

EuroClone: guida al mondo dell'epigenetica

Cos'è l'Epigenetica?

L'epigenetica studia le modificazioni del DNA e delle proteine DNA-associate, non a carico della sequenza nucleotidica, ma coinvolte nella modulazione dell'attivazione genica.

Queste modificazioni cambiano la struttura della cromatina, il complesso costituito dal DNA e dagli istoni, possono essere stabili ed ereditabili e sono coinvolte anche nella regolazione dello sviluppo embrionale, del differenziamento cellulare e in diverse patologie.

I meccanismi con effetti epigenetici sono molteplici:

- ▶ metilazione e idrossimetilazione del DNA
- ▶ modificazione post-traduzionali degli istoni
- ▶ rimodellamento della cromatina
- ▶ microRNA e Long non coding RNAs



Metilazione e Idrossimetilazione del DNA

Le Citosine del DNA possono essere metilate a opera delle DNA metiltransferasi. La metilazione reprime l'espressione genica e regola il differenziamento cellulare e lo sviluppo. Lo stato di metilazione è inoltre usato come biomarker per molte patologie umane, incluso il cancro. Studi recenti analizzano l'idrossimetilazione del DNA, presente in forma di 5-idrossimetilcitosina (5-hmC) in molti organismi. Gli alti livelli riscontrati nel tessuto nervoso di uomo e topo rappresentano un potenziale fattore epigenetico nel rinnovamento cellulare, nello sviluppo e progressione di tumori e nei disordini neurologici.

Le modificazioni post traduzionali degli istoni e il rimodellamento della cromatina

L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, un core proteico istonico, attorno a cui è avvolta l'elica di DNA. Gli istoni (H2A, H2B, H3 e H4) sono strutture dinamiche soggette a modificazioni post-traduzionali e all'interazione con proteine regolatorie e controllano la struttura cromatinica e l'espressione genica:

- ▶ L'acetilazione della lisina riduce la carica positiva degli istoni, indebolisce la loro interazione con il DNA e aumenta la "fluidità" del nucleosoma.
- ▶ La metilazione non sembra avere un ruolo attivo nell'interazione tra nucleosomi, ma i residui di metil-lisina sono un sito di legame per enzimi in grado di attivare o bloccare la trascrizione.
- ▶ Residui di acetil-lisina reclutano complessi trascrizionali, così come la metilazione dell'arginina sugli istoni H3 e H4.

microRNA e Long Non Coding RNAs (lncRNA)

I miRNA (~22 nt) e i lncRNA (> 200 nt) sono RNA non codificanti, coinvolti in processi epigenetici a livello di rimodellamento della cromatina. I miRNA, altamente conservati evolutivamente e tessuto-specifici, regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale e controllano circa il 60% dei geni codificanti nei mammiferi. I lncRNA, localizzati a livello nucleare e meno conservati, sono coinvolti nella trascrizione e in meccanismi post-trascrizionali cellula- e tessuto-specifici, quali lo splicing e la traduzione. Sia i miRNA che i lncRNA sono inoltre implicati nell'invecchiamento e in un elevato numero di patologie quali disordini cardiaci, neurologici e oncogenesi.

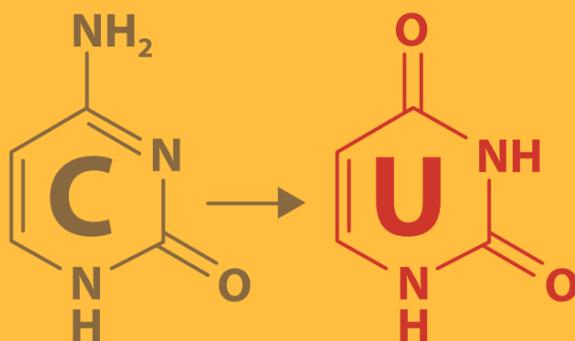
Analisi della metilazione e idrossimetilazione del DNA

La conversione con bisulfite è il "gold standard" per lo studio della metilazione del DNA.

Zymo Research fornisce kit ad alta resa per la rapida conversione delle Citosine non metilate in Uracile: il DNA bisulfite-treated purificato, è utilizzato per l'analisi qualitativa/quantitativa della metilazione con le più svariate applicazioni (PCR, MSP, NGS, etc).

Zymo Research è la prima ad offrire kit dedicati all'idrossimetilazione del DNA: questa modificazione epigenetica, la "sesta base", è quantificabile mediante trattamento con endonucleasi idrossimetil-sensibili, seguito da PCR, sequenziamento, NGS, etc.

Disponibili anche kit per la preparazione di library NGS per lo studio di metilazione e idrossimetilazione.

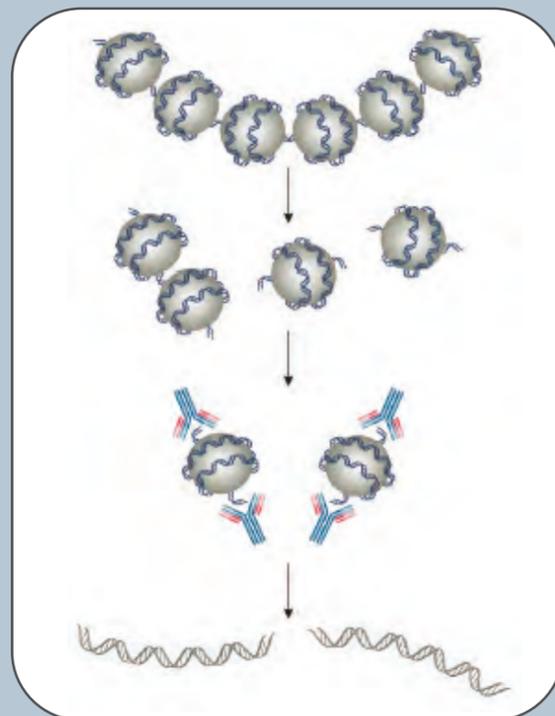


Chromatin Immunoprecipitation ChIP E ChIP Seq

L'immunoprecipitazione della cromatina consente di identificare regioni con modificazioni istoniche e siti di legame per fattori di trascrizione.

I complessi covalenti DNA-proteine, adeguatamente frammentati, sono immunoprecipitati con anticorpi specifici per modificazioni istoniche o per fattori di trascrizione. Dopo purificazione, il DNA precipitato può essere analizzato mediante PCR nel caso di analisi di geni o promotori noti, o con Next Generation Sequencing (ChIP Seq) per identificare nuove sequenze target.

Il successo di un esperimento di ChIP dipende dall'integrità della cromatina, dalla qualità dell'epitopo e dalla specificità degli anticorpi utilizzati (target e controllo).



EuroClone ha una gamma completa di prodotti per ChIP e ChIP Seq:

▶ Kit per ChIP con digestione enzimatica della cromatina

Cell Signaling Technology ha sviluppato kit per ChIP basati sulla digestione enzimatica della cromatina. La nucleasi micrococcica, frammentando la cromatina in modo più delicato e controllabile rispetto alla sonicazione, protegge l'integrità delle proteine e del DNA ed è quindi ideale anche per lo studio di interazioni meno stabili. L'anticorpo anti-istone H3 è il controllo positivo incluso nel kit.

▶ Anticorpi validati per ChIP e coppie di primer di controllo per PCR

Cell Signaling Technology valida rigorosamente ogni anticorpo per la specificità, l'assenza di cross-reattività e un livello di sensibilità che consente l'analisi di interazioni rare o poco stabili. Per ogni anticorpo validato per ChIP sono disponibili primer di controllo per regioni di DNA con siti di legame per la proteina target.

▶ ChIP-Seq

NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® di New England Biolabs è un kit validato in formato master mix, per la preparazione di library per Next Generation Sequencing su DNA immunoprecipitato con la cromatina.

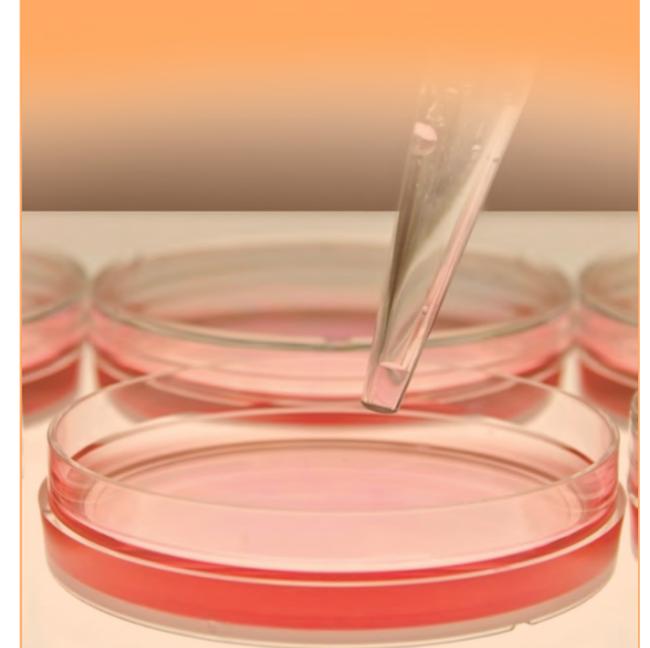
Disponibili da NEB anche istoni ricombinanti, DNA metiltransferasi, kit per l'arricchimento di DNA metilato ed enzimi di restrizione sensibili alla metilazione.

Analisi dei ncRNA: miRNA e lncRNA

Qiagen propone diverse soluzioni per l'analisi qualitativa e quantitativa di miRNA e lncRNA, garantendo massima specificità e sensibilità grazie all'impiego di oligo ad LNA®.

La tecnologia LNA® consente il profiling mediante diversi approcci (qPCR, array, NGS) e si applica anche a studi funzionali con Mimic e Inhibitor, disponibili anche nel formato *in vivo*.

Qiagen offre anche service di profiling mediante array, qPCR e NGS, con un attento supporto scientifico e dati di qualità elevata.



EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit - Zymo Research

Gold standard per bisulfite-conversion

- ▶ Recupero del DNA >80%
- ▶ Efficienza di conversione >99.5%
- ▶ Input DNA: 100 pg - 2 µg (200 - 500 ng per risultati ottimali)

Cat. ZYD5030/ZYD5031	EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit	50/200 reaz
----------------------	-----------------------------------	-------------

Quest 5-hmC Detection Kit™ - Zymo Research

Kit specifico, affidabile e a singolo tubo per la rilevazione di 5-hmC

Cat. ZYD5410/ZYD5411	Quest 5-hmC Detection Kit™	25/50 reaz
----------------------	----------------------------	------------

Pico Methyl-Seq™ Library Prep Kit - Zymo Research

Kit per Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) senza ligazione e corsa su gel

- ▶ Input DNA: 10 pg; compatibile con campioni FFPE

Cat. ZYD5455/ZYD5456	Pico Methyl-Seq™ Library Prep Kit	10/25 reaz
----------------------	-----------------------------------	------------

RRHP™ 5-hmC Library Prep Kit - Zymo Research

- ▶ Kit basato su Reduced Representation Hydroxymethylcytosine Profiling (RRHP)
- ▶ Input DNA: ≥100 ng

Cat. ZYD5450/ZYD5451	RRHP™ 5-hmC Library Prep Kit	12/25 reaz
----------------------	------------------------------	------------

Kit per ChIP con digestione enzimatica e anticorpi validati per ChIP - Cell Signaling Technology

- ▶ Kit completi per ChIP con digestione enzimatica su campioni di cellule e tessuti
- ▶ Disponibili in versione Protein G - agarose o magnetic beads (ideale per ChIP Seq)

Cat. BK9004S	Simple® ChIP Plus Chromatin IP kit (Agarose Beads)	30 IP
Cat. BK9005S	Simple® ChIP Plus Chromatin IP kit (Magnetic Beads)	30 IP

Sul sito CST l'elenco degli anticorpi validati per ChIP e le coppie di primer da utilizzare come controllo: www.cellsignal.com/chipab

Anticorpi per lo studio delle regolazioni epigenetiche - Cell Signaling Technology

Sul sito www.cellsignal.com la gamma completa degli anticorpi disponibili per lo studio delle modificazioni istoniche e dei regolatori epigenetici. Gli anticorpi sono forniti con un protocollo ottimizzato per ognuna delle applicazioni validate.

NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® - New England Biolabs

Library prep per Chip-Seq su piattaforma Illumina®

- ▶ Alta resa e sensibilità: 5 ng - 1 µg di DNA
- ▶ Protocollo facile e rapido grazie al formato Master Mix: 2,5 - 3 ore
- ▶ GC bias minimizzato grazie all'utilizzo di un enzima High-Fidelity (NEBNext PCR Master Mix)
- ▶ Adattatori in grado di legarsi con maggiore efficienza grazie alla struttura a hairpin loop, unica per i kit NEBNext
- ▶ Sistema a moduli, disponibili anche separatamente

Cat. BE7370S/L	NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®*	24/96 reaz
Cat. BE7335S/L	NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers 1-12)**	24/96 reaz

*Index primer non inclusi - **Altri set disponibili

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR - Exiqon

- ▶ Tecnologia LNA™, brevettata da Exiqon per analisi di miRNoma (uomo, topo e ratto) e di singoli miRNA
- ▶ Pannelli pre-designed (Focus Panel) o personalizzati (Pick & Mix)

Cat. EX203301	miRCURY LNA™ microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II	8-64 reaz
Cat. EX309080	Random primers for mRNA and ncRNA	32 reaz
Cat. EX203XXX	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, 752 miRNAs plus controls*	4 pannelli

*Elenco completo dei pannelli miRNoma, Focus Panel e lista dei singoli primer set al seguente link: <http://www.exiqon.com/mirna-pcr>

LncRNA Profiler qPCR Array Kit - System Biosciences

- ▶ Piastre pre-spottate per il profiling in qPCR di 90 LncRNA umani o murini
- ▶ Possibilità di profiling strand-specifico dei LncRNA

Cat. SBRA900A1	Human LncRNA Profiler qPCR Array Kit (cDNA synthesis kit and qPCR array)	20 profili
Cat. SBRA930A1	Mouse LncRNA Profiler qPCR Array Kit (cDNA synthesis kit and qPCR array)	20 profili

EuroClone S.p.A.

Via Figino, 20/22 • 20016 Pero (MI) Italy • ☎ +39 02 38195.1 • 📠 +39 02 38101465 • ✉ info@euroclone.it • www.euroclone.it

Quality Management Systems certified according to ISO 9001 and ISO 13485 international standards