

Note Tecniche al LightCycler
Selezione di sonde di ibridazione
per LightCycler

Olfert Landt e Andreas Nitsche, TIB MOLBIOL, Berlino

1. Introduzione

Scopo di questa nota La detezione di “amplicon” specifici con sonde di ibridazione permette una analisi sequenza-specifica del prodotto amplificato. Questa metodologia consente, durante la reazione di amplificazione, di rivelare singole copie nel DNA genomico o identificare mutazioni puntiformi.

Questa nota tecnica fornisce le linee guida per la selezione di sequenze adatte come sonde di ibridazione (Sezione 3). Inoltre, una conoscenza più approfondita del ruolo della sonda permetterà maggiore sicurezza nella selezione delle sequenze (Sezione 2).

Nota: La selezione delle sequenze per l’applicazione LightCycler non è affatto così complessa come la lunghezza del presente fascicolo lascerebbe intendere. Infatti, la maggior parte delle sequenze determinate darà risultati soddisfacenti anche senza seguire particolari regole.

Strumenti per il “design” della sonda Come ulteriore aiuto per la ricerca delle sonde di ibridazione, vengono riportati alcuni software che forniscono supporto nella definizione della sequenza (Sezione 4).

In questa nota Usa questa nota tecnica per apprendere di più sui seguenti argomenti:

Argomento	Vedi pag.
Ruolo delle sonde oligonucleotidiche in analisi sequenza-specifiche	3
Linee guida per disegnare sonde di ibridazione	5
Scelta dei bersagli adatti alle sonde	6
Caratteristiche ottimali per le sonde di ibridazione	7
Considerazioni speciali per la detezione di mutazioni	10
Softwares per il “design” delle sonde di ibridazione	12

2. Ruolo delle sonde di ibridazione in analisi sequenza-specifiche

Generalità

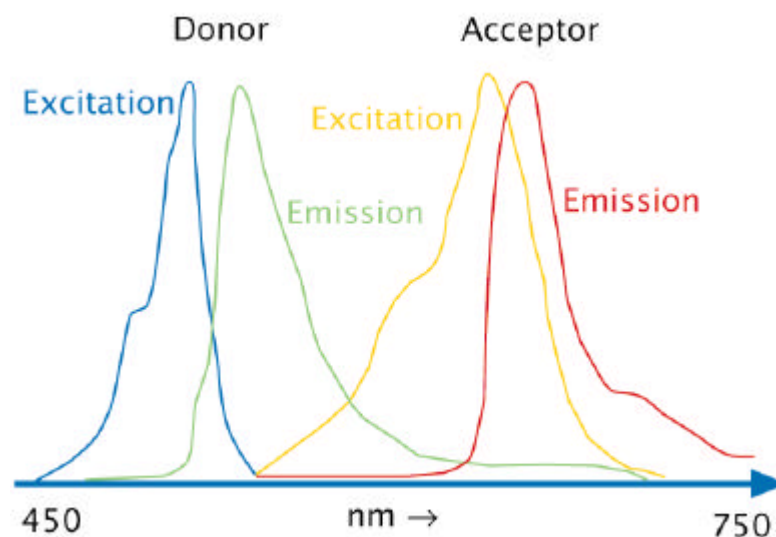
La metodologia delle sonde LightCycler impiega due sonde oligonucleotidiche che ibridano, disposte in maniera testa-coda, su sequenze adiacenti sul DNA bersaglio. Ciascuna sonda viene marcata con un diverso fluorocromo. L'interazione dei due fluorocromi può avvenire solo nel momento in cui le sonde si legano al bersaglio.

Nel momento in cui le sonde sono ibridate al bersaglio, i marcatori fluorescenti si trovano nelle immediate vicinanze e si verifica un trasferimento in risonanza di energia fluorescente (FRET) fra loro.

Trasferimento in risonanza di energia fluorescente (FRET)

Il FRET è un trasferimento di energia dipendente dalla distanza fra due fluorocromi adiacenti senza emissione di un fotone. Condizioni essenziali perché avvenga il FRET sono:

- la molecola accettore e donatore devono molto vicine.
- lo spettro di eccitazione dell'accettore deve sovrapporsi allo spettro di emissione del donatore (vedi figura sotto).
- l'orientamento dei dipoli di transizione del donatore e dell'accettore devono essere approssimativamente paralleli.

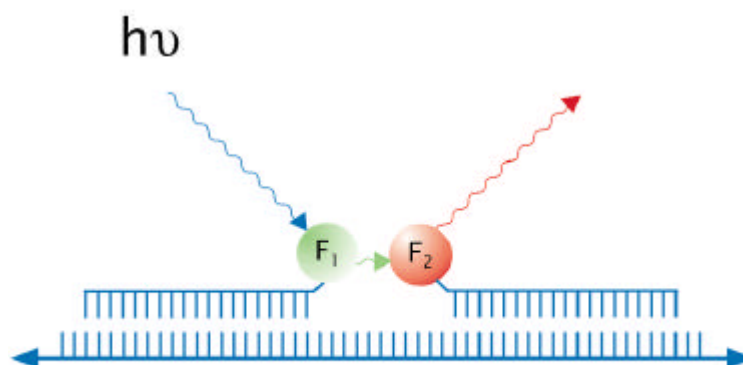


Continua

2. Ruolo delle sonde di ibridazione in analisi sequenza-specifiche, Continua

FRET con sonde di ibridazione

La figura descrive come due sonde oligonucleotidiche adiacenti producano una emissione fluorescente misurabile.



Durante il momento di "annealing" della PCR, due diversi oligonucleotidi ibridano, testa-coda, su regioni adiacenti del DNA bersaglio. I fluorocromi coniugati alle sonde vengono a trovarsi molto vicino nella struttura dell'ibrido. Il fluorocromo donatore "F1" (e.g. Fluoresceina) viene eccitato da una sorgente esterna di luce, trasferisce parte della propria energia di attivazione all'adiacente accettore "F2" (e.g. LightCycler-Red 640 o 705) mediante interazioni dipolo-dipolo (FRET). Il fluorocromo eccitato F2 emette luce misurabile.

3. Linee guida per disegnare sonde di ibridazione

Introduzione Consigliamo di seguire le seguenti linee guida per una determinazione ottimale delle vostre sonde/sequenze bersaglio.

Linee guida per disegnare qualsiasi sonda di ibridazione Le linee guida valide per tutte le sonde di ibridazione (sia quelle per la quantificazione, che quelle per l'analisi di mutazione) sono riassunte nella tabella seguente. Ogni indicazione viene discussa con maggiore dettaglio più avanti in questa nota tecnica.

Considerando...	tenere presente queste linee guida	Per i dettagli, vedere
le sequenze bersaglio	<ul style="list-style-type: none"> • localizzate verso l'estremità 3' del DNA campione • situate in una regione a sequenza "bilanciata" (con una distribuzione appross. uguale delle quattro basi), non essere auto-complementari, monotone o ripetitive 	Section 3.1
le sonde	<ul style="list-style-type: none"> • molto vicine una all'altra (da 1 a 5 basi) • non contengano: <ul style="list-style-type: none"> – sequenze ripetitive, monotone o auto-complementari – Clusters di G e C ad entrambe le estremità – sequenze estremamente ricche in purine • non dovrebbero ibridizzare con i primer per PCR • modificati in maniera da non poter essere elongati durante la PCR • avere temperature di melting superiori di 5-10°C a quelle dei primers • donatore, marcata a 3' con Fluoresceina (FITC) • accettore, marcata a 5' con LightCycler-Red 640 o 705 	Section 3.2

Considerazioni speciali per l'analisi di mutazione Oltre ai sopra menzionati accorgimenti, validi per tutte le sonde, si consiglia di osservare le linee guida discusse nella Sezione 3.3

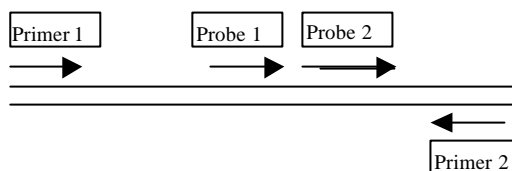
3.1. Scelta dei bersagli adatti alle sonde

Introduzione

Si consigliano le seguenti linee guida per la scelta delle sequenze bersaglio adatte per sonde di ibridazione

Localizzazione del bersaglio della sonda

Il bersaglio della sonda dovrebbe essere vicino al 3' del DNA campione (il più lontano possibile dal sito di legame del primer a 5'). Raccomandiamo di selezionare un bersaglio che sia vicino ma non sovrapposto al sito di legame del primer a 3' (vedi schema seguente). Questa disposizione consente che vengano effettuate le misurazioni della fluorescenza prima che i primers siano completamente estesi e prima che le sonde vengano eliminate dalla Taq polimerasi.



Sequenze adatte quali bersaglio

Le sequenze bersaglio dovrebbero presentare le seguenti caratteristiche:

Caratteristica	Spiegazione
Situate in regioni a sequenza "bilanciata" (circa uguale distribuzione delle quattro basi)	Le sequenze "bilanciate" ibridano con le sonde.
Non contengono sequenze monotone o ripetitive	Queste sequenze offrono siti di legame instabili
Non sono auto-complementari	Queste sequenze possono formare loop e, per questo, essere meno accessibili all'ibridazione

3.2. Caratteristiche ottimali per le sonde di ibridazione

Introduzione Seguono alcune indicazioni utili nel disegnare sonde di ibridazione.

Linee guida generali per la sequenza Disegnando le sonde, occorre evitare sequenze che possono causare problemi di ibridazione:

Evitare queste sequenze...	Poiché possono causare questi problemi
Sequenze ripetitive o monotone Sequenze auto-complementari	Possono destabilizzare il legame della sonda <ul style="list-style-type: none"> • Possono formare “loop”, riducendo la disponibilità di sonda e, quindi, di segnale. • Se le sonde ibridano l’una all’altra, possono generare un segnale costante, indipendente dalla quantità di prodotto amplificato generato.
Cluster di G e C alle estremità della sonda	La sonda può legarsi troppo stabilmente al DNA bersaglio
Sonde molto ricche in purine (G e A)	Tendono a ibridare scarsamente
Sequenze che possono ibridare con l’estremità 3’ dei primer di PCR	Possono formare dei dimeri primer-sonda. ¹ <i>Nota:</i> dal momento che le sonde sono presenti in quantità relative elevate all’inizio della reazione, è elevato il rischio di questo problema.

1 Per ulteriori informazioni su come evitare la formazione di dimeri primer-sonda (e dimeri dei primer), vedere Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. 1/99.

Continua

3.2. Caratteristiche ottimali per le sonde di ibridazione,

Continua

Temperatura di melting della sonda Disegnando le sonde, consigliamo di seguire le seguenti linee guida allo scopo di ottenere temperature di melting adatte (T_m).
Note: Per informazioni sui software che effettuano questo calcolo, vedere la Sezione 4.

Linee guida per le T_m della sonda	Commento
Le T_m delle sonde dovrebbero essere almeno 5°-10°C sopra quelle dei primer.	Questo concede alle sonde più tempo per legarsi prima di essere spiazzate dalla polimerasi. Spiegazione: per generare il segnale, le due sonde devono essere contemporaneamente legate al DNA bersaglio. Perché ciò accada, le sonde devono competere con i primer di amplificazione per il legame. In questa competizione, esse risultano decisamente svantaggiate, in quanto: <ul style="list-style-type: none"> • Le sonde di ibridazione sono presenti ad una concentrazione inferiore a quella dei primer • Non appena i primer si legano, vengono immediatamente elongati. La sequenza bersaglio dell'ibridazione viene rapidamente coperta dal filamento neosintetizzato, anche a temperature inferiori a 72°. Nota: Per superare questo problema, la T_m delle sonde deve essere maggiore di quella dei primer.
Evitare di disegnare sonde troppo stabili ($T_m > 10^\circ - 20^\circ\text{C}$ maggiore delle T_m dei primer).	Sonde troppo stabilmente legate possono interferire con la reazione di amplificazione e diminuire la sensibilità del saggio.
Imposta la T_m della sonda secondo l'applicazione per cui sarà usata (quantificazione o analisi di mutazione).	<ul style="list-style-type: none"> • Per la quantificazione, le due sonde dovrebbero avere approssimativamente la stessa T_m. • Per l'analisi di mutazioni, la T_m della sonda sensore dovrebbe essere inferiore a quella della sonda ancora (vedere la Sezione 3.3 per i dettagli).

Continua

3.2. Caratteristiche ottimali per le sonde di ibridazione,

Continua

Scelta dei marcatori fluorescenti

Le estremità adiacenti delle sonde di ibridazione devono essere marcate con fluorocromi. La seguente tabella riporta gli appropriati marcatori da scegliere.

Per questa sonda	Marcare questa estremità	Con questo fluorocromo
Sonda 1 ("donatore" o sonda 5')	3'	Fluoresceina (FITC, 3FL)
Sonda 2 ("accettore" or sonda 3')	5'	<ul style="list-style-type: none"> • LightCycler-Red 640, o • LightCycler-Red 705

Avvertenze sui marcatori delle sonde:

- Non invertire la posizione dei marcatori fluorescenti sulle sonde. Per esempio, non marcare la sonda 1 (5') con il LightCycler-Red e la sonda 2 (3') con Fluoresceina
- A causa delle proprietà dell'unità ottica, solo i derivati FITC della Fluoresceina (contenenti un legame zolfo) producono i risultati desiderati con LightCycler.

Evitare l'estensione della sonda

Poiché le sonde presentano una T_m più elevata di quella dei primer di amplificazione, le sonde stesse possono funzionare come primer per la polimerizzazione. Per evitare l'estensione delle sonde durante la PCR, è necessario fosforilare l'estremità 3' della sonda accettore (la sonda marcata con LightCycler-Red a 5'; vedi sopra).

Nota: L'estremità 3' della sonda donatore viene marcata con Fluoresceina (vedi sopra), quindi non può essere estesa durante la PCR.

Lasciare un intervallo fra le sonde ibridate

Una volta legate al bersaglio, le sonde di ibridazione devono collocarsi sufficientemente vicino da permettere almeno il trasferimento del 50% dell'energia fra i due fluorocromi. Idealmente, si permette un intervallo da 1 a 5 basi fra il 3' della sonda 1 (donatore) ed il 5' della sonda 2 (accettore). Questo spazio è necessario per l'ingombro dei fluorocromi.

Raccomandazione: Per le prove preliminari, si consiglia di lasciare un intervallo di 1 base fra loro.

3.3. Considerazioni speciali per la detezione di mutazioni

Introduzione Quando le sonde di ibridazione sono impiegate per la detezione di mutazioni, ciascuna ha un ruolo particolare. La sonda sensore copre il sito previsto per la mutazione, mentre la sonda accettore produce il segnale fluorescente. Consigliamo di seguire le linee guida discusse in questa sezione nel disegnare sonde per la detezione di mutazioni.

Sequenza della sonda sensore La sequenza di una sonda sensore per la detezione di mutazioni può sia riconoscere la sequenza “wild type” (non mutata) oppure riconoscere la sequenza mutata. Ognuna viene impiegata in diversi modi:

- Negli esperimenti preliminari, si consiglia di utilizzare una sonda sensore con sequenza esattamente complementare al “wild type” per rilevare le varianti mutate della sequenza in esame.

Nota: Nella maggior parte dei casi, un singolo “mismatch” fra il bersaglio mutato e la sonda sensore causa uno slittamento di circa 5°-8°C della T_m dell’ibrido sonda-sensore-mutato rispetto a quella dell’ibrido con il “wild type”.
- Si usa una sonda sensore che è complementare alla sequenza mutata per:
 - confermare l’esistenza di una mutazione identificata con sonda “wild type” (vedi sopra), e
 - eliminare la possibilità che un’altra sequenza variante si presente nel campione.

Nota: alcune frequenti mutazioni possono essere inizialmente identificate con un’asonda mutazione-specifica. In ogni caso, non tutti i bersagli che portano una seconda meno frequente mutazione possono essere identificati in questo modo.

Attenzione: Disegnando una sonda sensore per riconoscere le mutazioni, si può posizionare la base mutata sia nel centro sia verso una delle estremità della sonda. Comunque, si sconsiglia di posizionare la base mutata nelle ultime due basi della sonda.

Ottimizzazione delle sonde per l’analisi di mutazione In alcuni casi, l’ibridazione fra DNA mutato e sonda può essere migliorata in uno dei seguenti modi:

- Facendo riconoscere alla sonda la sequenza complementare al sito mutato.
- Slittando di qualche base la sequenza bersaglio riconosciuta dalla sonda.
- Aggiungendo arbitrariamente basi “errate” (“mismatch”) nella sonda, allo scopo di ridurre eventuali legami troppo forti nelle adiacenze della mutazione.

Continua

3.3. Considerazioni speciali per la detezione di mutazioni,

Continua

Temperature di melting di sonde per l'analisi di mutazione

Come riportato in Sezione 3.2, la T_m di qualsiasi sonda di ibridazione dovrebbe essere maggiore della T_m dei primer di PCR. Inoltre, se le sonde vengono usate per l'analisi di mutazione, la relazione fra le T_m delle due sonde di ibridazione deve essere la seguente:

$$T_m \text{ sonda sensore} < T_m \text{ sonda ancora}$$

Spiegazione: Questo assicura che la sonda che copre il sito mutato (sonda sensore) controlli la generazione del segnale fluorescente. Inoltre compensa qualsiasi errore nel calcolo delle T_m .

Nota: Per assicurarsi che la sonda sensore abbia una T_m inferiore a quella della sonda ancora, si consiglia di:

- disegnare una sonda ancora più lunga della sonda sensore, o
 - far sì che la sonda ancora abbia un maggiore contenuto in G e C.
-

Prevenire la formazione di dimeri primer-sonda alterando i primer e non le sonde

Per evitare la formazione di dimeri primer-sonda, è necessario far sì che la sequenza della sonda di ibridazione non complementi, anche in parte, la sequenza del primer. Comunque, nel caso di sonde per l'analisi di mutazione, può non essere possibile alterare le sequenze scelte per le sonde. In questi casi, conviene modificare la sequenza del primer piuttosto che quella della sonda. In molti casi, si può evitare la formazione di dimeri primer-sonda semplicemente aggiungendo una base o togliendo la base finale dei primer di PCR

4. Software per il “design” delle sonde di ibridazione

Introduzione

Sono disponibili alcune applicazioni come supporto per la definizione delle sequenze per le sonde di ibridazione. Questa sezione fornisce una breve panoramica di questi programmi.

Software per selezionare le sequenze delle sonde

- Vi sono molti software disponibili per la definizione di primer per PCR (alcuni riportati nella Sezione 2.3.2, Capitolo C del *LightCycler Operator's Manual*). Alcuni di essi possono essere impiegati anche per disegnare sonde di ibridazione.
- Se si conduce un'analisi di sequenza senza l'aiuto di un sofisticato pacchetto software, ci si può accorgere che la funzione “Trova” di un wordprocessor come Microsoft Word sia già qualcosa di utile. In questo caso, si consiglia di cercare le ultime quattro basi della sequenza bersaglio (o della sua complementare) all'interno della sequenza dell'amplificato o della sonda.

Software per calcolare le temperature di melting delle sonde

Per il calcolo delle T_m di primer e sonde, consigliamo vivamente l'impiego di un programma in grado di eseguire algoritmi termodinamici, ad es. un programma che tenga conto delle distribuzioni delle basi e non solo del contenuto in G e C. Tre eccellenti programmi sono:

- OLIGO, Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA (<http://oligo.net>), o MedProbe, Oslo, Norway (www.medprobe.com)
- Il Programma (JAVA script) disponibile da TIB MOLBIOL, Berlino, Germania (www.TIB-MOLBIOL.de/oligo_ag.html)
- On-line oligonucleotide T_m calculator (<http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>)

Nota: Si può anche accedere a questo calcolatore di T_m dalla pagina web del Virtual Genome Center (<http://alces.med.umn.edu/VGC.html>).

Cautele sui valori delle T_m calcolate

I valori di T_m calcolate con questi programmi sono ragionevolmente accurati (errore $1^\circ - 2^\circ\text{C}$). In ogni caso, come mostrato nella tabella seguente, bisogna prestare attenzione a come applicare i dati al proprio sistema di sonde.

Operazione	Potenziale problema	Soluzione suggerita
Comparando i valori delle T_m di sonde e primer	Ciascun programma assume differenti parametri di concentrazione di DNA e sali.	Comparare solo le T_m ottenute con lo stesso programma.
Determinando le temperature di annealing per sonde e primer	<ul style="list-style-type: none"> • Le T_m calcolate non corrispondono alle temperature di annealing. • Il legame del primer si verifica generalmente a temperature molto più elevate di quelle delle T_m calcolate (poiché i primer sono in eccesso). 	Per ottimizzare la reazione, determinare le reali temperature di annealing: <ul style="list-style-type: none"> • Per i primer, usare un “gradient thermal cycler”. • Per le sonde di ibridazione, usare il LightCycler Melting Curve Analysis Module.

