

Analisi del metiloma

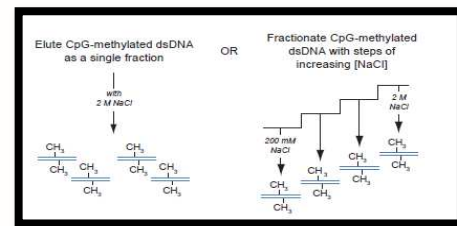
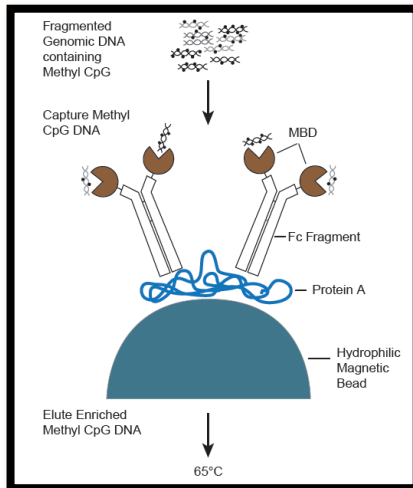
Obiettivi

La metilazione del DNA è un processo biochimico fondamentale per il normale sviluppo dell'organismo e per la differenziazione cellulare negli organismi superiori. Nei tessuti adulti la metilazione avviene a livello del dinucleotide CpG, raggruppati in isole (CpG islands) al 5' di regioni regolatorie, in CpG shores (<2Kb fiancheggianti le isole), e in CpG shelves (<2kb dagli shores). La distribuzione delle citosine metilate nel genoma ha un ruolo epigenetico di controllo dell'espressione genica e l'alterazione del livello di metilazione del DNA (iper o ipometilazione) è coinvolta in diversi processi alla base di cancro, senescenza cellulare, malattie genetiche, invecchiamento.

Procedura

La fase di arricchimento delle regioni metilate può essere messa a punto e realizzata nel laboratorio del cliente, oppure su richiesta da Genomnia. Mandatorio è che Genomnia riceva il DNA arricchito per regioni metilate in forma di DNA a doppio strand (dsDNA) compatibile con la costruzione delle librerie di frammenti Ion Torrent. Il personale di GENOMNIA è a disposizione per aiuto e consigli tecnico-scientifici.

Il metodo scelto da Genomnia è indicato come methyl-CpG binding domain (MBD) e focalizza il sequenziamento solo su zone interessate dal processo di metilazione o non sull'intero genoma. L'immagine sottostante è un esempio esplicativo di quanto detto.



Il metodo MBD pull-down sfrutta le proprietà del dominio proteico MBD posseduto da varie proteine naturali componenti della cromatina, per catturare le regioni di DNA che posseggono le citosine del dinucleotide CpG metilate.

In particolare, come mostrato nell'immagine, il sistema da noi scelto utilizza il dominio MBD della proteina umana MBD2 fuso alla coda Fc della IgG1 umana. Quest'ultima è a sua volta accoppiata alla proteina A legata a biglie idrofiliche paramagnetiche. Dato che il frammento Fc è un dimero e che due domini Fc possono legarsi ad una molecola di proteina A, quattro domini MBD2 sono esposti al solvente per molecola di proteina A, aumentando l'affinità di legame a molecole metilate.

Il DNA genomico viene inizialmente ridotto in frammenti di dimensione di 50-500 bp, con picco intorno alle 200 bp, e successivamente le regioni CpG metilate vengono stabilmente e selettivamente catturate dalla procedura descritta sopra. Il DNA a doppio filamento arricchito è quindi eluito in un piccolo volume di H₂O tramite incubazione a 65°C e utilizzato per produrre una libreria di frammenti. Il sequenziamento è realizzato su piattaforma Ion Torrent S5, con reads da 200 bp e una profondità di circa 20 milioni di reads per campione.

Quantità di campione necessaria

Le quantità riportate sono indicative e dipendono anche dalla resa del protocollo scelto di arricchimento. Le quantità minime riportate nella tabella possono essere base di discussione per ottimizzare condizioni sperimentali particolarmente critiche.

Materiale di partenza	Quantità (ng)
DNA genomico	500 - 5000
DNA arricchito in zone metilate (MBD)	10 - 100

Analisi Bioinformatica

L'analisi bioinformatica di esperimenti di metilazione è disponibile in due livelli diversi.

Nell'analisi bioinformatica di primo livello [MBD-BF01], dapprima allineiamo le sequenze al genoma di riferimento ed elaboriamo le statistiche di mappaggio. Generiamo metriche di qualità e diagnostiche di arricchimento in formato testuale e grafico ed identifichiamo tramite una procedura proprietaria basata sul pacchetto analitico Bioconductor MEDIPS le regioni genomiche metilate. Elaboriamo anche regioni differenzialmente metilate in concordanza alle comparazioni associate al progetto. Viene poi eseguita una annotazione a livello di struttura genica delle regioni differenzialmente metilate, seguita dall'analisi funzionale dei geni differenzialmente metilati.

Nell'analisi bioinformatica di secondo livello [MBD-BF02], eseguiamo tutte le analisi descritte in MBD-BF01. In aggiunta, stimiamo la metilazione delle sequenze trasponibili ad elevata ridondanza (LINE, SINE) e conduciamo un'analisi differenziale di metilazione nelle famiglie di repeat seguendo le comparazioni associate al progetto.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. Catalogo
QC: Controllo di qualità e dimensioni di DNA MBD/CHIP arricchito	DNA05
QC: controllo di qualità di preparazioni di DNA	DNA06
Arricchimento per MBD da DNA genomico	MBD
Preparazione di libreria DNA con codice a barre	LDb
Sequenziamento forward 200 bp tags con codice a barre	SEQI200B
Analisi Bioinformatica Metilazione	MBD-BF01
Analisi Bioinformatica Metilazione (avanzata)	MBD-BF02