grammo di 8-idrossichenolina ed 1 volume di TRIS 1M a pH 8; si agita con agitatore magnetico per 5-6 ore e, dopo aver fatto sedimentare per circa 30 minuti, si aspira il sovrnatante. Successivamente si aggiungono 1 volume di cloroformio isoamilico, conservato in frigorifero, e 2 volumi di TE1X; si agita la soluzione ottenuta per una notte in frigorifero, si lascia sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente; si aspira il sovrnatante e si conserva la

Si procede centrifugando a 6000 rpm per 10 minuti. Si aspira il sovrnatante, ovvero il DNA, con una pasteur, e lo si trasferisce in una nuova provetta da 15 mL.

A quest'ultima si aggiunge 1 mL di fenolo equilibrato e si agita delicatamente fino ad ottenere una soluzione omogenea, che sarà centrifugata per 10 minuti a 6000 rpm.

Si aspira il surnatante (=DNA) e lo si trasferisce in un'altra falcon, si aggiunge 1 mL di cloroformio isoamilico 24:1 (24 parti di cloroformio isoamilico + 1 parte di alcool isoamilico).

Si agita leggermente e si centrifuga a 6000 rpm per 10 minuti: procedere con l'aggiunta di 0.1 mL di sodio acetato 3M a pH 5.2 e di 2 mL di etanolo assoluto, conservato a -20°C, il quale fa sì che le molecole di DNA precipitino e possano venir estratte dal liquido come una piccola sfera lucente di DNA puro ad alto PM.

Un litro di soluzione di sodio acetato a pH 5.2 viene preparato facendo sciogliere 408 g di sodio acetato triidrato in 800 mL di H₂O sterile, regolando il pH con acido acetico e portando la soluzione fino al volume di 1000 mL con H₂O sterile.

Si agita delicatamente; si pone a -20°C o -70°C per 15 minuti; si preleva il DNA precipitato con una pasteur ad uncino e si effettua un lavaggio in etanolo al 70% (centrifuga 600 rpm per 10 minuti).

Viene asciugata sotto una comune lampadina la "matassa" di DNA finché questa incomincia a diventare trasparente; a quel punto, la si

pone in una cuvetta da 1.4 mL, contenente 1mL di TE1X e presterilizzata in autoclave, e si conserva a +4°C.

Una soluzione di TE1X (=Tris-EDTA) viene ottenuta aggiungendo a 500 mL di TRIS 2M 200 mL di EDTA 0.5M e 300 mL di H₂O sterile.

È stato così ottenuto il DNA dopo 3 giorni dal suo prelievo ed ora è possibile procedere con la misurazione della sua purezza, quindi, alla sua amplificazione ed allo studio delle eventuali mutazioni del gene CFTR presenti.

2.1b Estrazione del DNA

Questo tipo di estrazione di DNA da sangue intero prevede i seguenti steps:

1. Dopo aver prelevato al paziente un campione di sangue periferico in EDTA, si procede pipettando 80 µL di quest'ultimo all'interno di una provetta da centrifuga con tappo a vite.
2. Si aggiungono 320 µL di una soluzione di NH₄Cl (=Cloruro di ammonio) 170mM (d=9.09 g/L).
3. Si agita, capovolgendo delicatamente, per 20 minuti, evitando la formazione di schiuma.
4. Si centrifuga a 12000 rpm per 2 minuti.
5. Si rimuove il surnatante.
6. Si aggiungono, nella provetta, 300 µL di una soluzione contenente NaCl (=Cloruro di sodio) 10mM (d=0.58 g/L) ed EDTA 10mM (d=3.72 g/L).
7. Si vortexa vigorosamente.
8. Si centrifuga a 12000 rpm per 1 minuto.
9. Si ripetono gli steps 5-6-7-8 per almeno altre due volte, finché la colorazione rossa nel sovrinatante non scompare.
10. Si elimina il surnatante.
11. Si aggiungono nella provetta 200 µL di una soluzione di NaOH 50mM (d=2g/L).

12. Si vortexa vigorosamente.
13. Si incuba per 10 minuti in un Thermo Block a 98°C.
14. Si pipettano nella provetta 40 µL di una soluzione contenente Tris-base (formula bruta = C₄H₁₁NO₃) 1M (d=121.1g/L) e HCl a pH 7.5.
15. Si vortexa vigorosamente, al fine di risospendere le cellule.
16. Si aggiunge 1 mL di H₂O distillata sterile, portando il campione di DNA al volume di 1.24 mL.
17. Si centrifuga per 1 minuto a 12000 rpm.
18. All'interno del sovrantante si troverà il DNA estratto.

2.1c Estrazione di DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE®

L'estrazione del DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE® richiede diversi steps.

Una volta disposto il materiale occorrente sul banco di lavoro (fig.10) e dopo aver

contrassegnato con il codice del paziente le provette, può iniziare l'estrazione del DNA.

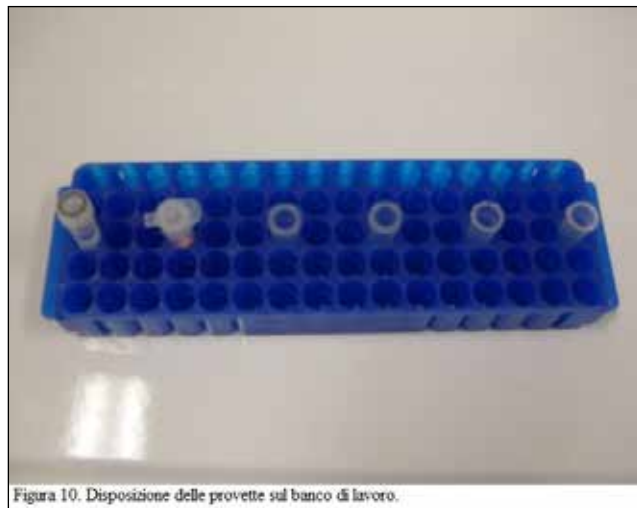


Figura 10. Disposizione delle provette sul banco di lavoro.

Si inseriscono 25 µL di proteinasi K (fig.11) sul fondo di una provetta da 1.5mL con il tappo a vite.

Proteinasi K: conservata a +4°C, fornita nel kit nella sua forma liofilizzata e ricostituibile con l'aggiunta di 0.9 mL di buffer. Ha lo scopo di degradare le proteine che legano il DNA.



Figura 11. Prelievo della Proteinasi K.

Si prelevano 200 μ L di sangue in EDTA (fig.12), dopo averla agitata delicatamente, e si depositano sul fondo della provetta con tappo a vite contenente 25 μ L di proteinasi K.

Si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti.



Figura 12. Prelievo del sangue dalla provetta contenente eparina.

Si aggiungono 200 μ L di tampone di lisi B3 al campione (fig.13A).

Tampone di lisi B3: fornito nel kit.

Lisa le cellule per permettere il rilascio del materiale genetico.

Si vortexa vigorosamente per 10-20 secondi (fig.13B) e si incuba per 15 minuti a 70°C, nel Thermo Block (fig.13C).

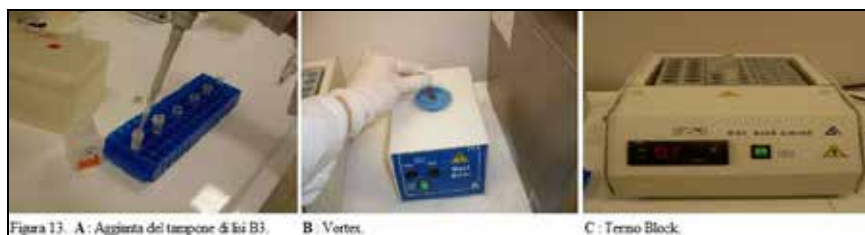


Figura 13. A: Aggiunta del tampone di lisi B3.

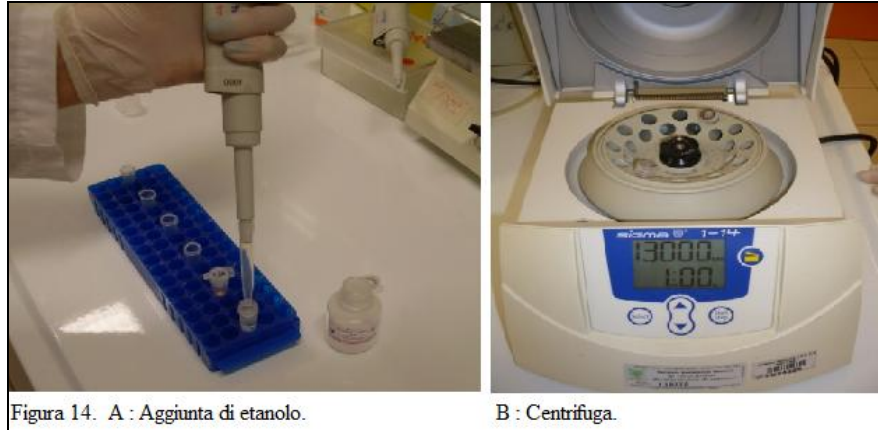
B: Vortex.

C: Thermo Block.

Si aggiungono ora 210 μL di etanolo.

Etanolo (formula bruta = $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): fornito nel kit.
Consente il legame delle molecole di DNA al filtro della colonnina.

Si vortexa vigorosamente e si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto (fig.14).



A questo punto, si prelevano 600 μL di campione; si immettono delicatamente all'interno della colonnina fornita dal kit, facendo scivolare il liquido sulle pareti per evitare la rottura del filtro (fig.15), e si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto.

Il DNA risulterà legato al filtro, mentre i contaminanti, come le membrane cellulari, avranno attraversato il filtro e si saranno depositati, sotto forma di



soluzione, sul fondo della provetta di raccolta (fig.16).

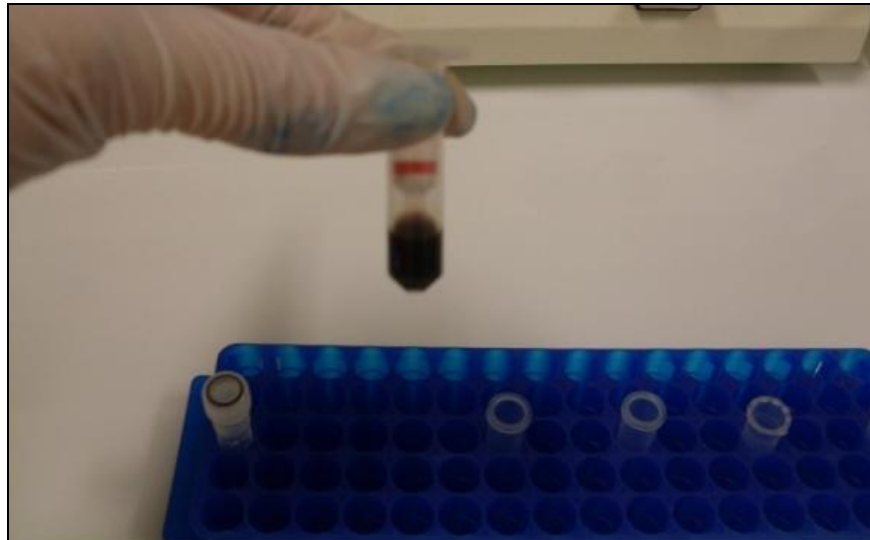


Figura 16. Soluzione contenente i contaminanti depositati sul fondo della provetta di raccolta.

Si elimina la provetta di raccolta, si posiziona la colonnina con il DNA sul filtro su una nuova provetta di raccolta e si aggiungono 500 μ L di tampone BW (fig.17).

Tampone BW: fornito nel kit.

Elimina i contaminanti per ottenere il DNA puro.



Figura 17. Aggiunta del tampone di lavaggio BW.

Si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto; si elimina la provetta di raccolta

contenente la soluzione con all'interno le impurità (fig.18); si trasferisce la

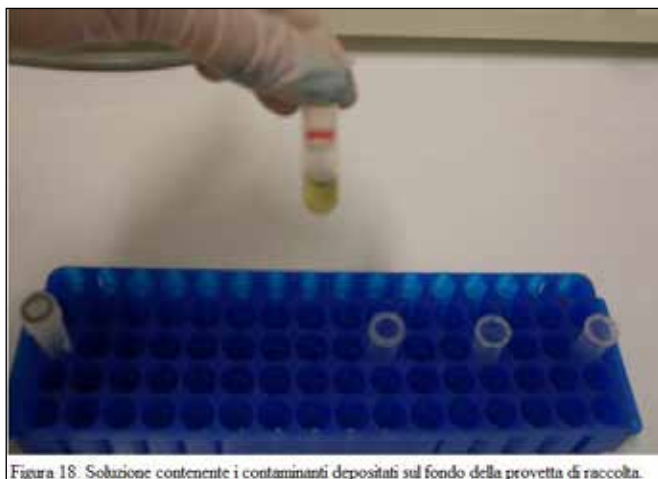


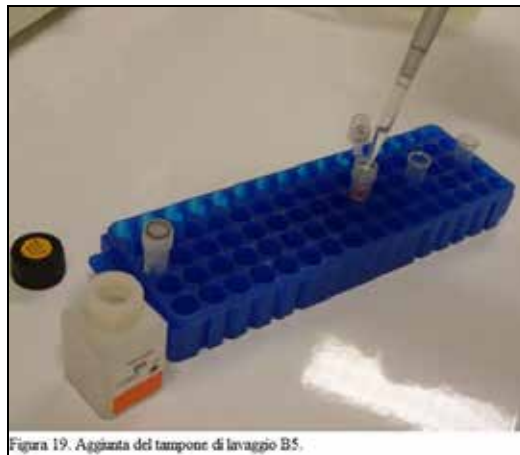
Figura 18. Soluzione contenente i contaminanti depositati sul fondo della provetta di raccolta.

colonnina su un'altra provetta, questa volta non fornita dal kit, e si procede con un secondo lavaggio con il tampone B5.

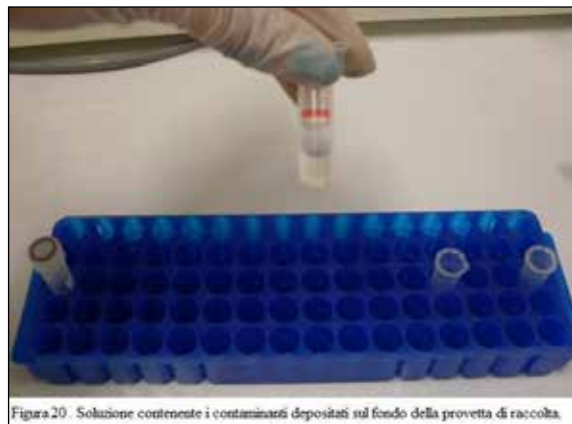
Tampone B5: fornito nel kit.

Elimina i contaminanti per ottenere il DNA puro.

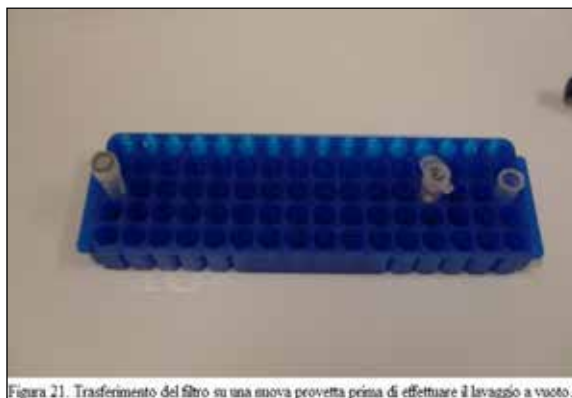
Si aggiungono 600 μ L di tampone B5 (fig.19), facendo attenzione ad evitare la rottura del filtro, e si centrifuga nuovamente a 13000 rpm per 1 minuto.



Si elimina la provetta di raccolta contenente i contaminanti nella soluzione precipitata (fig.20) e si posiziona la colonnina su una nuova provetta per effettuare il lavaggio a vuoto (fig.21): senza aggiungere



nessun tampone di lavaggio, si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto. Si elimina la provetta a fondo conico e si posiziona la colonnina su un'altra provetta.



Si aggiungono, allora, 100 μ L di tampone di eluizione BE (fig.22).

Tampone BE: fornito nel kit e riscaldato a 70°C prima dell'uso.
Permette al DNA legato al filtro della colonnina di eluire sul fondo della provetta.

Si centrifuga, per l'ultima volta, a 13000 rpm per 1 minuto.

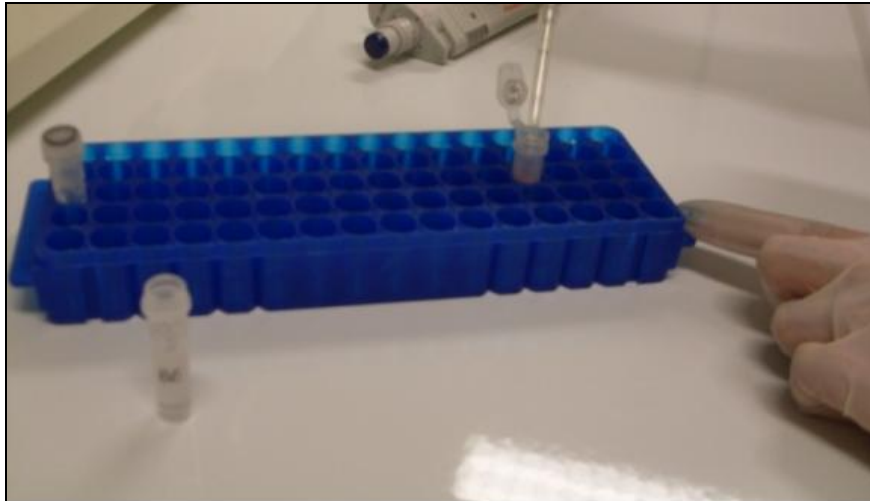


Figura 22. Aggiunta del tampone di eluizione BE.

Sul fondo conico della provetta si potrà osservare un eluato limpido e denso: la soluzione di DNA (fig.23).

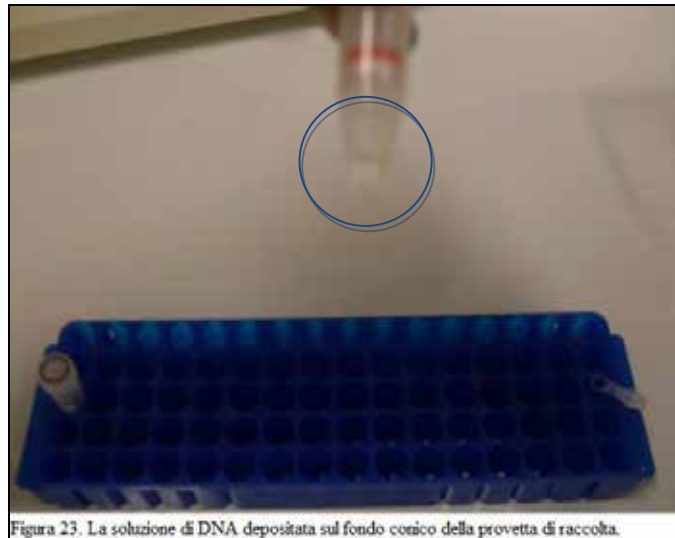


Figura 23. La soluzione di DNA depositata sul fondo conico della provetta di raccolta.

Ora si può trasferire il DNA in un'eppendorf DNasi ed RNasi free da 200 μ L (fig.24), iniettando il materiale genetico lentamente e con estrema attenzione, al fine di evitare la formazione di bolle d'aria all'interno, e, prima di utilizzarlo, si determina la purezza del campione estratto.



Figura 24. Trasferimento del DNA in eppendorf.

2.1d Estrazione di DNA da tampone buccale

L'estrazione di DNA da tampone buccale prevede i seguenti steps:

1. Si immettono 2 mL di soluzione fisiologica sterile all'interno di una provetta a fondo conico sterile da 15 mL dotata di tappo a vite.
2. Si inserisce nella bocca del paziente il tampone sterile e, mediante *scraping*, si prelevano le cellule epiteliali.
3. Si immette il tampone nella soluzione fisiologica e si agita: la soluzione apparirà torbida.
4. Si centrifuga a 1500 rpm per 10 minuti.
5. Si elimina il surnatante.
6. Si prelevano dal fondello della provetta le cellule epiteliali ivi contenute (pellet).
7. Si procede come nel caso dell'estrazione di DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE® (vedi 2.1c).

2.4 DETERMINAZIONE DELLA PUREZZA DEL CAMPIONE ESTRATTO

Per determinare la concentrazione del DNA, precedentemente estratto, e la sua purezza, si utilizza uno spettrofotometro (fig.25) alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm, ovvero, rispettivamente, la lunghezza d'onda massima di assorbimento del DNA e delle proteine.

Per l'analisi, si pipetta, con l'apparato dello spettrofotometro aperto, 1 μ L di H₂O sterile per il bianco, il solvente in cui è immerso il DNA di cui vogliamo misurare l'assorbanza, ed 1 μ L di campione da analizzare.

Lo spettrofotometro è dotato di un software specifico che permette di visualizzare lo spettro di assorbimento del nostro campione. Se il campione è privo di inquinamento da contaminanti, il rapporto DNA/proteine avrà un valore pari a 1.7 ± 0.2 .

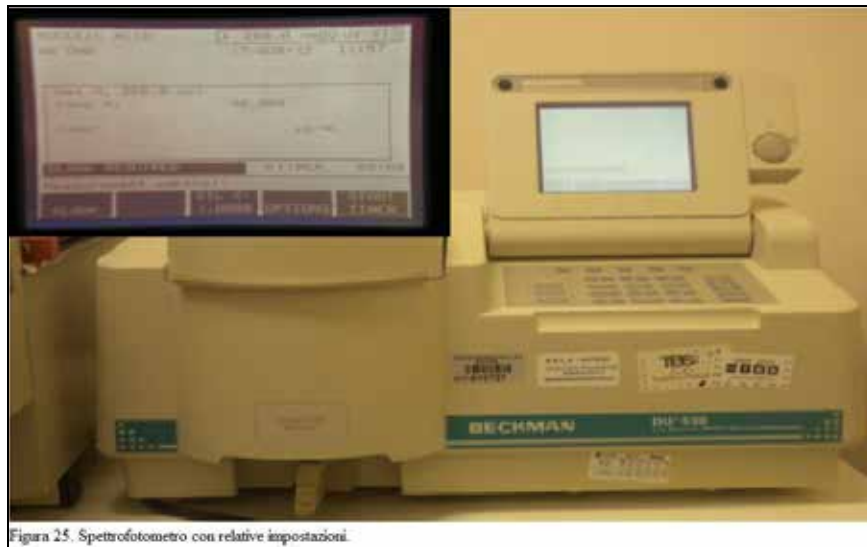


Figura 25. Spettrofotometro con relative impostazioni.

2.3 AMPLIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO MEDIANTE PCR

Una volta estratto e quantificato il DNA si può procedere con:

- amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) seguita da
- rivelazione delle mutazioni mediante IBRIDAZIONE INVERSA (Reverse Dot Blot).

2.3a Protocollo di amplificazione

Materiali presenti nel kit:

1. Master Mix di amplificazione CF 22 Mut.
2. Master Mix di amplificazione CF 16 Mut+Tn.
3. Taq DNA Polymerase.

Lo strumento utilizzato per la PCR è il termociclatore (fig.26).

La mix di amplificazione va conservata a -20°C.

È importante mantenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione).



Figura 26. Termociclatore.

2.3b Preparazione delle mix per la PCR

Le operazioni di preparazione delle mix per la PCR avvengono sotto cappa sterile a flusso laminare verticale.

Precauzioni: mantenere tutti i reagenti per l'amplificazione in ghiaccio durante l'esecuzione dell'intera procedura. Eseguire le operazioni tenendo le provette in ghiaccio. Evitare ripetuti scongelamenti delle mix di amplificazione.

Per ogni campione:

- Preparare 2 provette da termociclature del volume di 0,2 ml DNasi ed RNasi free (una per ogni mix di amplificazione) e mantenerle in ghiaccio.
- Preparare una PCR mix 1 (22 mutazioni) (50 µL): di cui 44.5 µL di mix di amplificazione CF 22mut e 0.5 µL di Taq Polimerasi.
- Preparare una PCR mix 2 (16 mut+Tn) (50 µL): di cui 44.5 µL di mix di amplificazione CF 16mut+Tn e 0.5 µL di Taq Polimerasi.
- Aggiungere 5 µL di DNA nelle rispettive provette.

La concentrazione di DNA da analizzare deve essere di circa 30-40 ng/ µL.

Reazione di amplificazione per singolo campione (n)	
Sostanze	Quantità
Amplification Mix	44,5 µL
Taq (5U/ µL)	0,5 (1U/ µL)
DNA da amplificare	5 µL
Totale reazione	50 µL

Ad esempio, qualora si vogliono amplificare 4 campioni (n=4), si calcolerà il tutto per 5 campioni (n+1=5):

- ✓ si prepareranno, in totale, 222.5 µL di mix 1 e 2.5 µL di Taq;
- ✓ si dividerà per 5;
- ✓ si aggiungeranno a ogni mix completo, all'interno dell'eppendorf, 5 µL di DNA.

A questo punto, si preriscalda il coperchio del termociclature; si inseriscono le provette e si esegue il programma di amplificazione specifico per la rilevazione della Fibrosi Cistica (tab.6).

DENATURAZIONE PARZIALE	94°C per 10 min	
DENATURAZIONE	94°C per 30 sec	} 35 cicli
ANNEALING	54°C per 30 sec	
ESTENSIONE	72°C per 40 sec	
	72°C per 10 min	
	4°C	

Tabella 6. Programma di amplificazione per Fibrosi Cistica.

2.4 VERIFICA DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE: ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO AL 3%

Dopo l'amplificazione viene effettuato un controllo sui prodotti di amplificazione mediante **elettroforesi su gel di agarosio al 3%** in TBE 1X. L'elettroforesi su gel di agarosio è 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 o catodo a quello positivo o anodo, in funzione delle cariche elettriche conferite dai gruppi fosfato. La velocità di migrazione dipende dalle dimensioni dei frammenti, dalla percentuale dell'agarosio nel gel e dal voltaggio applicato. Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta superavvolta. La corsa elettroforetica avviene all'interno di una vasca elettroforetica orizzontale, collegata ad un alimentatore.

2.4a Preparazione del tampone TBE1X

Inizialmente, si procede preparando 1 L di tampone TBE1X (=Tris-Borato-EDTA): si aggiungono a 100 mL di EDTA 900 mL di H₂O distillata e si agita il tutto, al fine di evitare la precipitazione del sale sul fondo della soluzione (fig.27).



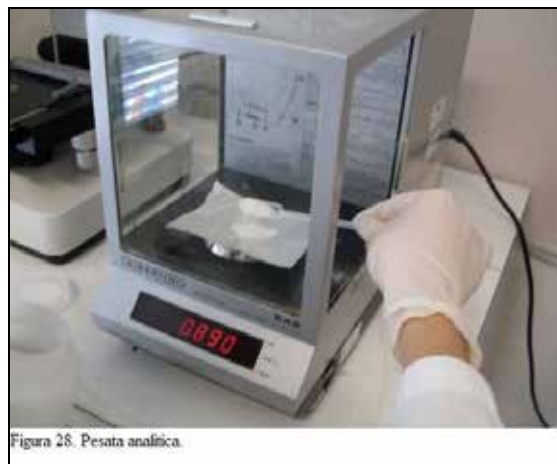
Figura 27. Tampone TBE1X.

2.4b Preparazione del gel di agarosio al 3%

L'agarosio è un polisaccaride di origine marina, estratto dalle alghe *agar agar*, costituito da unità di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio, che si trova sotto forma di polvere.

Per preparare un gel di agarosio al 3%, si devono far sciogliere 3 g di agarosio in 100 mL di TBE1X, precedentemente preparato.

Vengono pesati, così, i 3 g di agarosio su una bilancia analitica (fig.28).



Si immette ora l'agarosio pesato nei 100 mL di TBE1X (fig.29) e, utilizzando come tappo la carta di alluminio utilizzata nella pesata, si agita per solubilizzare l'agarosio nel solvente.



Si riscalda la soluzione in forno a microonde o su piastra termica con l'ausilio di un magnete agitatore. Il gel sarà pronto nel momento in cui sarà diventato limpido e trasparente: dopo circa 3 minuti nel microonde (fig.30A) e 20 minuti su piastra (fig.30B).



Intanto, è stata allestita la vaschetta, con all'interno il pettinino, per creare i pozzetti nel gel; una falcon da 50 mL, che servirà per inserire il gel in quest'ultima; una pasteur di vetro, per eliminare eventuali bolle nella vaschetta, ed il Bromuro di etidio, con cui verrà colorato il gel.

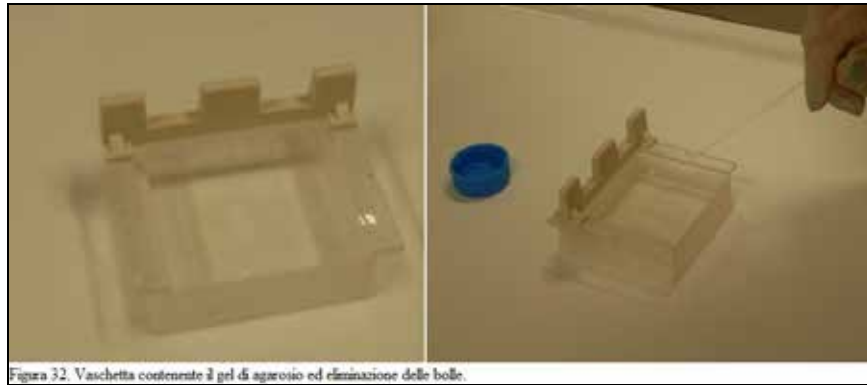
Bromuro di etidio: colorante specifico per acidi nucleici.

Si intercala tra le basi del DNA per permetterne la successiva osservazione.

Una volta pronto il gel, se ne trasferiscono 50 mL all'interno della falcon, e si pipettano 5 μ L di etidio bromuro (fig.31).

A questo punto, si può inserire lentamente il gel nella vaschetta predisposta, facendo attenzione all'eventuale formazione di bolle d'aria, da eliminare con l'ausilio di una pasteur di vetro (fig.32).





2.4c Preparazione dell'amplificato e corsa elettroforetica

Utilizzando come indicatore il gel avanzato all'interno della falcon, si attende la solidificazione e, nel frattempo, si prepara la strumentazione necessaria per la corsa elettroforetica (fig.33), in cui si immetterà, in abbondanza, tampone TBE1X.

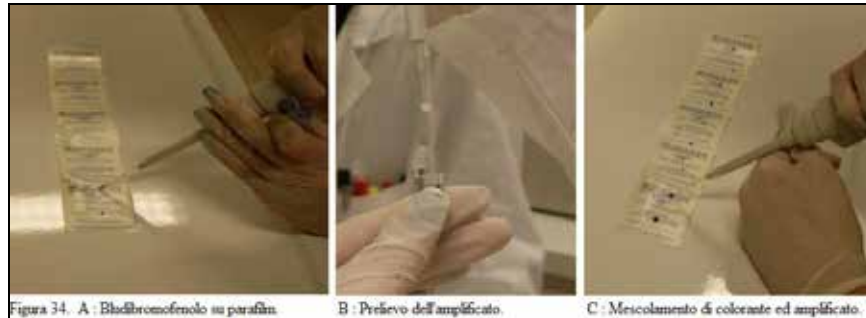


Dopo la solidificazione del gel nella vaschetta, è possibile inserirlo all'interno della vasca predisposta alla corsa e pipettare all'interno dei pozzetti il tampone circostante.

Si procede disponendo sul banco una striscia di parafilm, su cui si immetteranno tante gocce da 2 μ L di colorante bludibromofenolo (fig.34A), a temperatura ambiente, quanti sono gli amplificati da

caricare nei pozzetti. In corrispondenza della goccia, vengono disposti 12 μL di amplificato (fig.34B); si mescola (fig.34C), pipettando, e si prelevano i 14 μL totali, per iniettarli nel pozzetto.

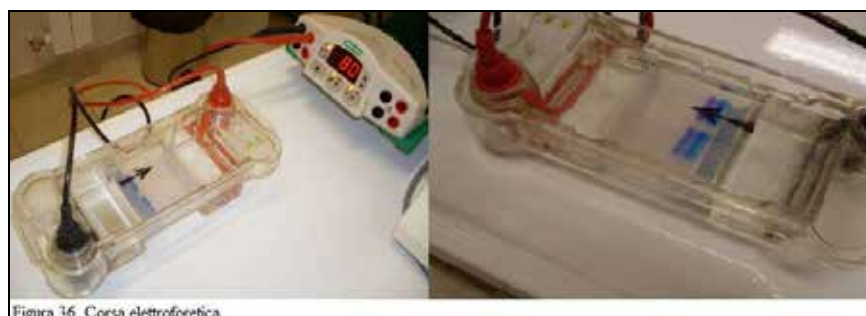
Si ripete lo stesso procedimento per ciascun amplificato, ponendo attenzione alla posizione del pozzetto in cui viene collocato.



Nel primo pozzetto, si inseriscono 12 μL di un marker a peso molecolare noto, da confrontare con gli altri amplificati, e si immettono gli amplificati, mescolati al colorante, nei successivi pozzetti (fig.35).



Una volta caricati tutti i pozzetti, si avvia la corsa elettroforetica, applicando un voltaggio di 80 V, per circa 60 minuti (fig.36).



Si pone termine alla corsa nel momento in cui si osservano le bande colorate dell'amplificato in prossimità della regione finale del gel di agarosio e si trasferisce il gel su una lampada UV, per osservarlo (fig.37).

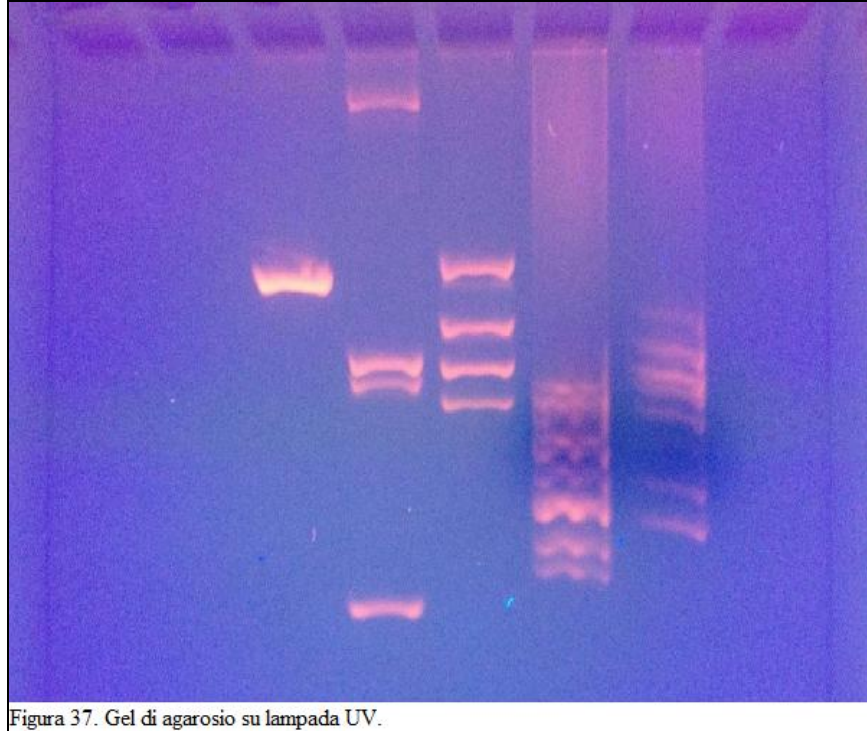
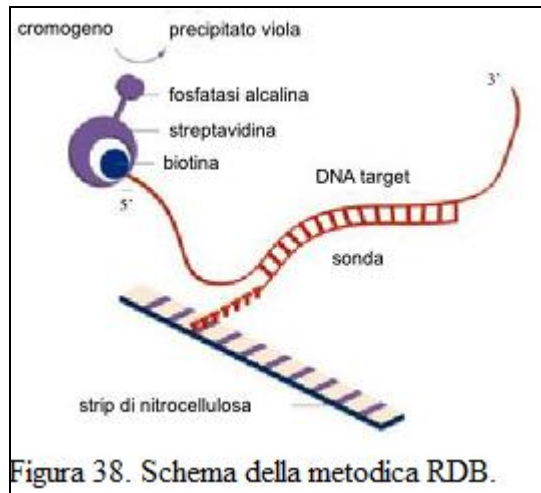


Figura 37. Gel di agarosio su lampada UV.

2.5 RILEVAZIONE DELLE MUTAZIONI: REVERSE DOT BLOT

La tecnica del Reverse Dot Blot (RDB) consente di rilevare la presenza delle eventuali mutazioni e prevede una reazione di ibridazione allele specifica tra i prodotti della PCR e le sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale o a quella mutata. Le sonde allele specifiche, che portano un gruppo amminico in posizione 5', vengono fatte aderire stabilmente a una membrana di nylon carica negativamente. Dopo l'ibridazione tra le sonde e il DNA amplificato, nel quale è incorporato dUTP biotinilato, si procede alla visualizzazione colorimetrica con una reazione di tipo biotina-streptavidina-fosfatasi alcalina (fig.38).



Il sistema è rapido, affidabile e non richiede strumentazioni sofisticate (fig.39).



2.5a Procedura del RDB

Si accende il bagnomaria , portandolo alla temperatura di 41°C; si regola il livello dell' H₂O, la quale deve coprire i 2/3 della vaschetta che verrà introdotta, e si immette all'interno la soluzione di ibridazione e di lavaggio stringente, al fine di preriscaldarle.

Si predispone sul banco il DNAT; la soluzione coniugato; la soluzione di lavaggio B; lo sviluppatore del colore, che devono trovarsi a temperatura ambiente; le eppendorf contenenti il DNA amplificato; le strip, su della carta assorbente; la pinzetta e le pipette.

Si utilizzano 2 vaschette da rivelazione, opportunamente contrassegnate, al fine di rilevare per ogni campione 38 mutazioni, con l'ausilio di 2 strip, rispettivamente, da 22 mut e da 16 mut.

DENATURAZIONE: Si immettono in ogni corsia della vaschetta 15 μL di **denaturante** (si useranno n corsie quanti sono i campioni da analizzare), che si presenterà di colore blu (fig.40).

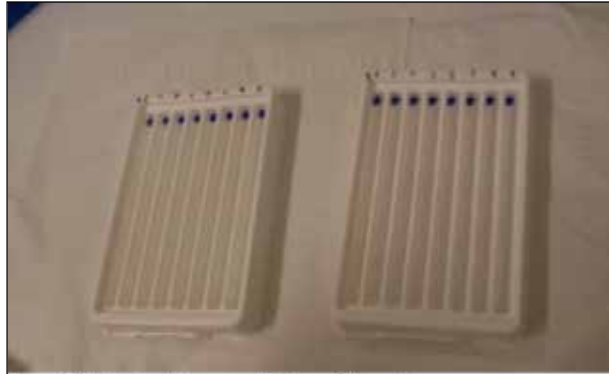


Figura 40. Denaturante immesso all'interno delle corsie.

Denaturante (DNAT): permette l'apertura della doppia elica di DNA e la formazione dei singoli filamenti di acido nucleico.

Si aggiungono 15 μL di **prodotto di amplificazione** (fig.41), si mescola bene, con l'ausilio della pipetta, e si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente.



Figura 41. Aggiunta dell'amplificato e mescolamento con DNAT.

RINATURAZIONE: Si pipetta, per ogni campione, 1 mL di **soluzione di ibridazione** (fig.42A).

Soluzione di ibridazione: preriscaldata a 41°C.

Consente il legame tra il singolo filamento di DNA e gli oligonucleotidi presenti sulla strip.

Si agita leggermente la vaschetta: si osserverà la scomparsa del colore blu (fig.42B).

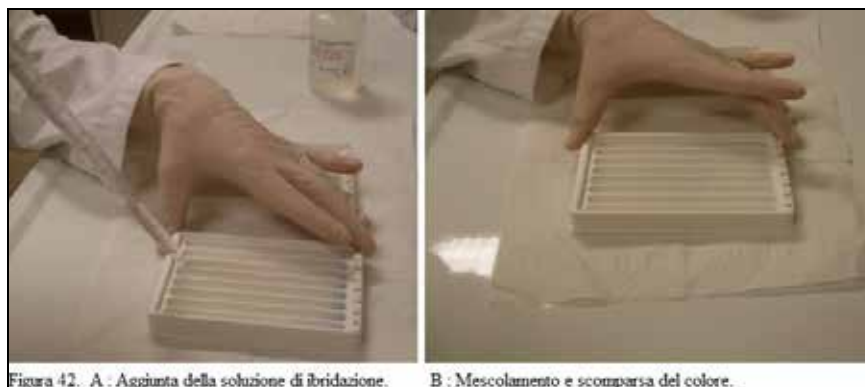


Figura 42. A : Aggiunta della soluzione di ibridazione. B : Mescolamento e scomparsa del colore.

A questo punto, si immerge una striscia, con le marker lines verso l'alto, in ogni corsia: nella vaschetta contenente l'amplificato con mix1 si introducono le strips CF22Mut, mentre in quella con all'interno l'amplificato con mix2 si immettono le strips CF16Mut+Tn (fig.43).

Prima strip (22 mut):

ESONE	MUTAZIONE	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
13	2183AA>G	400 bp
INTRONE 19	3849+10Kb C>T	343 bp
3	G85E	311 bp
14b	2789+5G>A	310 bp
20	W1282X, G1244E	291 bp
5	711+5G>A, 711+AG>T	262 bp
21	N1303K, 4016 insT	239 bp
11	G542X, 1717-1G>A, R553X, Q552X, G551D,S549R (A>C)	199 bp
10	DF508, DI507, F508C, I502T, 1706del17, 1677 delTA	171 bp

Seconda strip (16 mut+Tn):

ESONE	MUTAZIONE	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
4	621+G>T, R117H, I148T	292 bp
18	D1152H	334 bp
17b	L1055P,R1066H, L1077P	143 bp
24	4382delA	240 bp

19	R1162X, R1158X	213 bp
8	1259insA	410 bp
6a	852del22	159 pb
7	R347P, T338I	188 bp
Intr8/Es9	Alleli5T/7T/9T	270 pb
15	S912X	184 pb
17a	3199del6	239 pb

Strips con oligonucleotidi: vi si legherà il DNA denaturato. Consentono la rilevazione del genotipo del campione, in relazione al gene CFTR.



Figura 43. Strips all'interno delle vaschette.

Si incuba per 45 minuti a 41°C nel bagnomaria, chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura, mantenendo le strisce in agitazione a 50 rpm (fig.44).

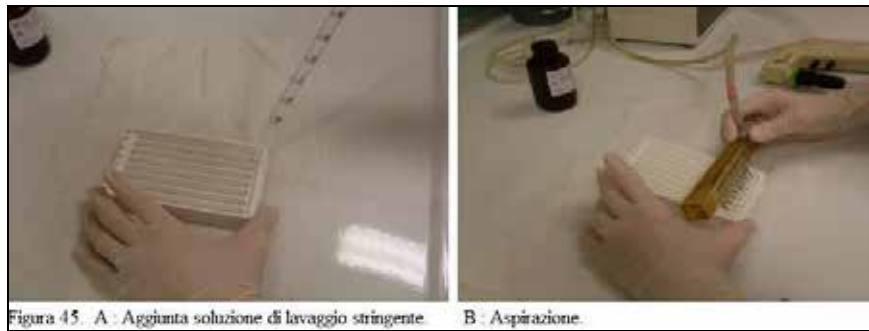


Figura 44. Vaschette nel bagnomaria dotato di agitatore.

Si elimina, grazie ad un aspiratore, il liquido da ogni corsia della vaschette e si aggiunge 1 mL di **soluzione di lavaggio stringente** (fig.45A).

Soluzione di lavaggio stringente: fornita dal kit e preriscaldata a 41°C.

Dopo circa 10 secondi, si aspira il liquido (fig.45B).



Si aggiunge nuovamente 1 mL di soluzione di lavaggio stringente e si incuba per 10 minuti nel bagnomaria a 41°C, con un'agitazione di 50 rpm.

Si aspira il liquido; si immette un altro mL di soluzione di lavaggio stringente; si incuba a 41°C per 10 minuti nel bagnomaria in agitazione e si elimina il liquido.

REAZIONE BIOTINA-STREPTAVIDINA: Ora è possibile aggiungere 1 mL di **soluzione coniugato** ed incubare a temperatura ambiente per 20 minuti, mantenendo le strisce in agitazione, dopo averle disposte sul coperchio del bagnomaria (fig.46).



Soluzione coniugato: presente nel kit.

É costituita da streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina.

Si elimina il liquido e si immette 1 mL di **soluzione di lavaggio B**.

Soluzione di lavaggio B: fornita dal kit.

Si attende circa 10 secondi e si aspira il liquido.

Si aggiunge un altro mL di soluzione di lavaggio B e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti, disponendo sul coperchio del

bagnomaria le vaschette, per mantenere le strisce in agitazione costante.

L'agitazione, richiesta in vari steps, garantisce il contatto tra gli oligo presenti sulle strips e il DNA denaturato, che vi si legherà se complementare alla loro sequenza nucleotidica.

Si aspira il liquido e si ripete l'ultimo passaggio, pipettando 1 mL di soluzione di lavaggio B ed incubando, in agitazione, a temperatura ambiente per 5 minuti.

Si elimina il liquido; si aggiunge 1 mL di **sviluppatore del colore** (fig.47A).

Sviluppatore di colore: rende possibile l'osservazione delle zone di legame tra gli oligo e il DNA, attraverso la formazione di bande colorate sulle strips.

Si incuba per 20 minuti a temperatura ambiente, in agitazione, al buio, predisponendo un coperchio sulle vaschette (fig.47B).

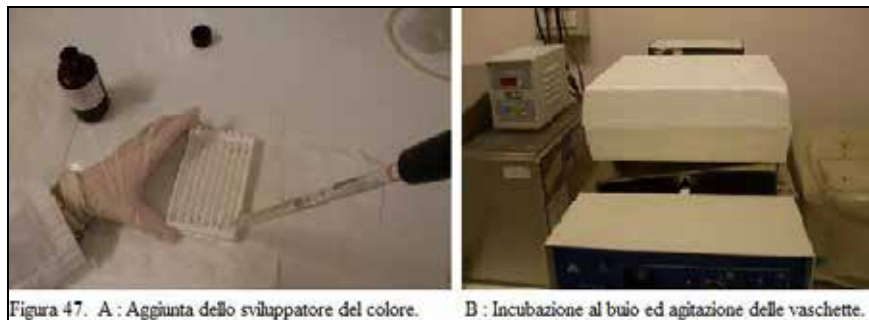


Figura 47. A : Aggiunta dello sviluppatore del colore. B : Incubazione al buio ed agitazione delle vaschette.

Si immette H₂O distillata nella corsia, per attuare il lavaggio finale delle strips (fig.48).

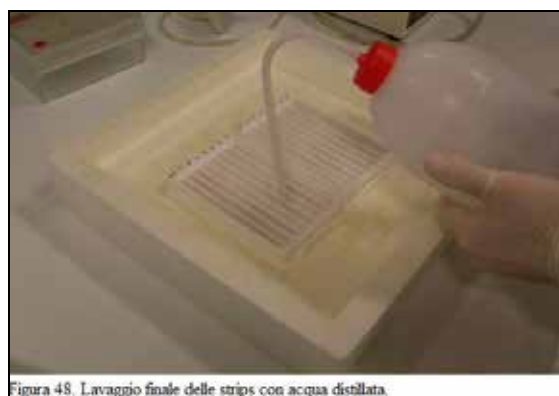


Figura 48. Lavaggio finale delle strips con acqua distillata.

Le strips, che risultano colorate al termine della procedura (fig.49), vengono prelevate, con una pinzetta; vengono lavate diverse volte, con H₂O distillata, ed asciugate al buio con carta assorbente.

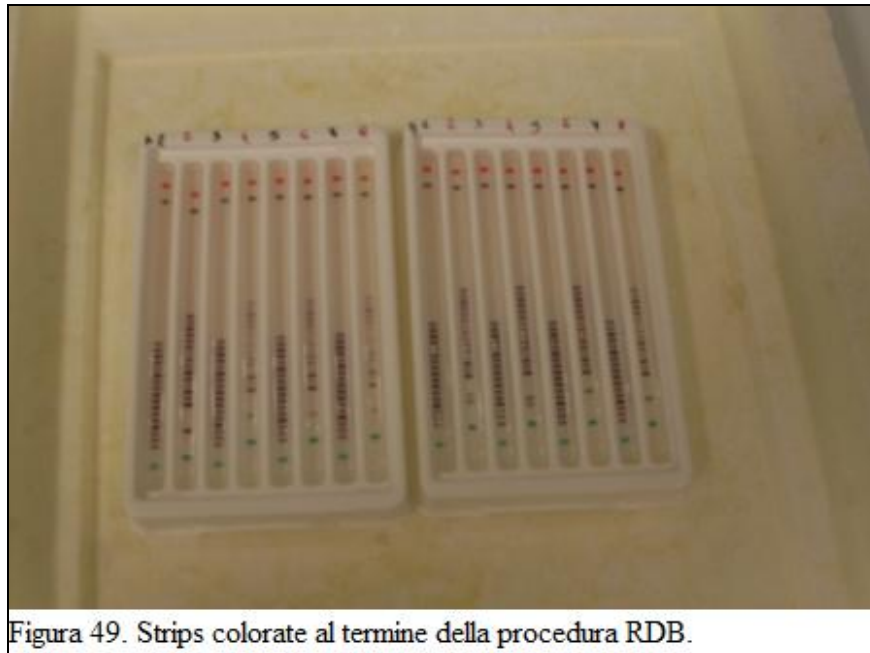
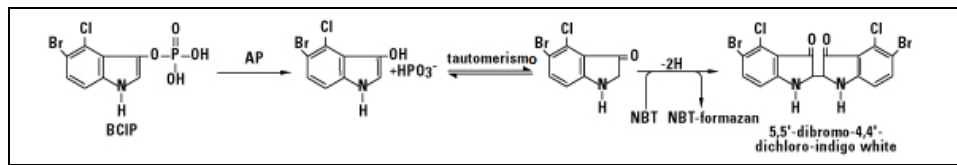


Figura 49. Strips colorate al termine della procedura RDB.

Negli ultimi passaggi, la Streptavidina ha formato un legame con la Biotina e, se nel DNA del campione è presente una sequenza nucleotidica complementare ad uno degli oligo, sulla strip si formerà un “sandwich” tra l’oligonucleotide ed il complesso DNA-Biotina-Streptavidina-AP. Lo sviluppo del colore, invece, è avvenuto grazie all’enzima fosfatasi alcalina, il quale sposta un gruppo fosfato dal colorante NBT (4-nitro-blue-tetrazolium-chloride) al BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate), dando luogo ad un precipitato insolubile di colore blu, in corrispondenza della zona in cui è avvenuta l’ibridazione tra oligo e DNA-campione.

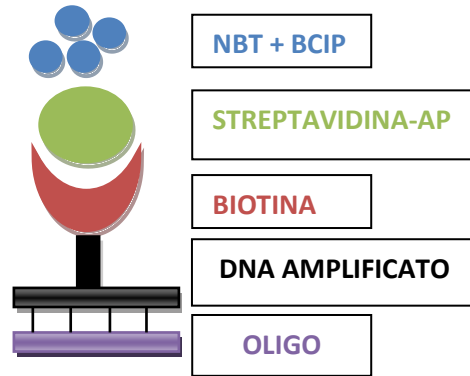
La Streptavidina è una proteina di 60 kDa, purificata, per la prima volta, dal batterio *Streptomyces Avidinii*. La Streptavidina umana tetrameric ha una straordinaria affinità per la Biotina, conosciuta anche come vitamina B7. Il legame che si forma tra loro è una delle più forti interazioni non-covalenti conosciute in natura.

La reazione tra i coloranti NBT e BCIP:



Il legame Biotina-Streptavidina:

Il processo di colorazione:

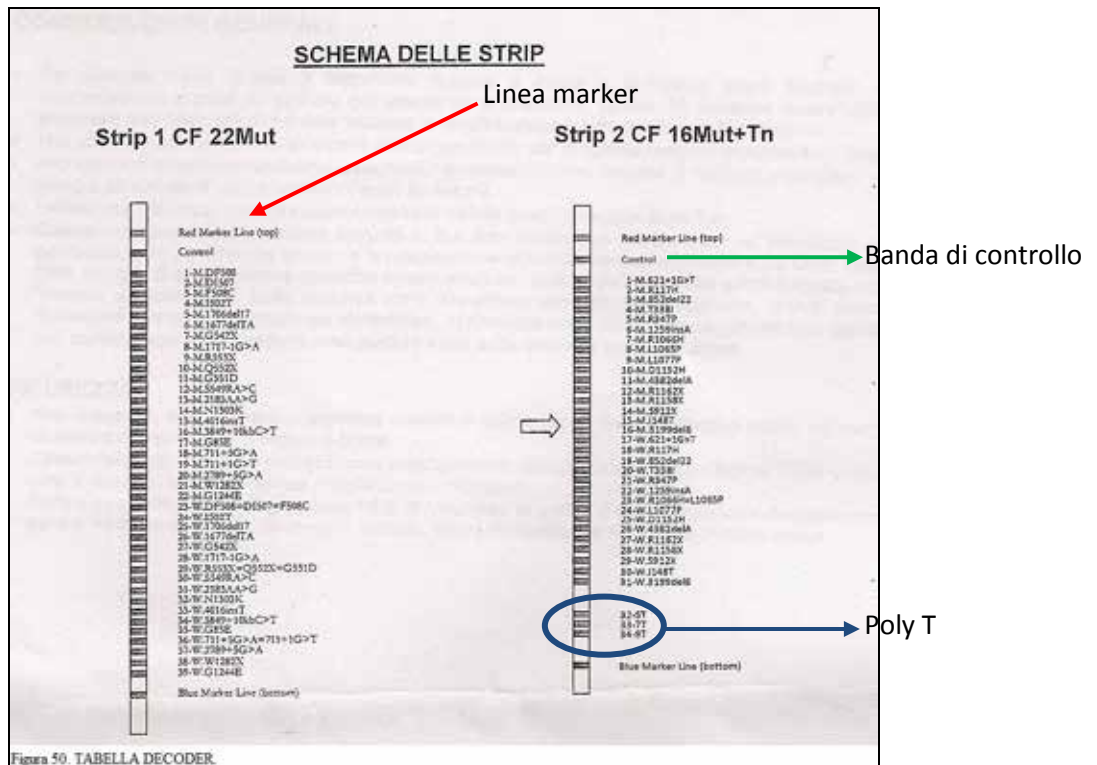


2.5b Interpretazione dei risultati

Per determinare il genotipo di un campione, confrontare la striscia corrispondente con la TABELLA DECODER (fig.50), fornita dal kit.

La linea rossa in alto e la linea azzurra in basso (linee marker) servono da guida per il corretto allineamento tra la striscia e la tabella decoder.

La banda di controllo indica il corretto funzionamento del coniugato e dello sviluppatore del colore e, perciò, deve risultare sempre positiva.



Nella strip 2 si studia anche il polimorfismo polipirimidinico (polyT), di lunghezza variabile, che può presentarsi all'interno dell'introne 8 del gene CFTR. La variabilità si manifesta sotto forma di tre alleli, chiamati 5T, 7T, 9T, a seconda del numero di timine presenti. In particolare, l'allele 5T è associato ai cromosomi mutati dei maschi con CBAVD. Gli alleli 7T e 9T generano un TRASCritto NORMALE, mentre la variante 5T dà luogo ad un trascritto anomalo. Questa ultima variante in omozigosi o in doppia eterozigosi con un'altra mutazione del gene CFTR, rappresenta un forte fattore di rischio di infertilità maschile in quanto può portare all'assenza congenita ,anche bilaterale ,dei vasi deferenti. Esiste un forte linkare disequilibrium tra la mutazione F508del e l'allele 9T. Dall'osservazione delle bande si possono ottenere vari modelli di reattività (tab.7).

Solo la sonda wild type	GENOTIPO NORMALE
Sonda wild type e sonda mutata	GENOTIPO ETEROZIGOTE
Solo la sonda mutata	GENOTIPO OMOZIGOTE MUTATO

Tabella 7. Modelli di reattività.

Inoltre, ove necessario, abbiamo esteso l'analisi molecolare andando a ricercare ulteriori 21 mutazioni genetiche del gene regolatore della conduttanza trans-membrana della Fibrosi Cistica.

Queste ultime mutazioni sono “mutazioni regione specifiche”. Esse sono di seguito riportate:

1259insA, 4016insT, 4382delA, 852del22, D579G, G1244E, G1349D, I502T, L1065P, R1158X, T338I, S549R(A>C), 991del5, D1152H, 1898+3A>G, R1070Q, R1066H, R347H, 621+3A>G, E217G, R334Q.

Alcuni riarrangiamenti genetici coinvolgono le delezioni del gene CFTR e possono spiegare circa il 20% di casi clinici non identificati con le comuni metodologie suddette. Pertanto abbiamo studiato anche 7 delle più importanti macrodelezioni collegate alla malattia: Ex2del; Ex1in del; 22, 23, 24 del; 22, 23 del; 2, 3 del; 17a, 17b, 18 del denominata anche 3120+1kb del (8,6kb); 14b-17b del.

2.6 AMPLIFICAZIONE E RILEVAZIONE DELLE 20 MUTAZIONI REGIONE SPECIFICHE

2.6a Procedura di amplificazione

Eseguire le varie fasi della metodica in ghiaccio od in ambiente refrigerato.

Reattivi necessari:

1. AmpliTaq Gold (Applied Biosystem).
2. Acqua distillata.
3. INNO-LiPA CFTR Amplification Kit.
4. INNO-LiPA CFTR Italian Amplification.

Preparare la Mix come da tabelle seguenti (tab.8 e 9): far scongelare i componenti a T ambiente tranne la Taq Polimerasi che deve rimanere sempre congelata.

I volumi sono riferiti ad 1 campione; tenere conto nel calcolo finale anche di un controllo negativo-acqua- e di un campione extra.

COMPONENTI	VOLUMI
Acqua distillata autoclavata	24.3 μ L
Amplification buffer	10 μ L
INNOLiPA Primer	10 μ L
Taq DNA Polimerasi (5U/ μ L)	0.7 μ L
	Volume totale 45 μL
Tabella 8. Mix CFTR Italian Regional.	

95°C	15 min	
95°C	1 min	x 30
57°C	1 min	
68°C	1 min	
68°C	10 min	
Tabella 9. Profilo di Amplificazione.		

Al termine dell'amplificazione controllare su gel di agarosio al 2% la presenza degli ampliconi e porre nel frigorifero gli amplificati fino al momento della rilevazione.

2.6b Visualizzazione su gel di agarosio al 2%

La presenza del prodotto amplificato può essere verificata su un gel di agarosio al 2%. Dopo aver caricato 10 μ L del prodotto amplificato per pozzetto, si può prevedere il seguente schema (tab.10):

Introne/Esone	Lunghezza (bp)	Bande visibili sul gel
Esone 8	521	Banda 1
Esone 10	491	
Esone 20	473	
Esone 6b	470	
Esone 24	436	Banda 2
Introne 10/Esone 11	425	
Esone 19	411	

Introne 17a/Esone 17b	395	Banda 3 (piuttosto larga)
Esone 18	348	
Esone 21	341	
Esone 7	341	
Esone/Introne 12	331	
Esone/Introne 4	304	
Esone 6a	301	
Esone 22	297	
Tabella 10. Schema degli amplificati.		

2.6c Procedura per l'ibridazione inversa

1. Soluzione Denaturante: aggiungere 10 μ L a ciascuna vaschetta.
2. Campione Amplificato per la Italian Regional: aggiungere 10 μ L alla soluzione denaturante.
3. Incubare per 5 min a T ambiente.
4. Soluzione di Ibridazione: immettere 2 mL della soluzione preriscaldata a 47°C in tutte le vaschette.
5. LiPa strip per la Italian Regional: aggiungere la strip in tutte le vaschette.
6. Incubare a 47°C per 90 minuti in bagnomaria oscillante.
7. Aspirare il liquido dalle vaschette.
8. Lavaggio Stringente: lavare 2 volte per 10-20 secondi con 2 mL della soluzione.
9. Effettuare un terzo lavaggio ed incubare a 47°C per 30 min in un bagnomaria oscillante.
10. Soluzione di Lavaggio: lavare 2 volte per 1 min con 2 mL della soluzione.
11. Soluzione di Coniugato: aggiungere a tutte le vaschette 2 mL della soluzione.
12. Incubare a T ambiente per 30 min su un agitatore orbitale.
13. Soluzione di Lavaggio: lavare le strip per 2 volte con 2 mL della soluzione per 1 min.
14. Tampone Substrato: aggiungerne 2 mL a tutte le vaschette.
15. Incubare a T ambiente per 30 min su un agitatore orbitale.

16. Aspirare il liquido.

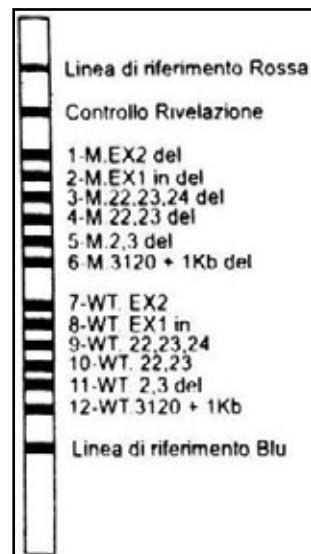
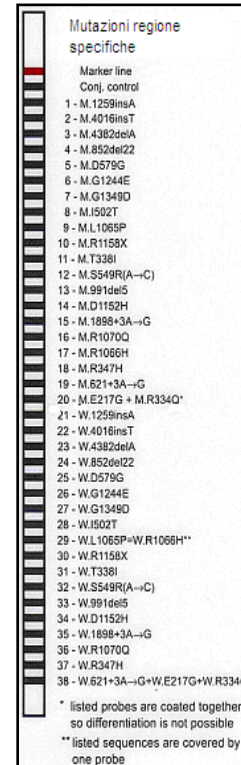
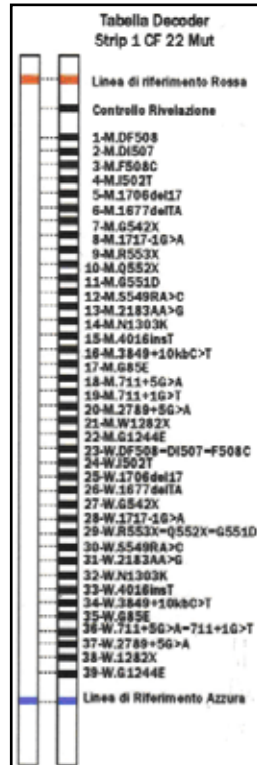
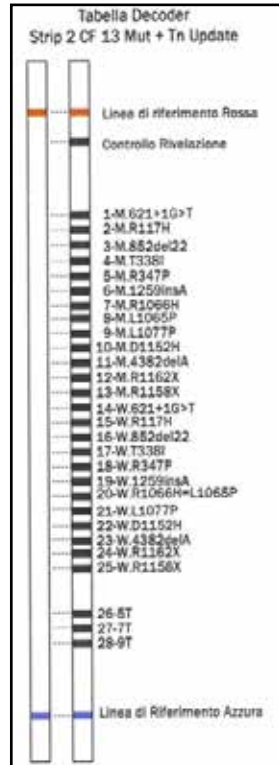
17. Acqua distillata: lavare 2 volte le strip con 2 mL di H₂O distillata per 3 min.

18. Aspirare il liquido dalle vaschette.

19. Rimuovere le strip con una pinzetta.

20. Far asciugare completamente le strip.

21. Leggere i risultati utilizzando le seguenti tabelle DECODER:



I decoder rappresentano le mutazioni che vengono indagate presso il laboratorio di citogenetica e genetica.