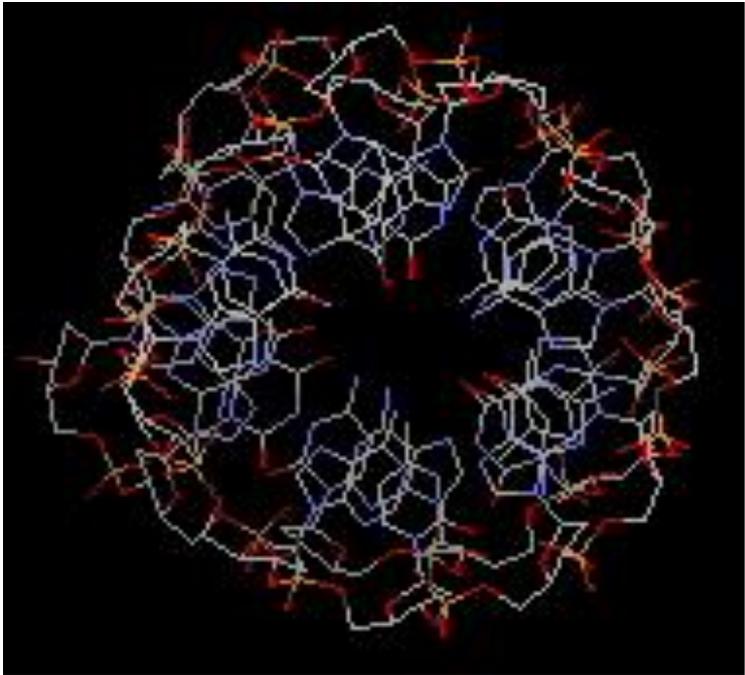
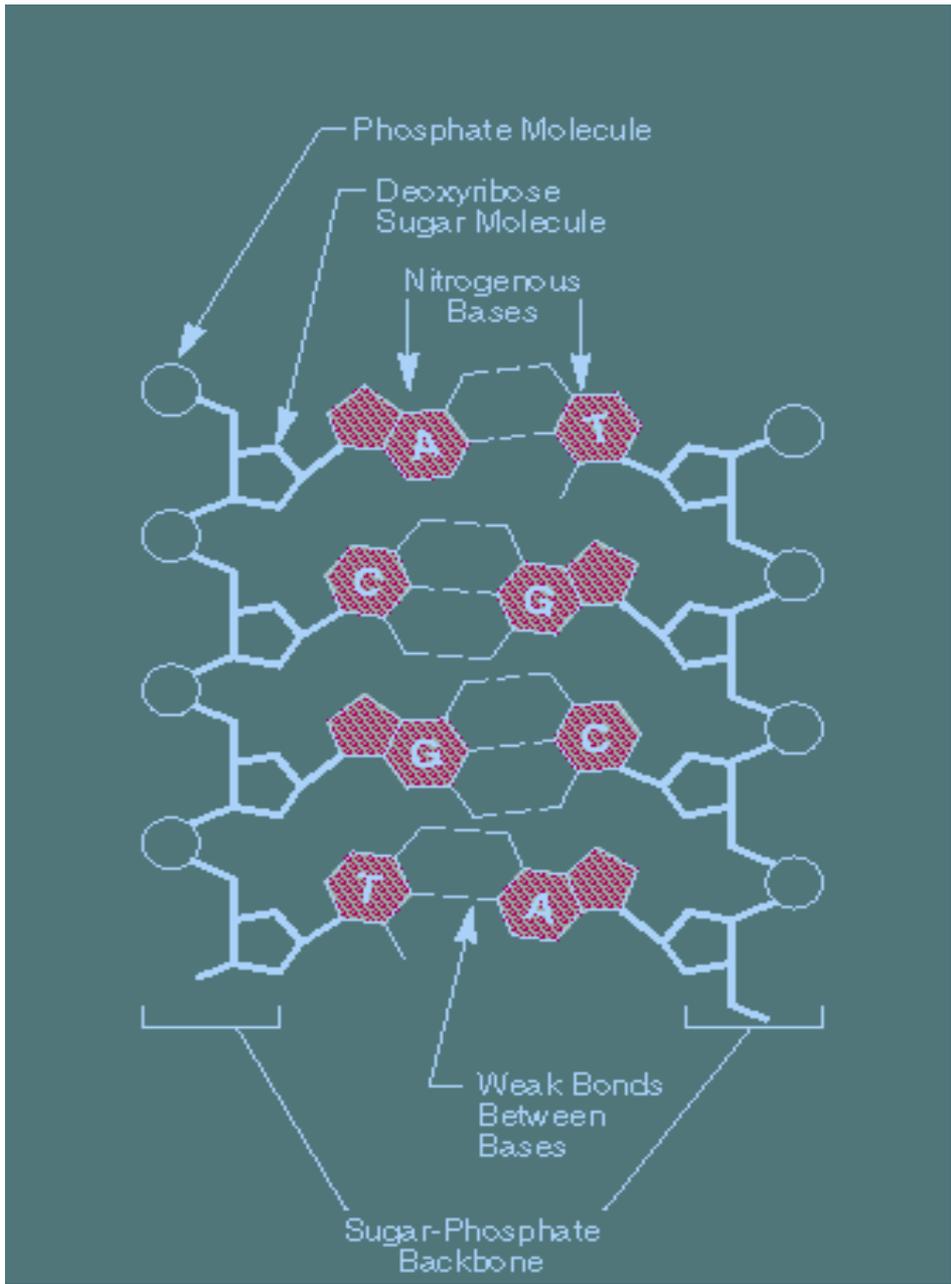


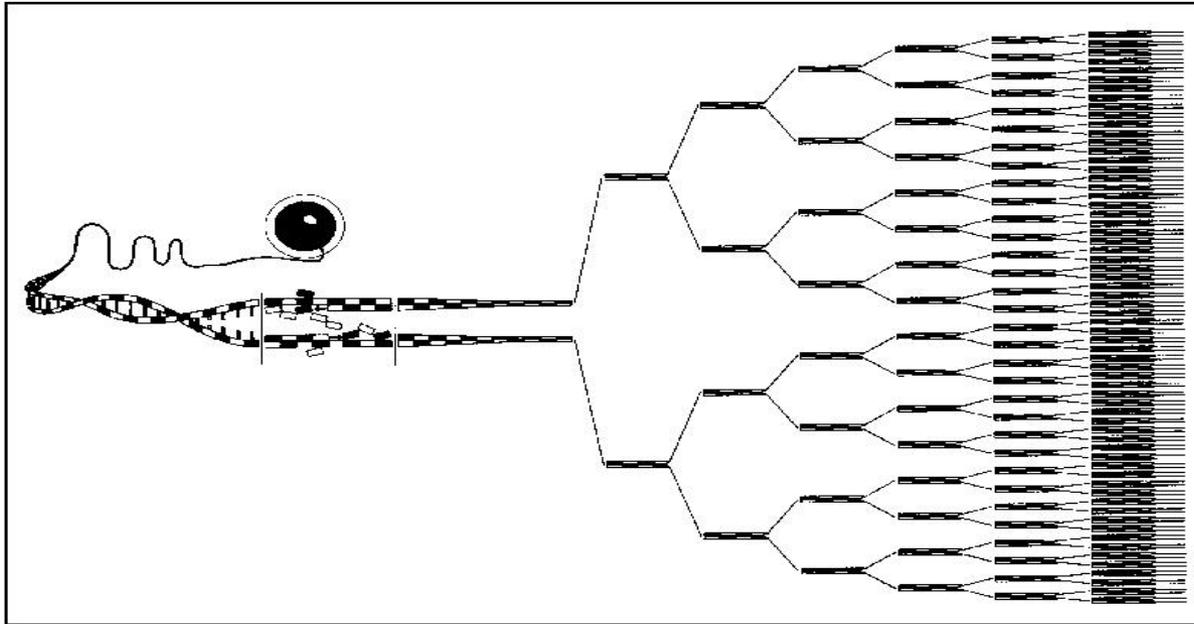
Polymerase Chain Reaction

La reazione a catena della polimerasi (in inglese: Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di sequenze di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

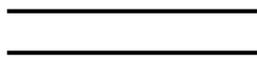
L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.



Polymerase Chain Reaction - PCR

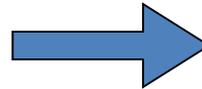


DNA

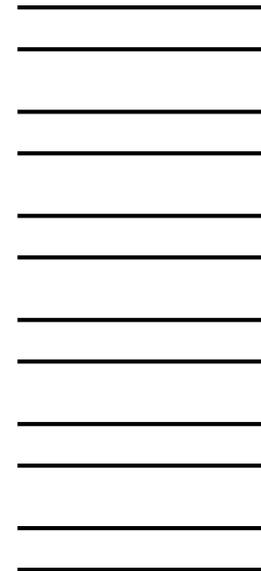


(singola molecola)

PCR



amplificazione



Molte
molecole

ELEMENTI NECESSARI PER LA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

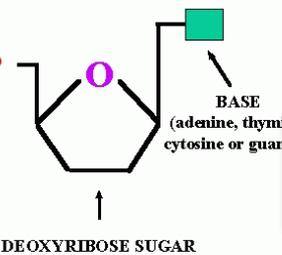
AMPLIFICATION

• PRIMERS

DNA polimerasi

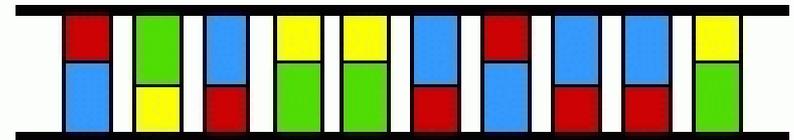


P~P~P



Base Azotata
(Adenina, Timina,
Citosina, Guanina, Uracile)

• DNA TO BE AMPLIFIED

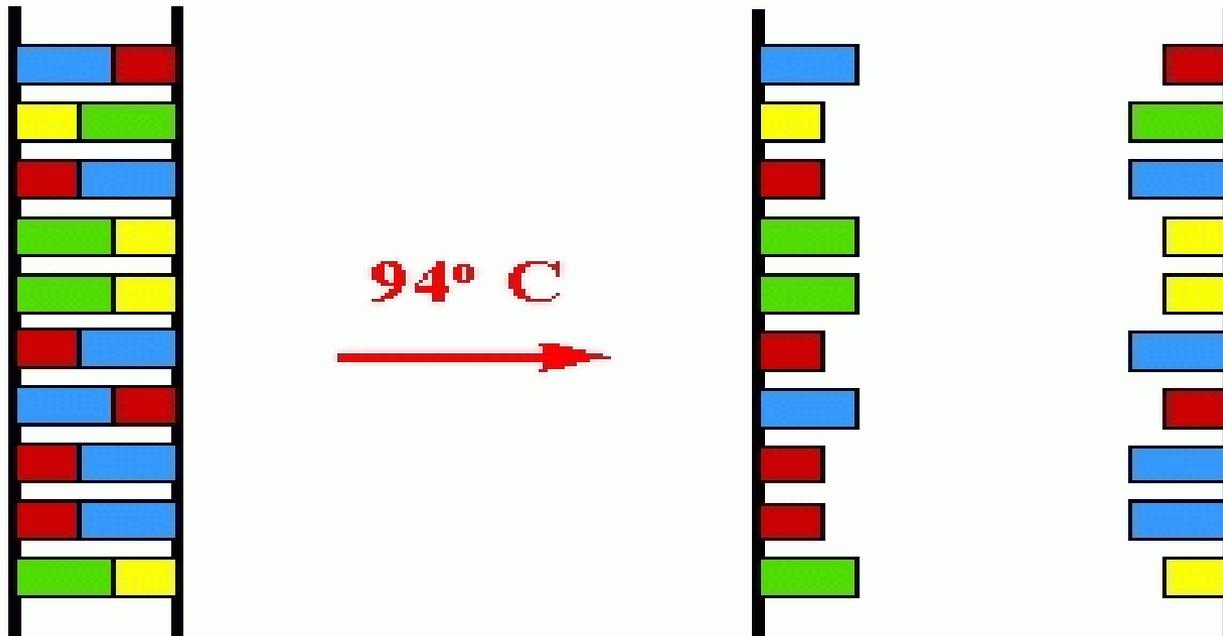


DNA STAMPO

fase 1: DENATURAZIONE

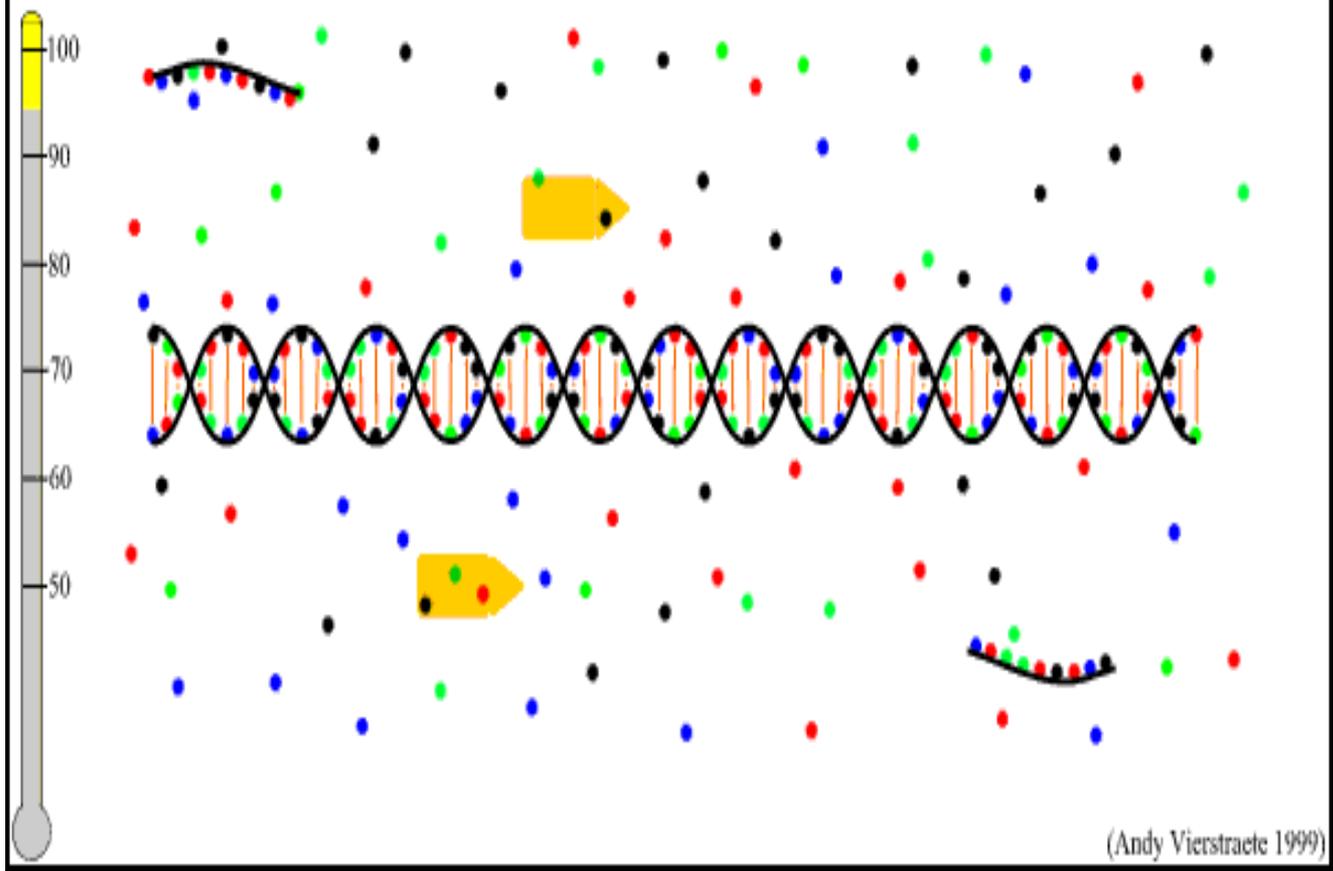
La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore

**DNA STRANDS ARE SEPARATED
BY HEATING**



PCR :

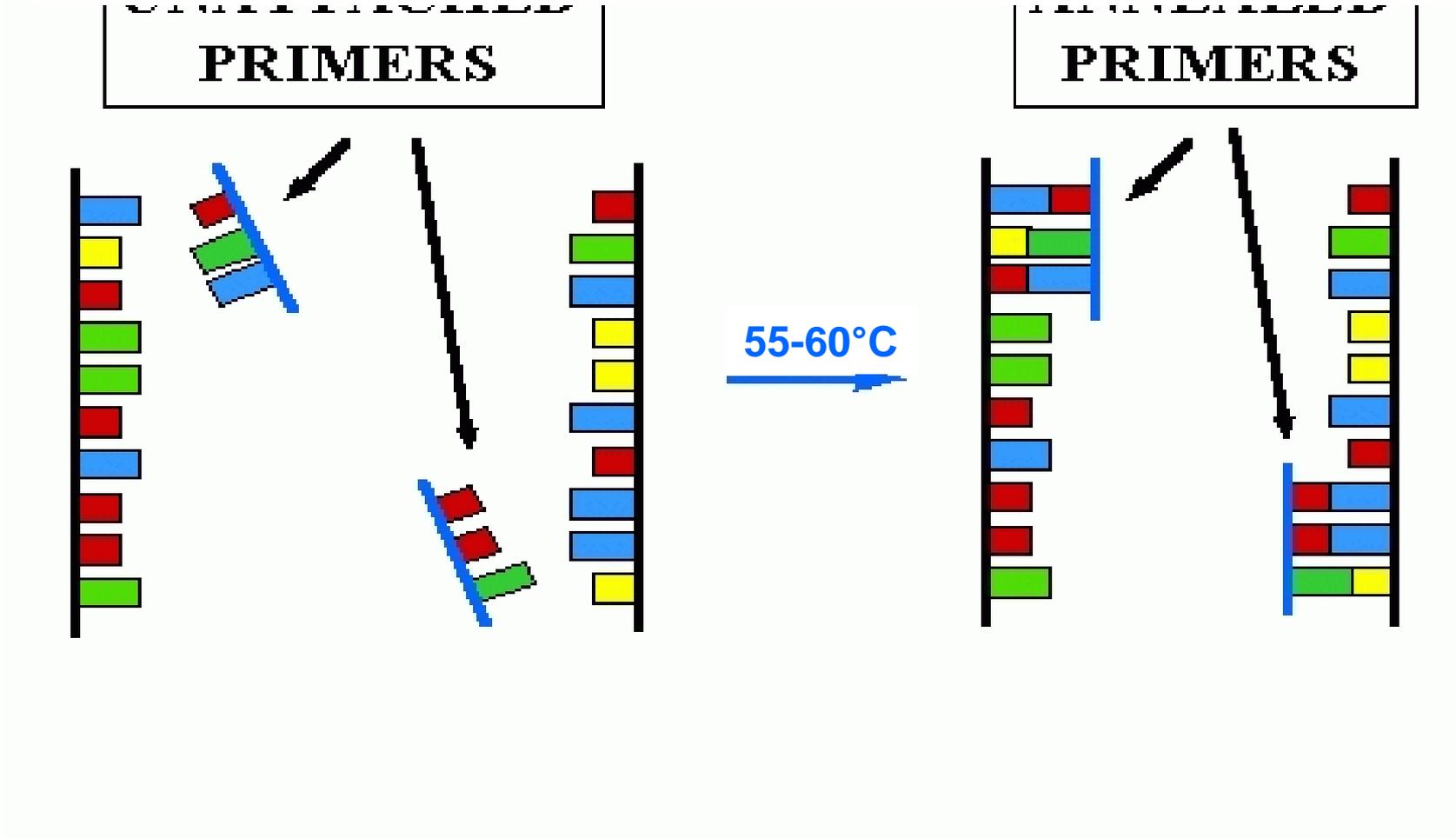
Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

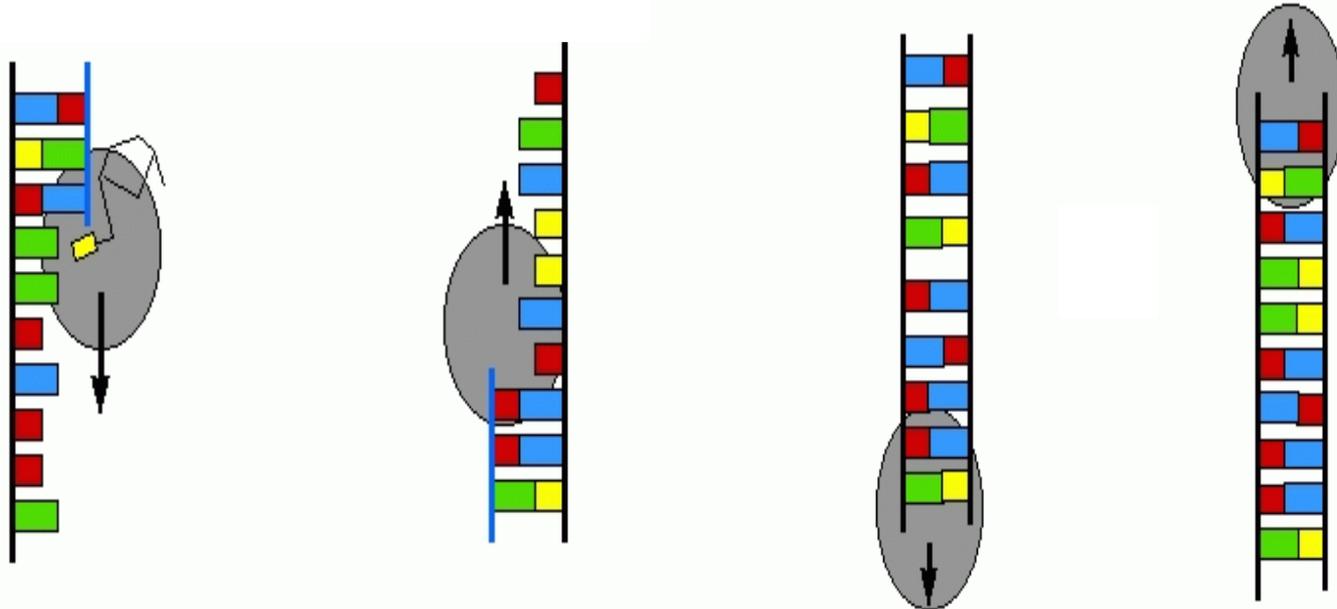
fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo



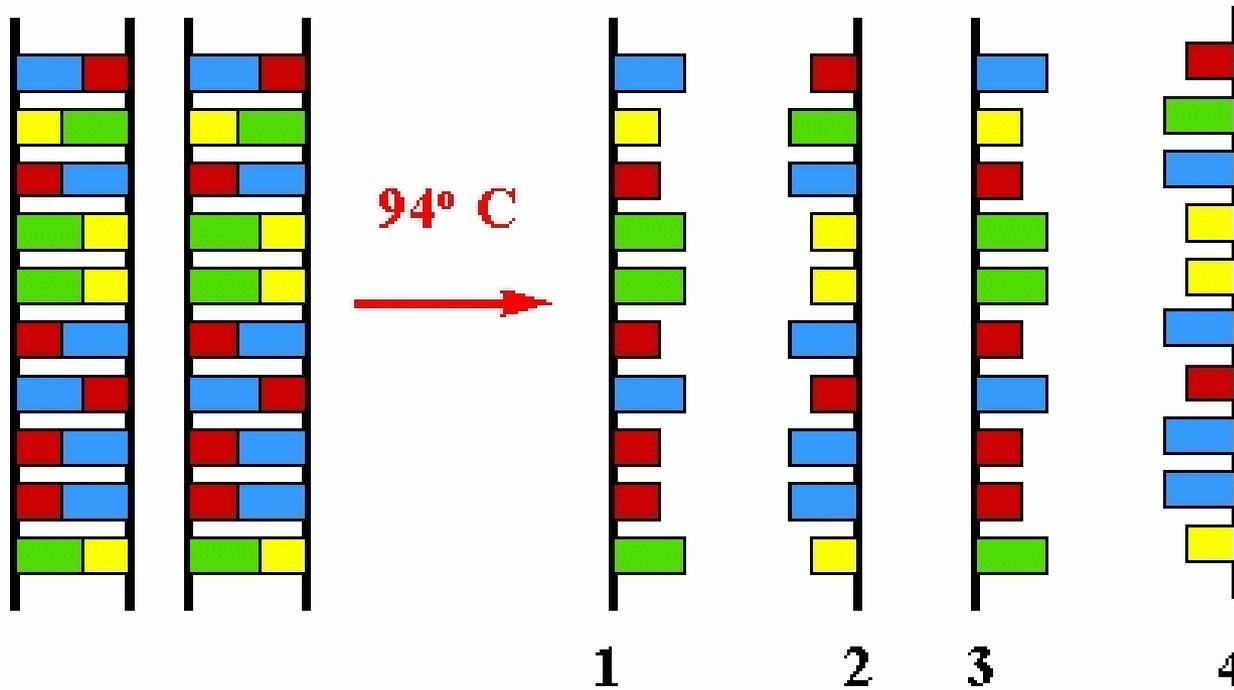
fase 3: ESTENSIONE

La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA



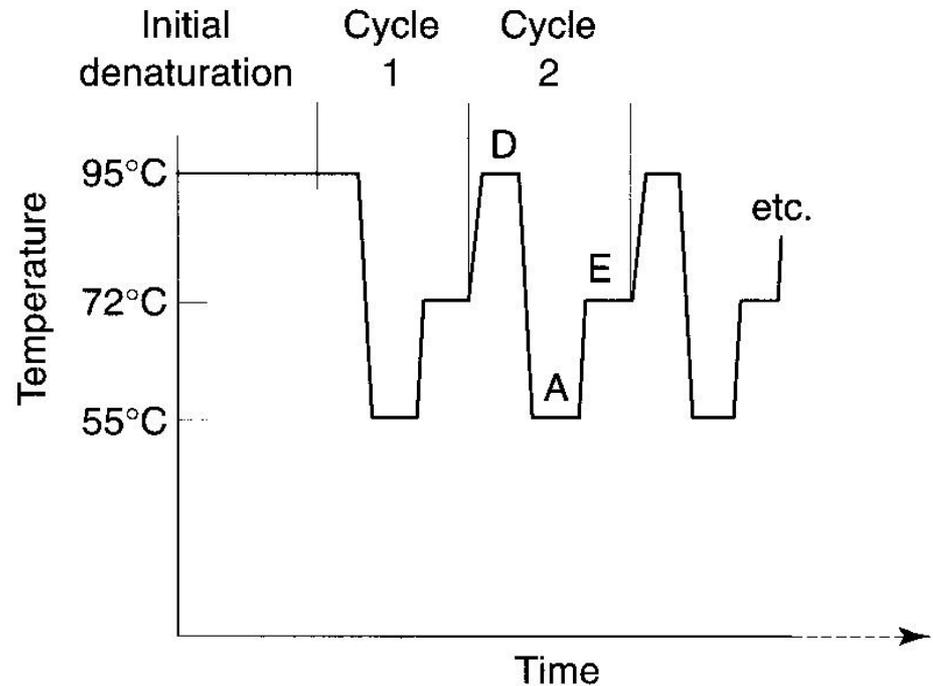
IL PROCESSO SI RIPETE 35-45 volte ciclicamente

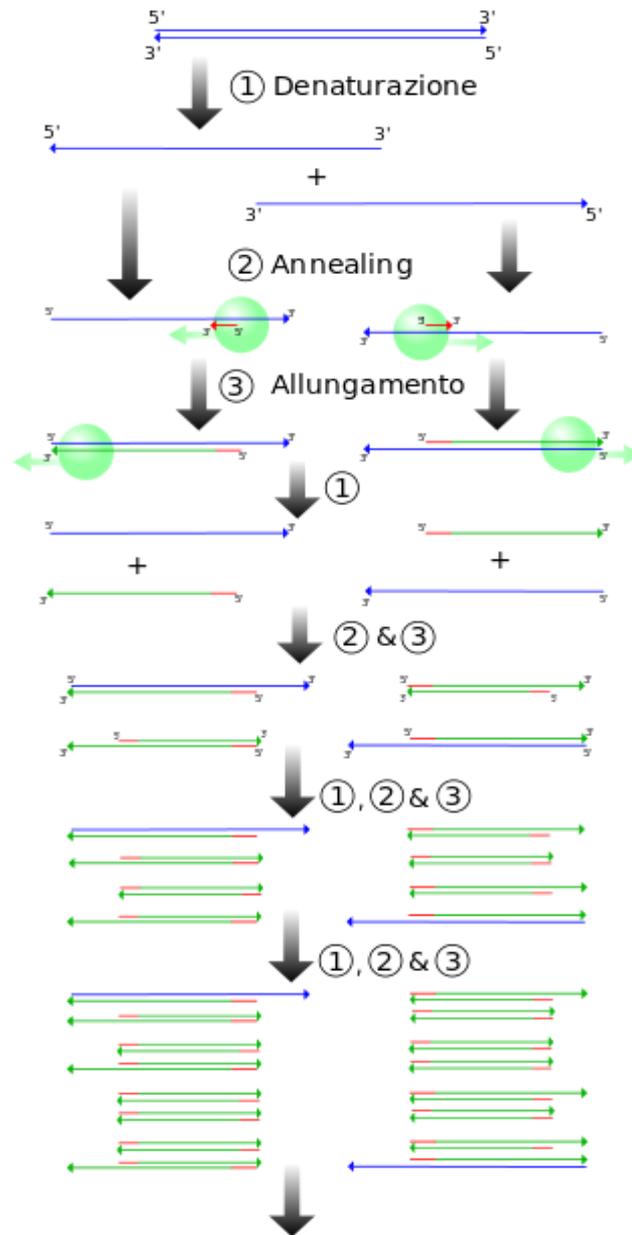
THE PROCESS IS REPEATED.



I cicli della PCR

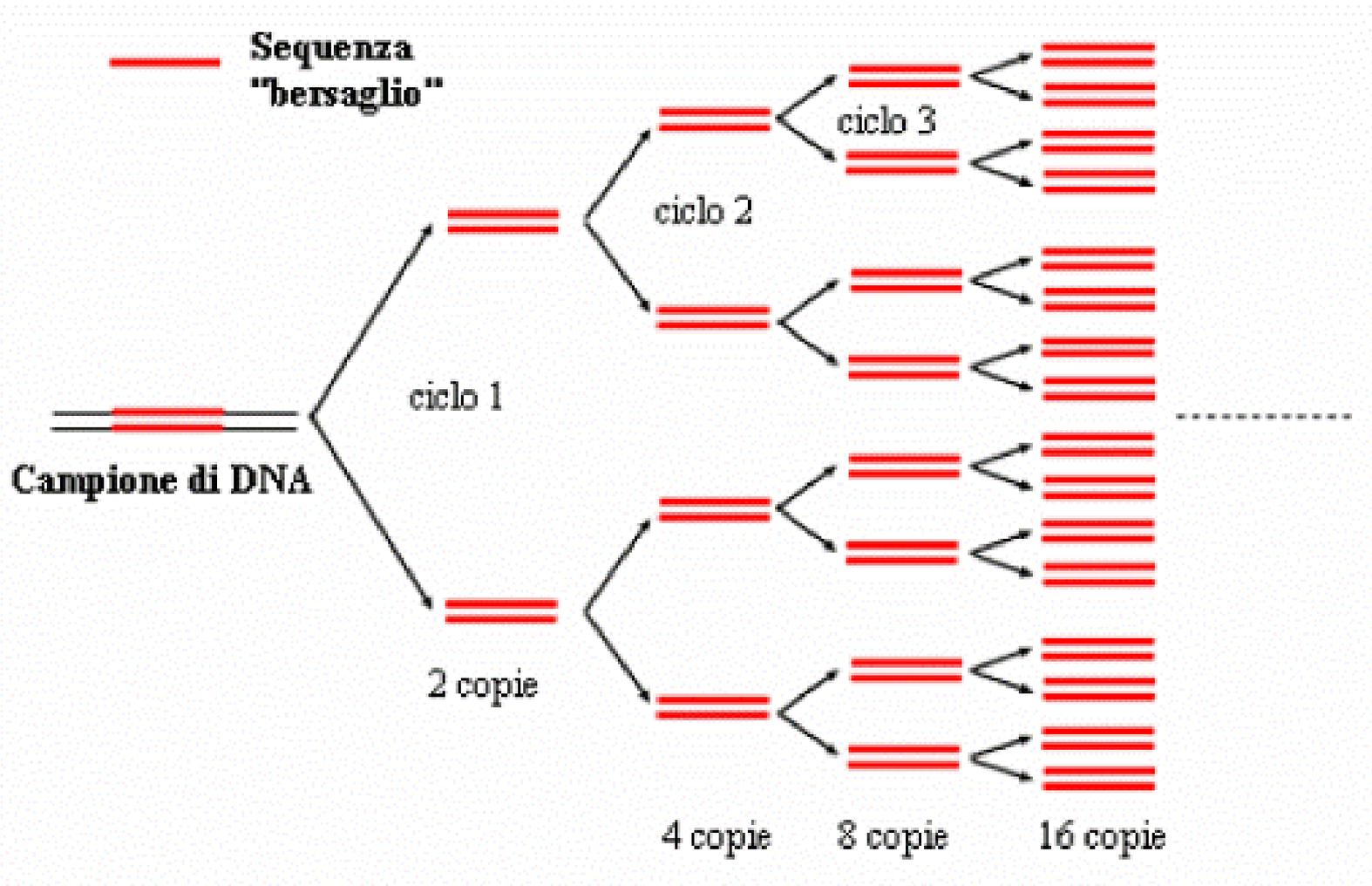
- **30–35 cicli ciascuno comprendente:**
 - **denaturazione (95°C), 10-40 sec**
 - **annealing (50–65°C), 30-120 sec**
 - **polimerizzazione (68-72°C), il tempo dipende dalla lunghezza del frammento**





Crescita esponenziale dei segmenti prodotti

Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA “copiato” raddoppia



Quanto è potente la PCR?

- La PCR può amplificare fino ad ottenere una quantità utilizzabile di DNA (**visibile su gel**) in meno di 2 ore
- Il prodotto della PCR può essere digerito con enzimi di restrizione, sequenziato o clonato
- La PCR può amplificare una singola molecola di DNA (es. uno spermatozoo)

Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

Numero di cicli

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30



2
4
8
16
32
64
128
256
512
1.024
2.048
4.096
8.192
16.384
32.768
65.536
131.072
262.144
524.288
1.048.576
2.097.152
4.194.304
8.388.608
16.777.216
33.554.432
67.108.864
134.217.728
268.435.456
536.870.912
1.073.741.724

Numero di molecole di amplificati

$$Y_n = A \cdot (1 + E)^n$$

dove:

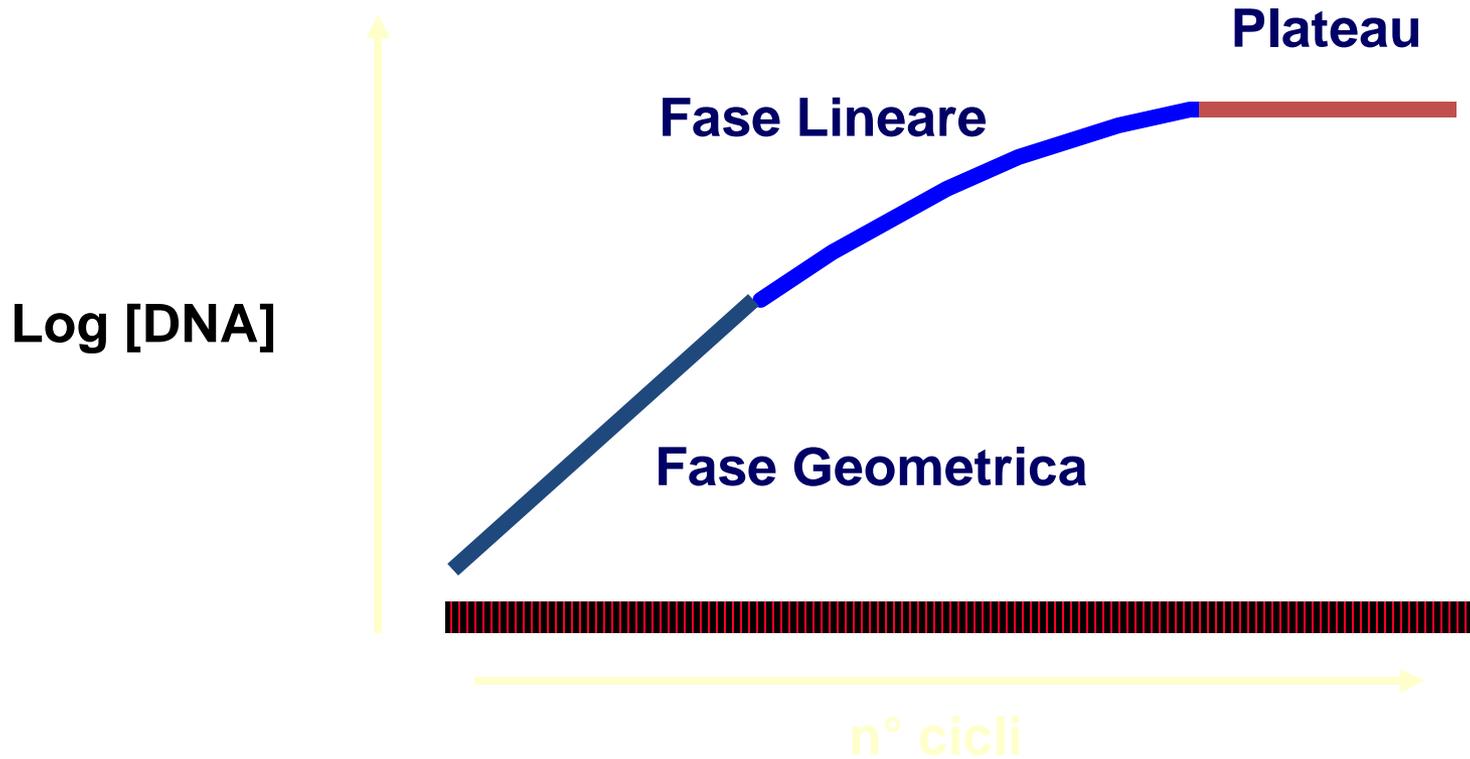
Y_n = DNA prodotto dopo n cicli

A = quantità iniziale di DNA presente

n = numero di cicli di PCR effettuati

E = efficienza dell'amplificazione (in genere compresa tra 0,7 e 0,8)

LA REAZIONE DI PCR



CAUSE DELL'EFFETTO PLATEAU

Competizione tra il prodotto dei cicli precedenti e i primers per l'ibridazione

Inattivazione termica dell'enzima DNA polimerasi

Riduzione del rapporto molare tra le concentrazioni della DNA-polimerasi e del DNA

Riduzione progressiva dell'efficienza di denaturazione e/o di ibridazione

Distruzione degli amplificati per l'attività esonucleasica 5'>3' della polimerasi

Accumulo di pirofosfati (inibitori della polimerasi)

Progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione

PARAMETRI DELLA REAZIONE DI PCR

Parametri	Condizioni di reazione
Buffer Taq polimerasi	KCl 50mM, tris-cloruro 10mM + MgCl ₂
DNA target	0,1-2 ug DNA o RNA (cDNA)
Primers	0,2-1 mM (20-100 pmoli per reazione)
MgCl ₂	0,05 e 5 mM
dNTP	0,2 mM ciascuno (200uM).
Taq polimerasi	0,1-4 U
Totale miscela di reazione	25 – 100 ul
Denaturazione	94-98°C
Annealing	37-72°C
Estensione	60-72°C
Numero dei cicli	25 – 40

Thermal Cyclers, MJ Research



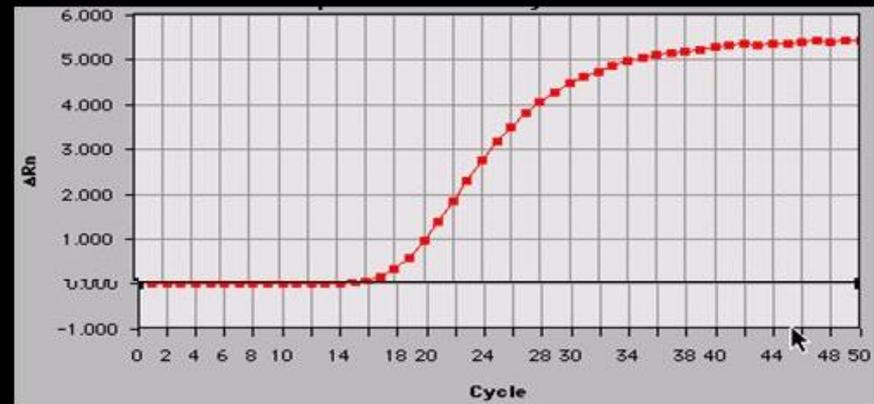
PCR Quantitativa

qPCR

Real Time PCR

- Rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione
- Il prodotto di PCR non viene analizzato su gel di agarosio
- Analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer

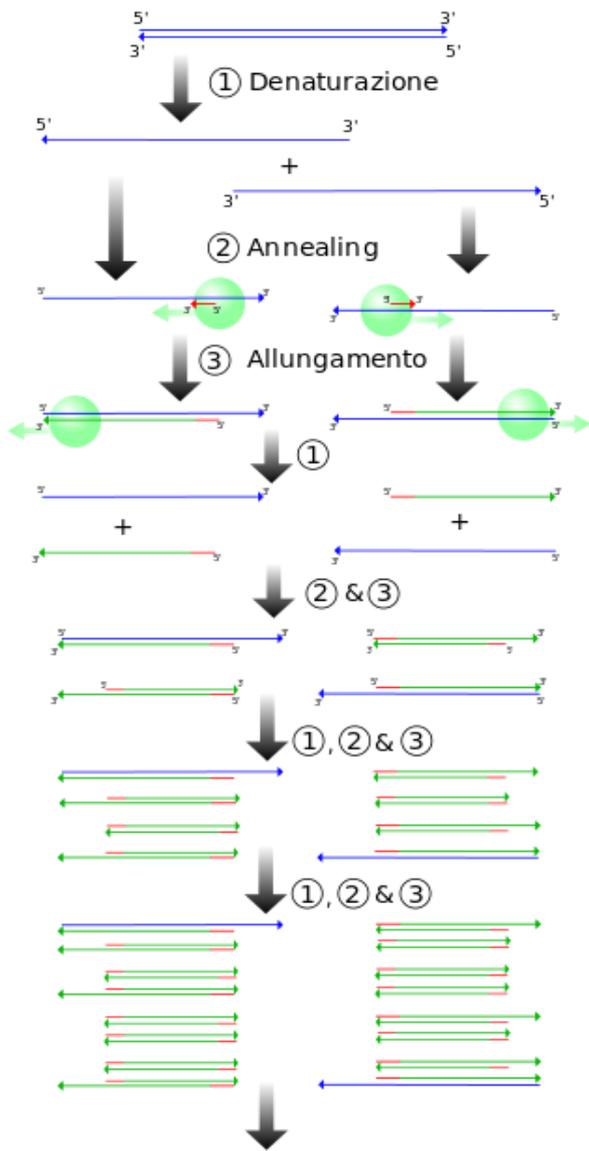
Plot lineare



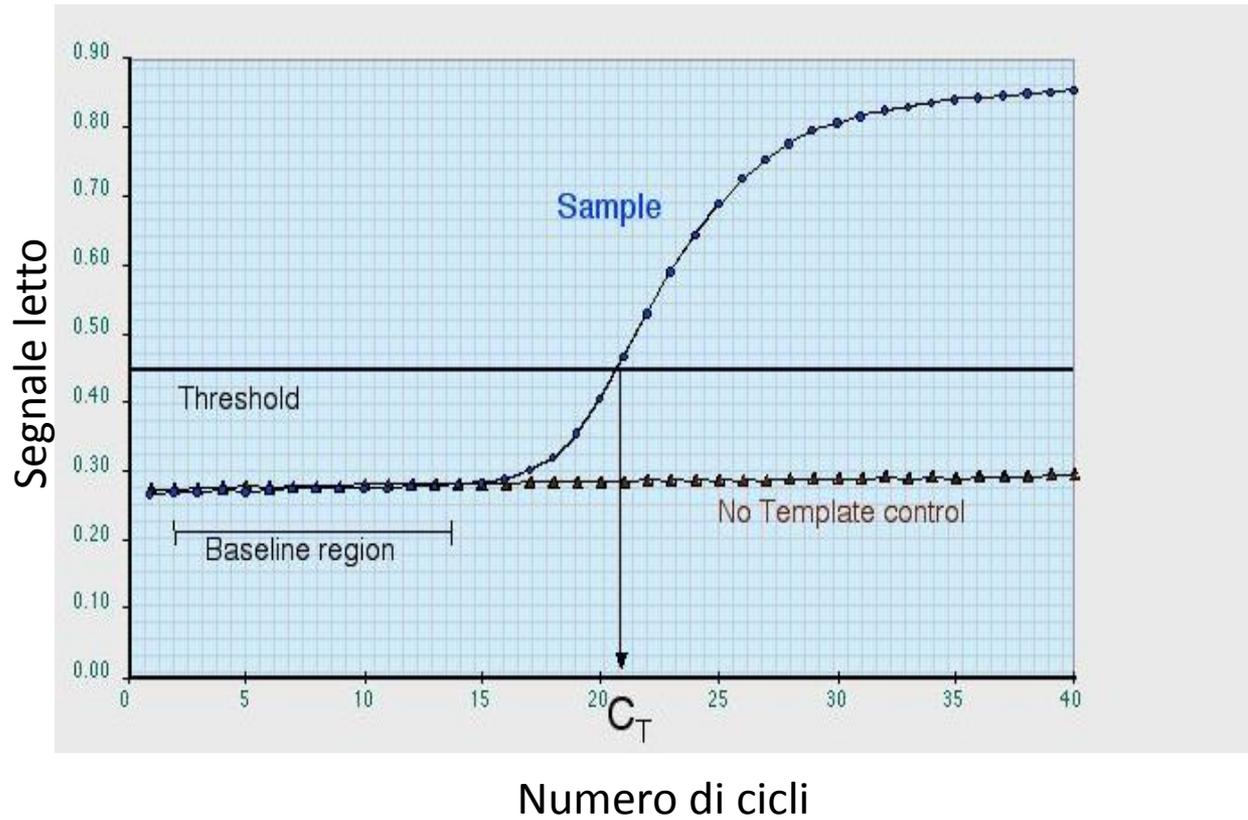
Incremento di fluorescenza

Cicli di PCR

Durante la fase 3 (**estensione**) avviene la lettura del segnale

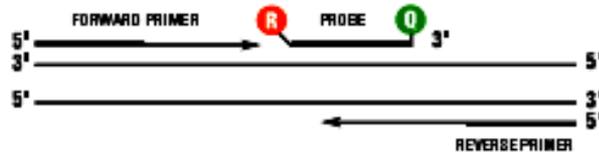


Crescita esponenziale dei segmenti prodotti

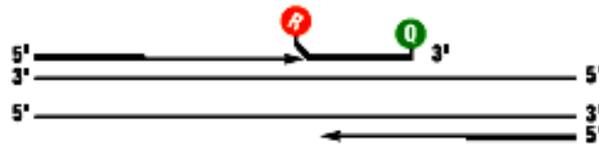


TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

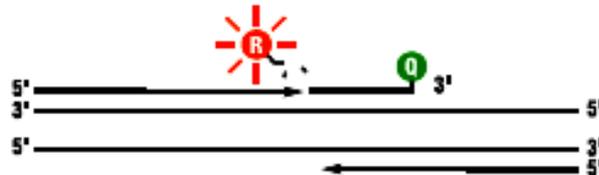
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



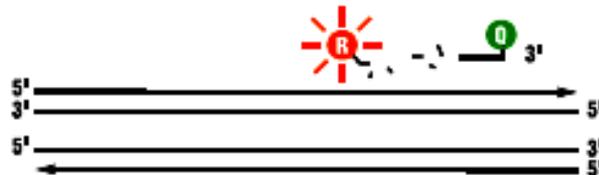
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

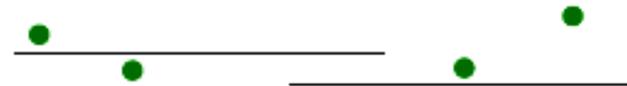


SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

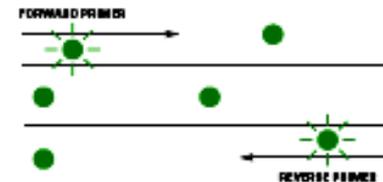
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



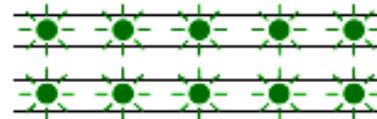
2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. **Polymerization completed:** When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.



La **TaqMan** è sequenza specifica

La **SYBR Green** ha elevata affinità per il DNA bicitenario

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RT-PCR

La tecnica della RT-PCR è una variante della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). Questa tecnica consiste nella sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento a partire da uno stampo di RNA.

La molecola di DNA sintetizzata mediante il processo di retrotrascrizione è definita cDNA. Mediante l'impiego della RT-PCR è possibile convertire in DNA un intero trascrittoma (insieme di tutto il trascritto di una cellula) di uno specifico tessuto di un individuo in una specifica fase del suo sviluppo.

Per tale motivo, la RT-PCR è una tecnica che viene sfruttata in laboratorio per studiare l'espressione genica, perché consente di sottoporre ad ulteriori analisi il cDNA sintetizzato. Il prodotto della retrotrascrizione dell'RNA, anche detta Reazione First-strand, può essere amplificato mediante PCR classica, oppure essere quantificato mediante real-time PCR (qPCR).

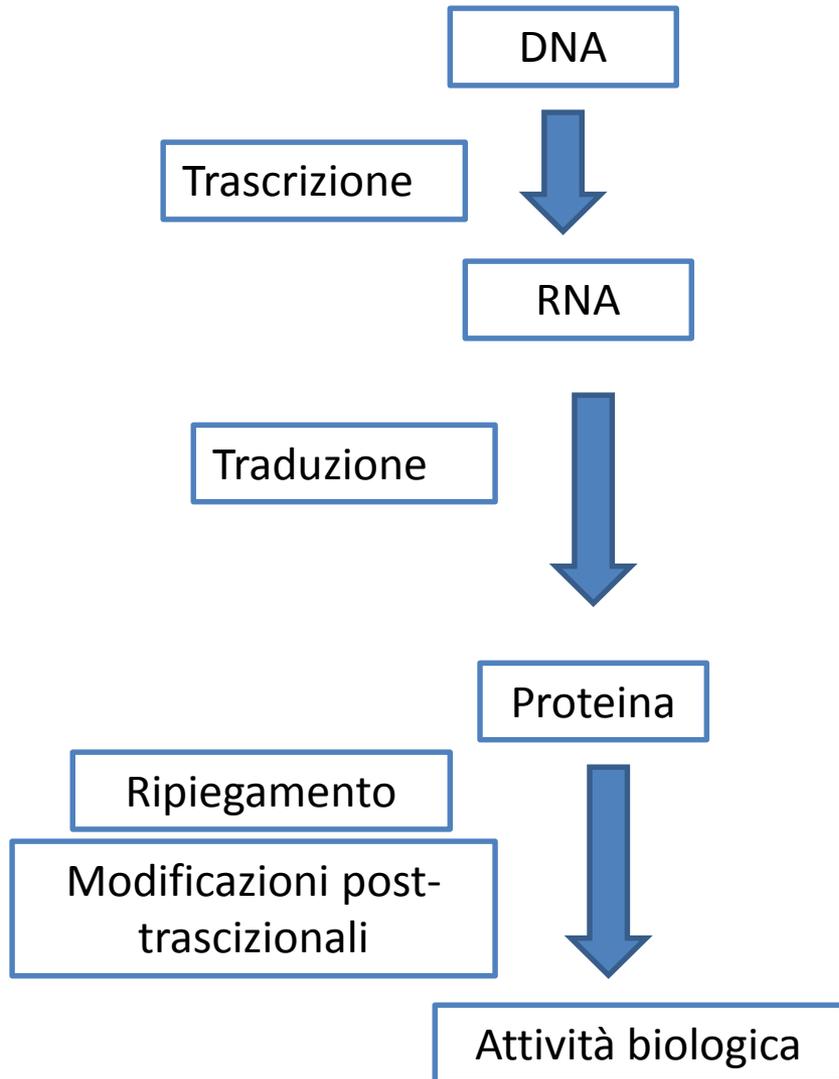


Fig 11.1 Espressione genica

Retrotrascrizione



Per **Retrotrascrizione** si intende la trascrizione su template di mRNA nel cDNA complementare

L'uso degli enzimi **retrotrascrittasi** risale a quando furono scoperti i meccanismi molecolari con cui i virus ad RNA si replicavano all'interno delle cellule infettate.

Si parte da estratti di RNA totali o arricchiti per poly ⁺(A) su resina con oligo Dt.

Il cDNA è molto più stabile e si conserva meglio e più a lungo.

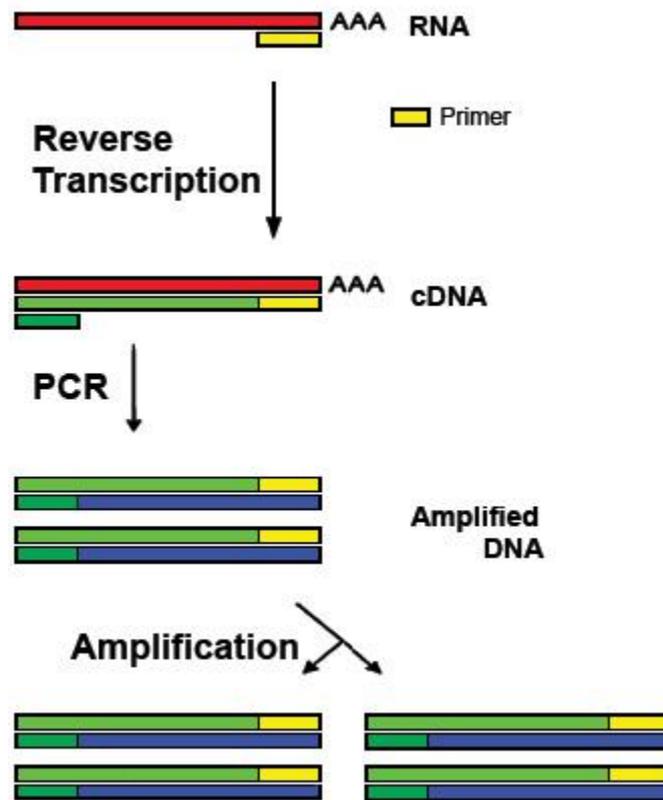
Il cDNA si utilizza per la PCR però c'è un solo filamento complementare al trascritto con senso 5'-3' inverso.



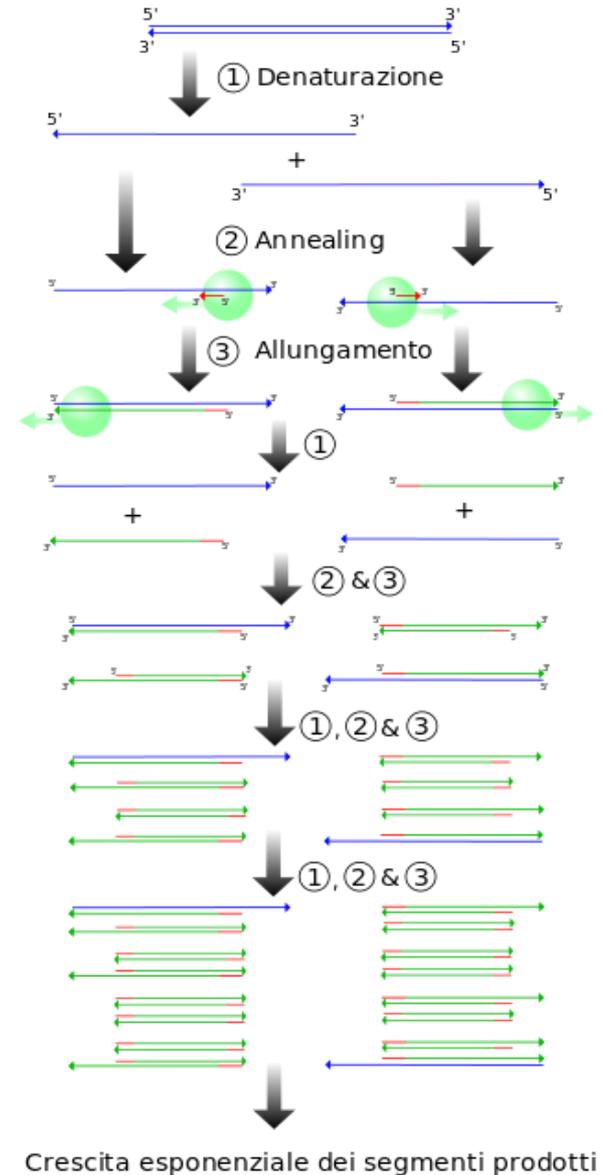
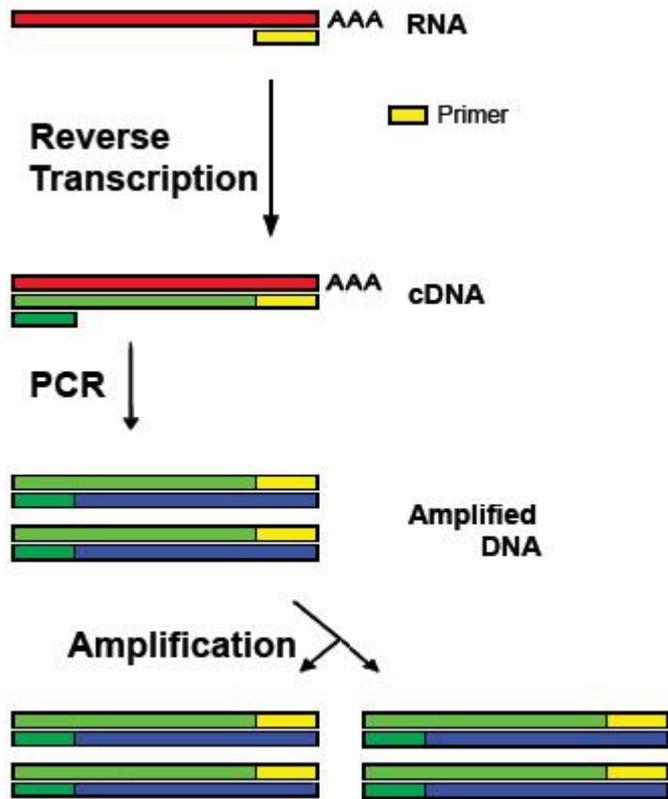
Metodica Retrotrascrizione

Enzima retrotrascrittasi

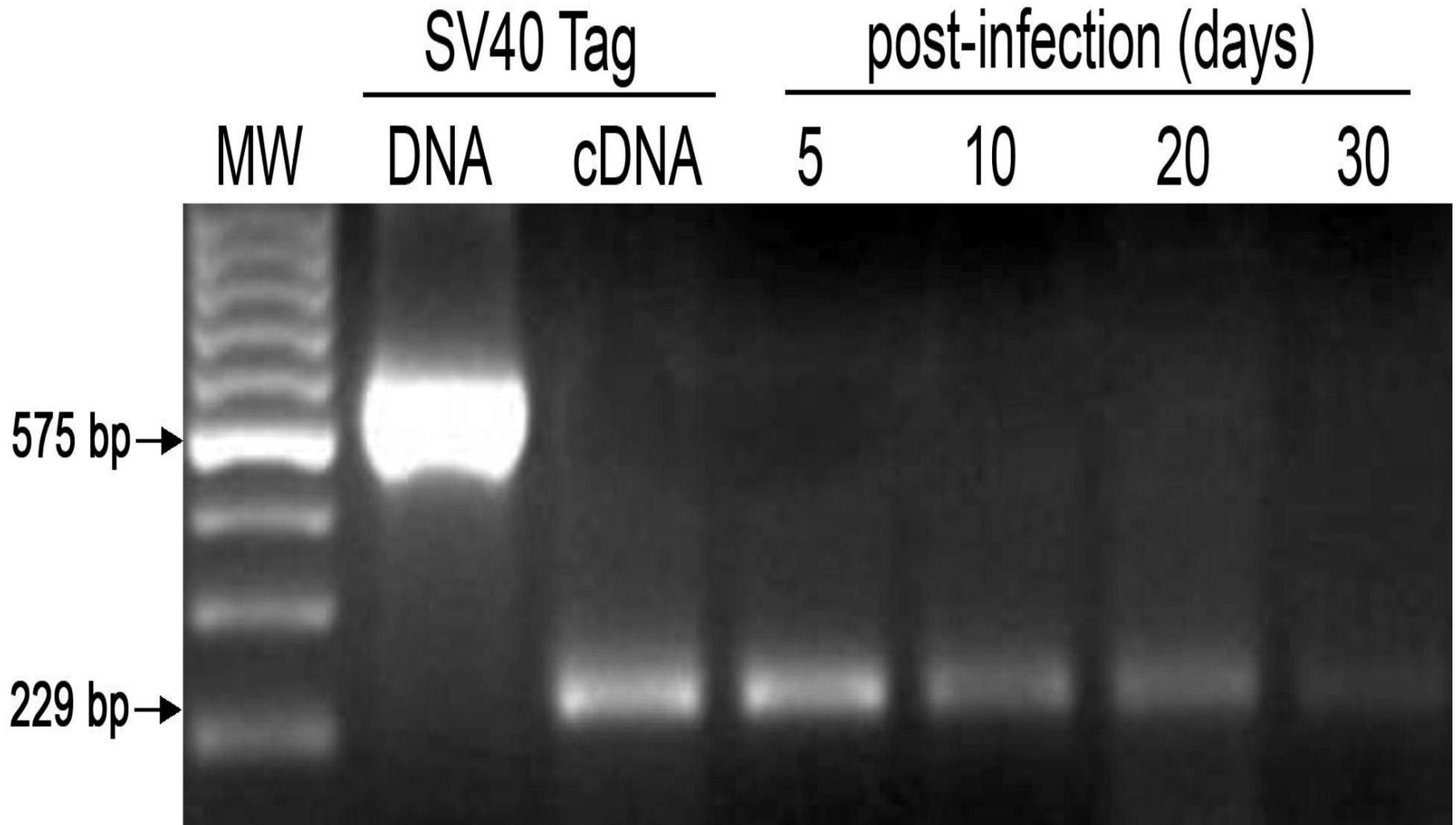
Esempio Superscript II (Invitrogen) è una **DNA polimerasi**, che sintetizza il DNA complementare come singolo filamento



Reverse transcriptase-polymerase chain reaction RT-PCR



ESEMPI DI ESPERIMENTO RT-PCR



Elettroforesi di Acidi Nucleici in gel

Permette la separazione di frammenti di DNA/RNA da una miscela complessa

E' una tecnica fondamentale per:

- l'analisi (elettroforesi *analitica*)*
- la purificazione degli acidi nucleici (elettroforesi *preparativa*)

* La gel elettroforesi analitica analizza la composizione , qualità, quantità di un campione di acido nucleico

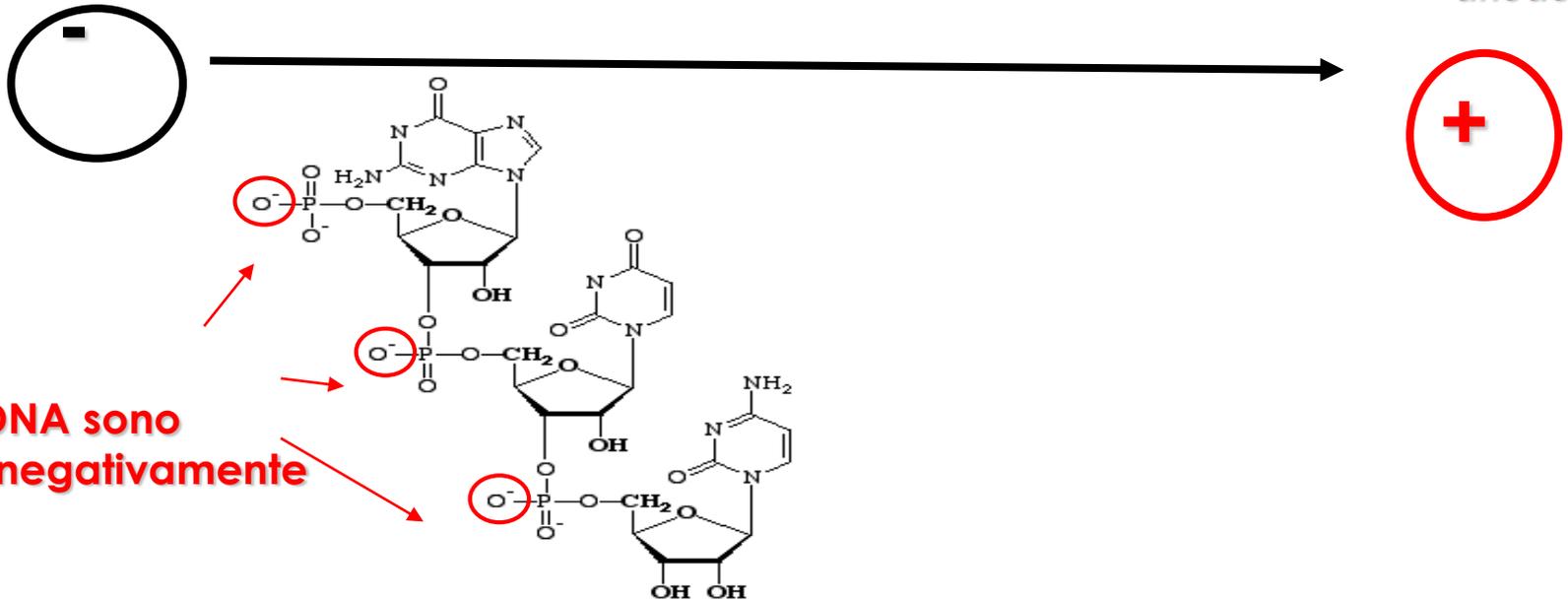
1. SEPARAZIONE DI MACROMOLECOLE IN BASE ALLA LORO CARICA

Quando una molecola carica viene posta in un campo elettrico, essa migrerà verso l'elettrodo dotato di carica opposta .

DNA ed RNA essendo carichi negativamente si muoveranno verso il polo positivo (anodo).

catodo

anodo



RNA e DNA sono carichi negativamente

Etidio Bromuro (EtBr):

Colorante fluorescente
assorbe la luce UV a 300 nm
dando colore giallo-arancio

Permette di
A. visualizzare, il campione

B. quantificare il campione
L'intensità della fluorescenza
è, infatti, proporzionale alla
quantità del campione!!!

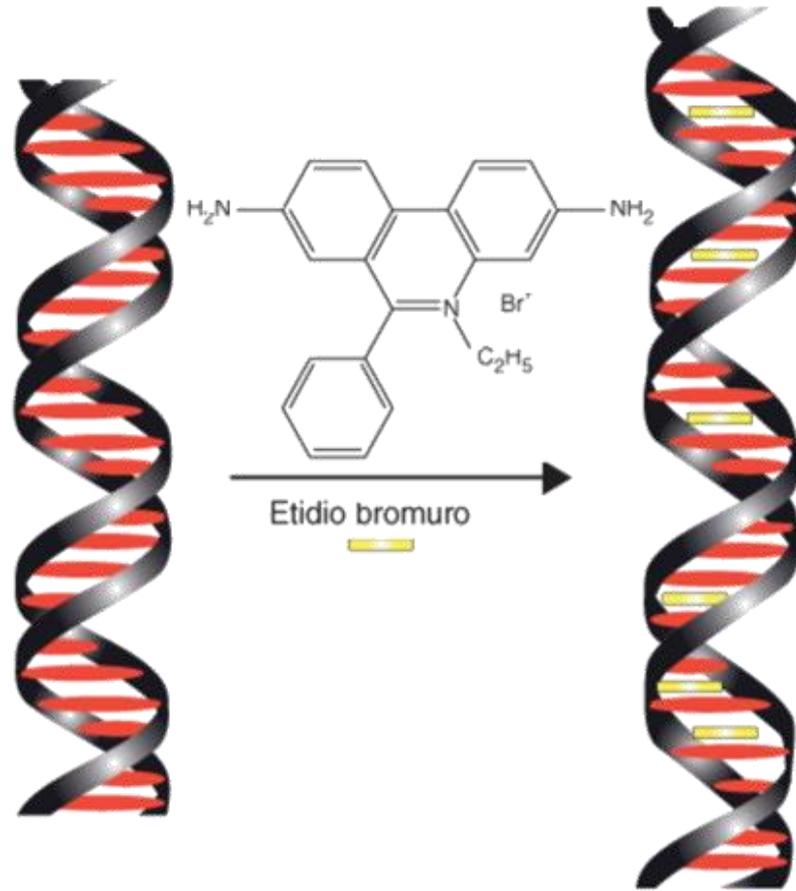
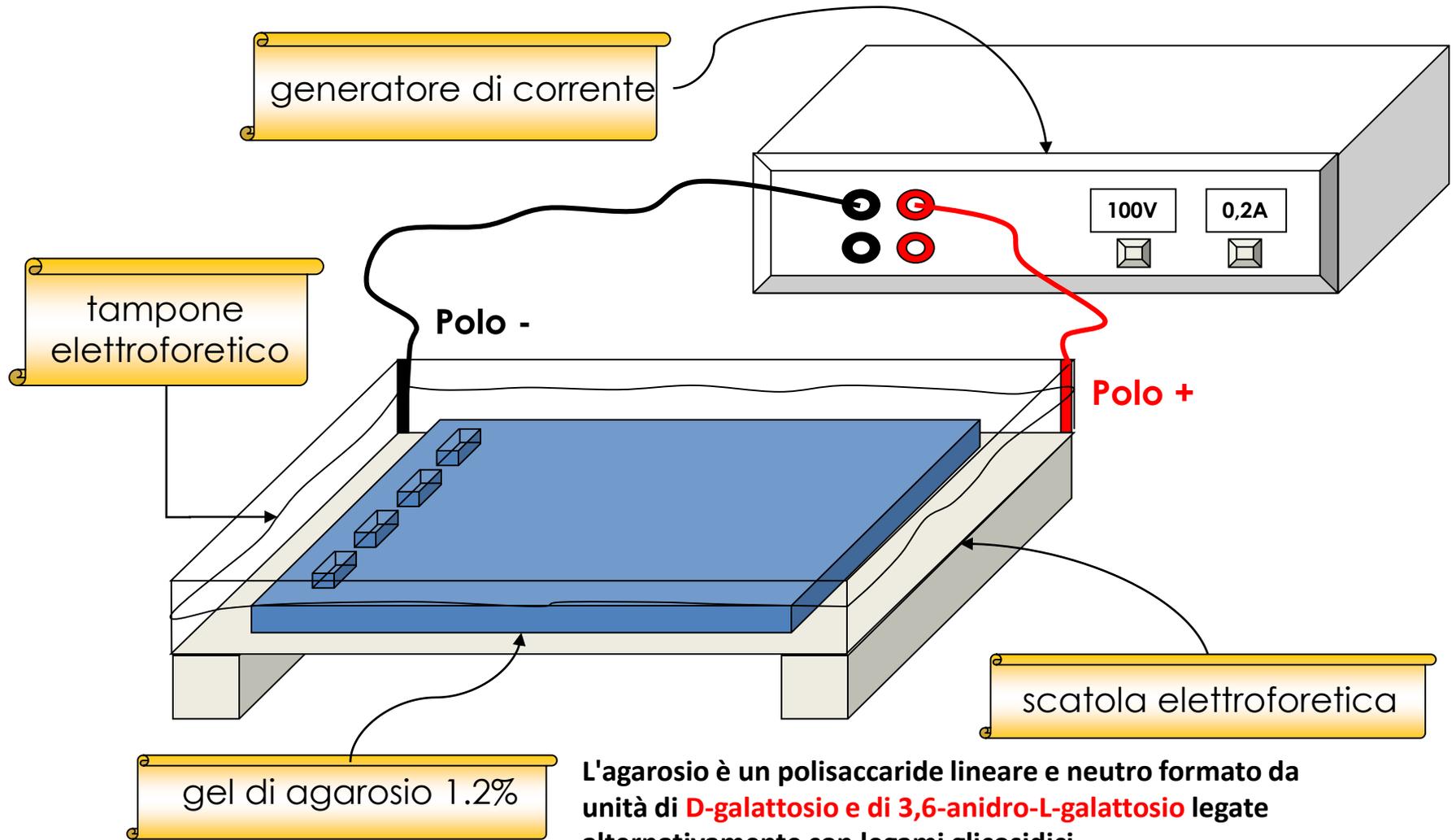


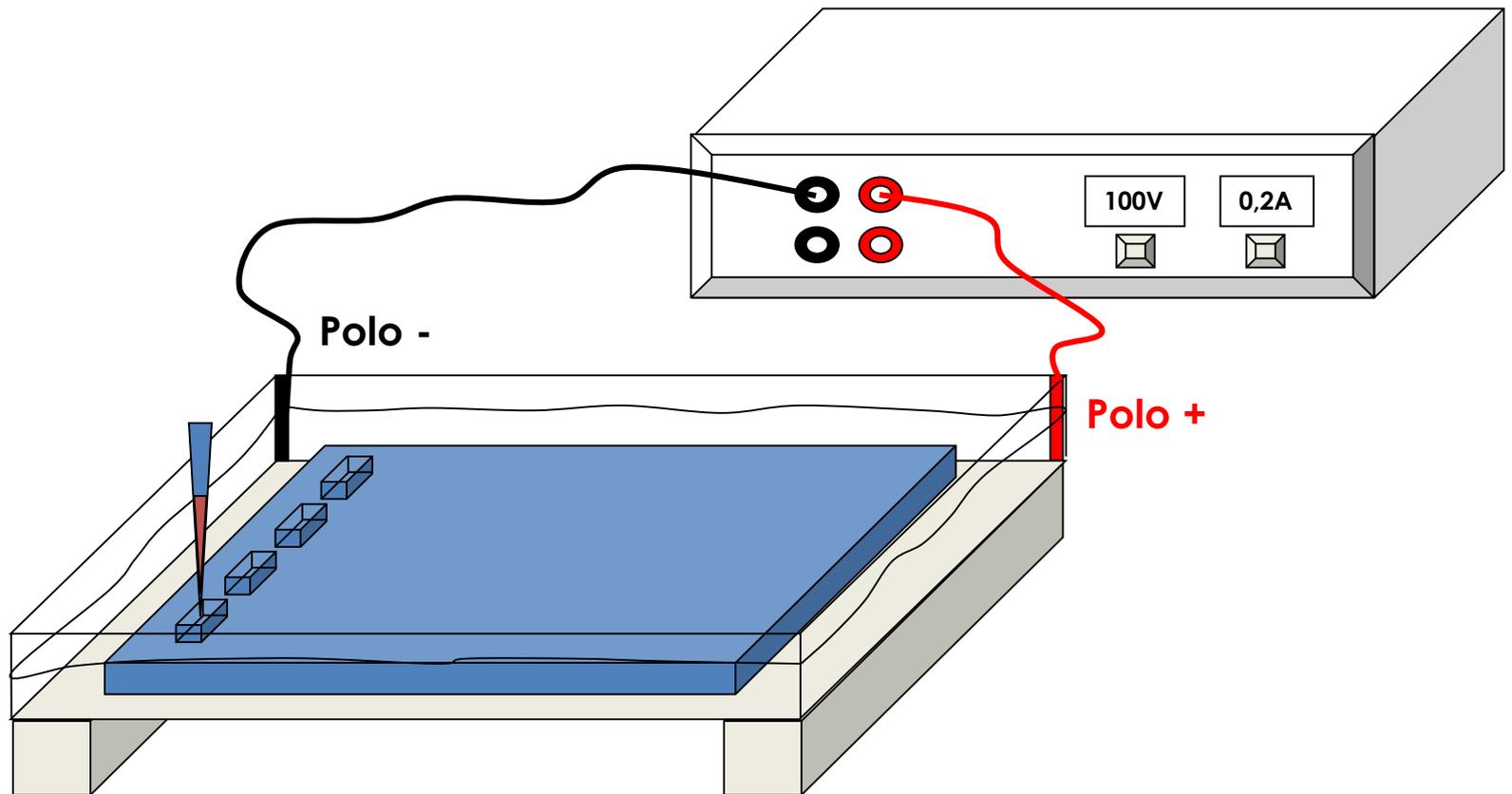
Figura 2.12. Il legame dell'etidio bromuro al DNA. L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il legame distorce la doppia elica ed aumenta la sua lunghezza. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato con luce ultravioletta.

SCHEMA APPARATO PER ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



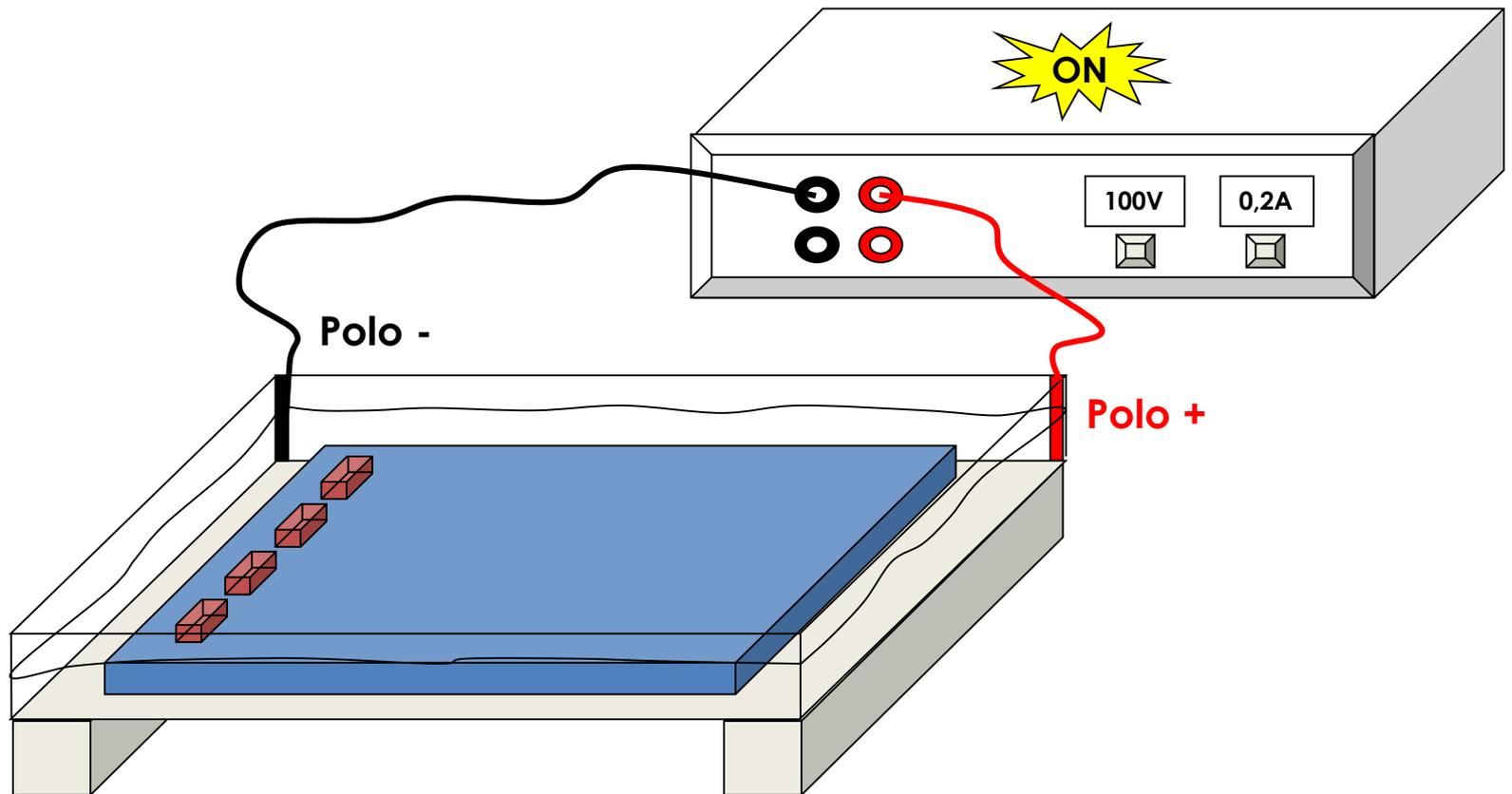
L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di **D-galattosio** e di **3,6-anidro-L-galattosio** legate alternativamente con legami glicosidici.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



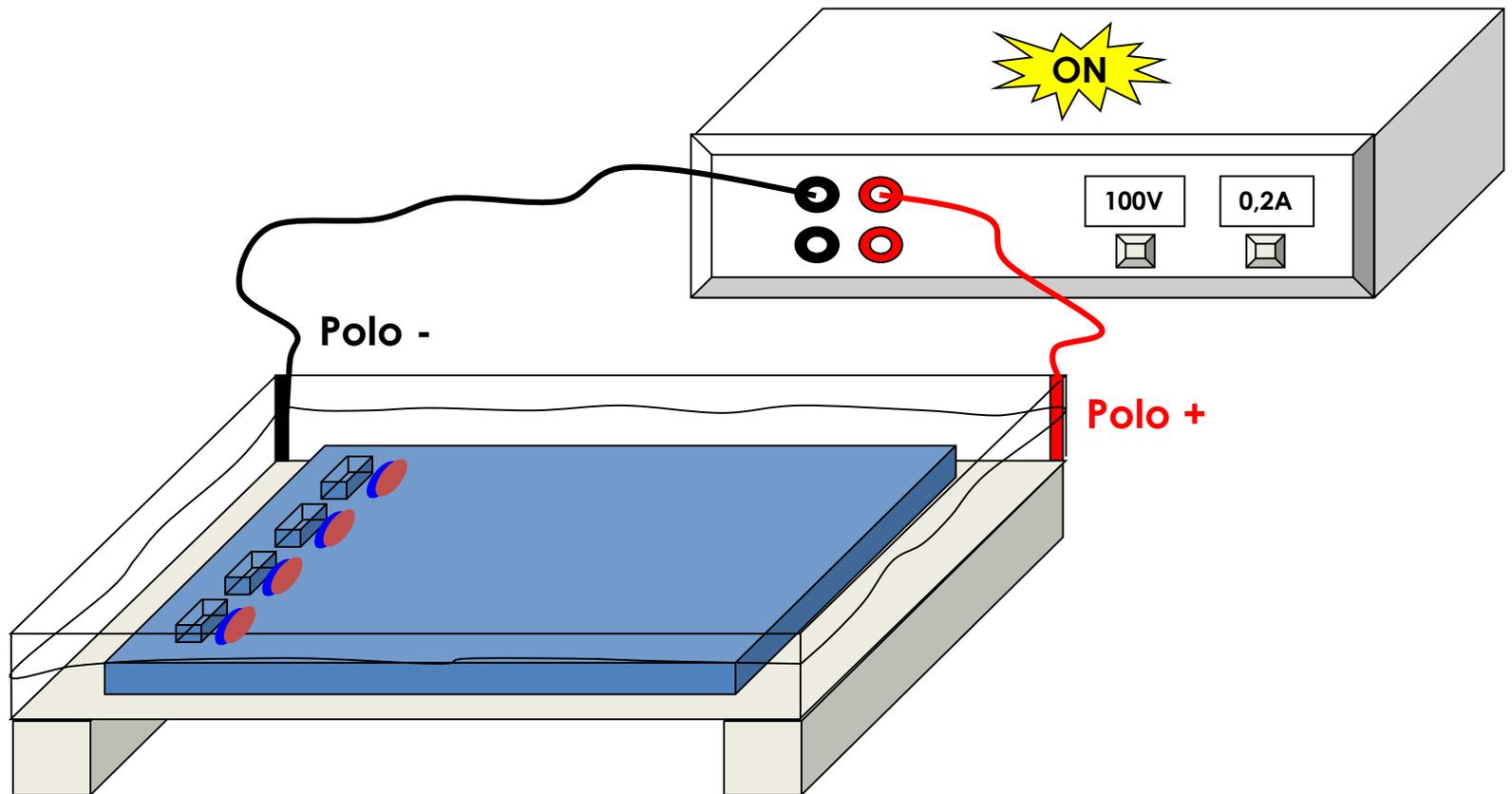
Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

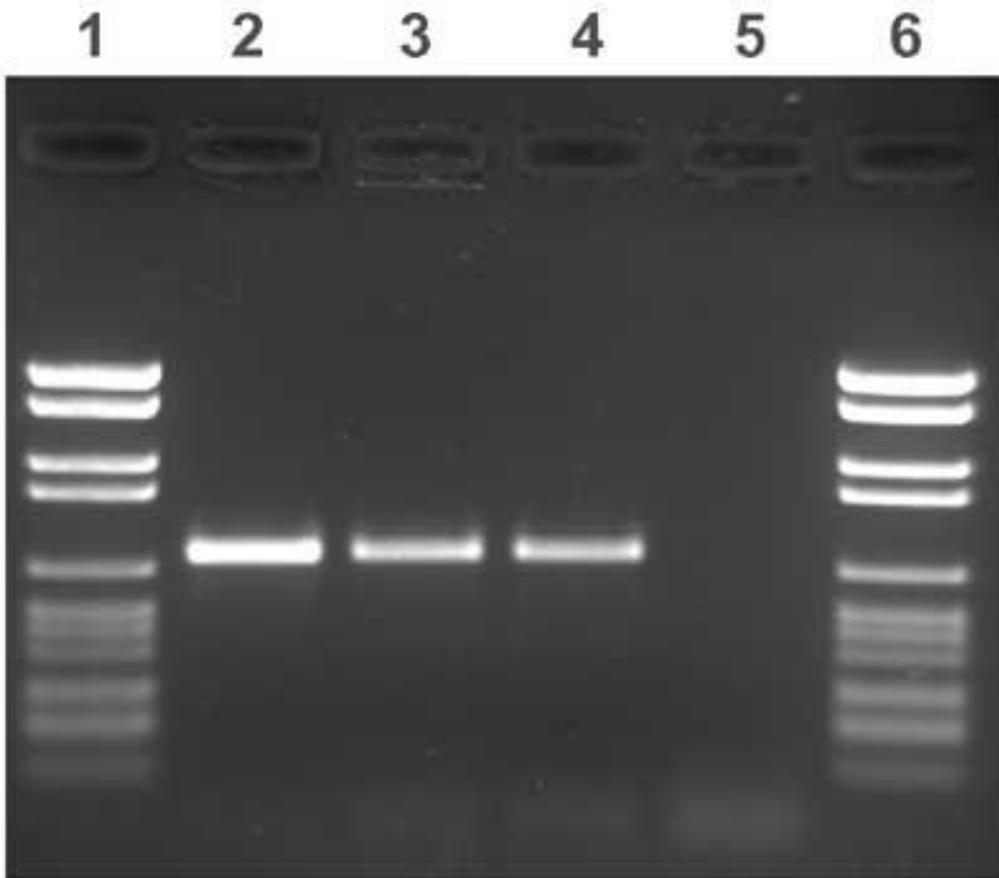


Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

**Il DNA colorato con bromuro di etidio
emette una fluorescenza di colore rosso-arancio se sottoposto a luce UV**



L'immagine viene aquisita in bianco e nero da un software



Taglio del DNA con enzimi di restrizione

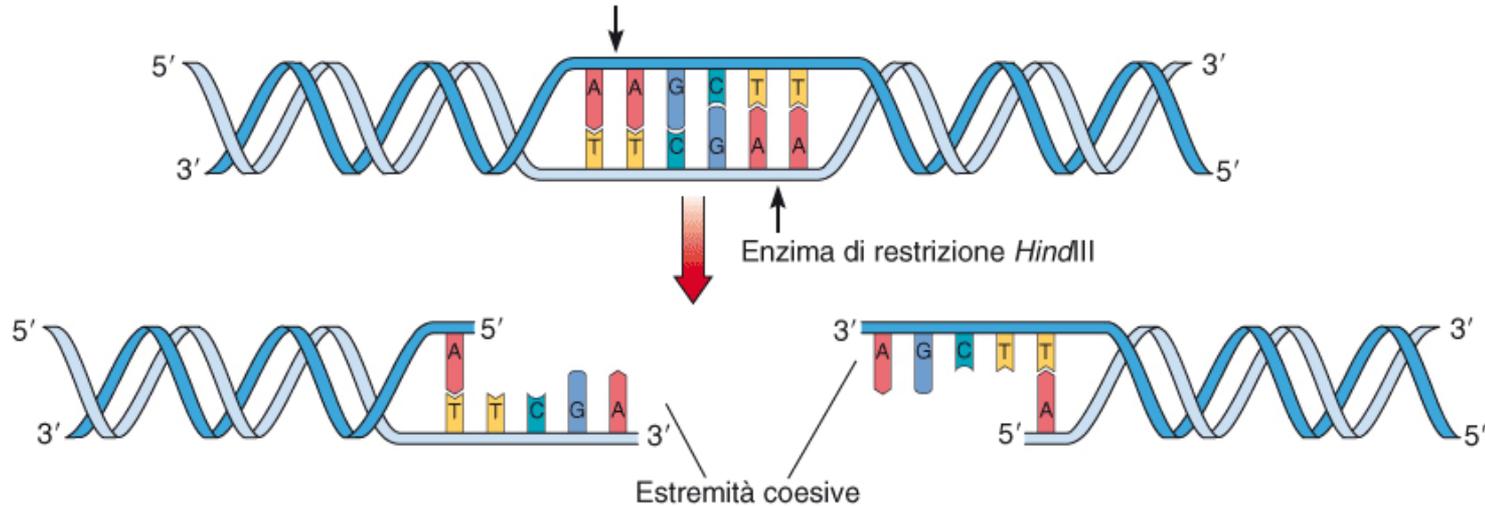


FIGURA 15-1 Taglio del DNA con un enzima di restrizione

Molti enzimi di restrizione, come *Hind*III, tagliano il DNA a livello di sequenze di basi palindromiche, producendo due estremità complementari, dette "sticky ends" o "estremità coesive". Le frecce nere indicano i siti di taglio dell'enzima.

Taglio del DNA con enzimi di restrizione

Endonucleasi che riconosce una specifica sequenza di **DNA bicatenario** e **produce due tagli**, uno in ciascun filamento, generando delle estremità 3'OH e 5' P. Sono detti enzimi di restrizione-modificazione quegli enzimi capaci sia di frammentare il DNA estraneo, sia di modificare, mediante metilazione, il DNA in modo tale che l'enzima non possa riconoscerlo e digerirlo.

Gli enzimi di restrizione **riconoscono, nel filamento di DNA, sequenze di 4÷6 basi** che hanno simmetria rotazionale e vengono indicate come sequenze palindromiche, in analogia alle frasi che possono essere lette indifferentemente in un verso e nel verso opposto.

Le disposizioni dei tagli sono diverse: o si verificano nel centro di simmetria della sequenza e si generano così frammenti **con estremità piatte** (*blunt ends*), o sono situati in modo asimmetrico rispetto alla linea di simmetria e si generano così **estremità protrudenti** (*sticky ends*).

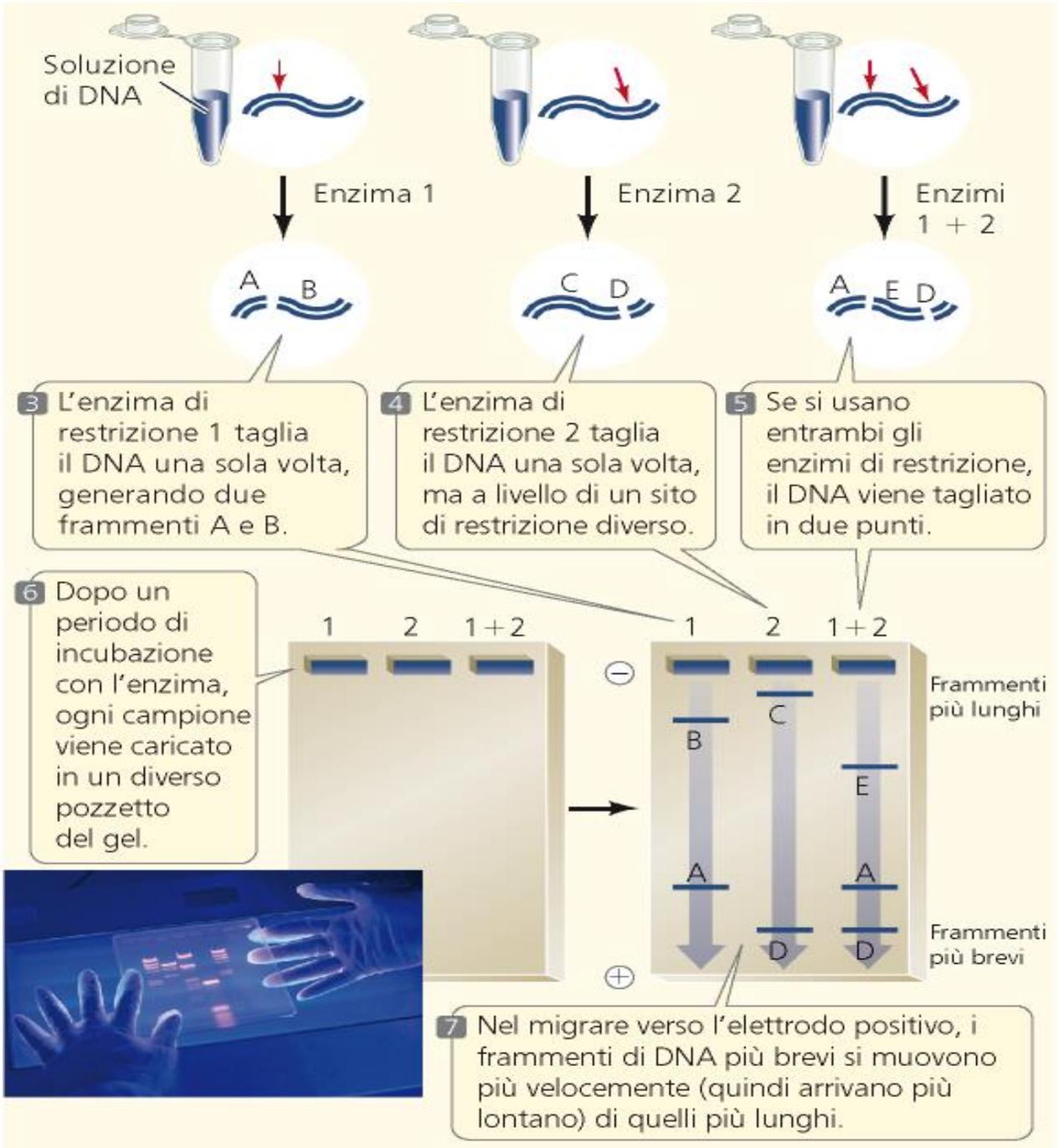
I **frammenti di DNA** di differente lunghezza, ma con estremità identiche, generata da un singolo enzima di restrizione è evidenziata per **separazione mediante elettroforesi su gel di agarosio**; i frammenti si separano su gel perché migrano a una velocità che è funzione del loro peso molecolare.

Confrontando fra di loro le dimensioni dei frammenti di DNA ottenuti dal trattamento con una combinazione di vari enzimi di restrizione, si può determinare l'ordine relativo delle sequenze di riconoscimento (siti di restrizione) presenti nella molecola e stimare anche il numero di nucleotidi presenti fra un sito e il successivo. Si ottiene in tal modo un diverso tipo di mappa cromosomica chiamata mappa di restrizione.

ENZIMI DI RESTRIZIONE

Enzima	Organismo di origine	Sito di riconoscimento in DNA a doppio filamento	Struttura dei prodotti del taglio
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		<p>sporgenza 5'</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		<p>sporgenza 3'</p>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<p>estremità netta</p>
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		<p>estremità netta</p>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		<p>sporgenza 5'</p>

Digestione con enzimi di Restrizione



Uso degli enzimi di restrizione

- Clonaggio
- Mappa di restrizione
- Polimorfismi di restrizione (RFLP)

Il metodo Sanger

(o metodo a terminazione di catena)



Nel sequenziamento a terminazione di catena la reazione oltre ad

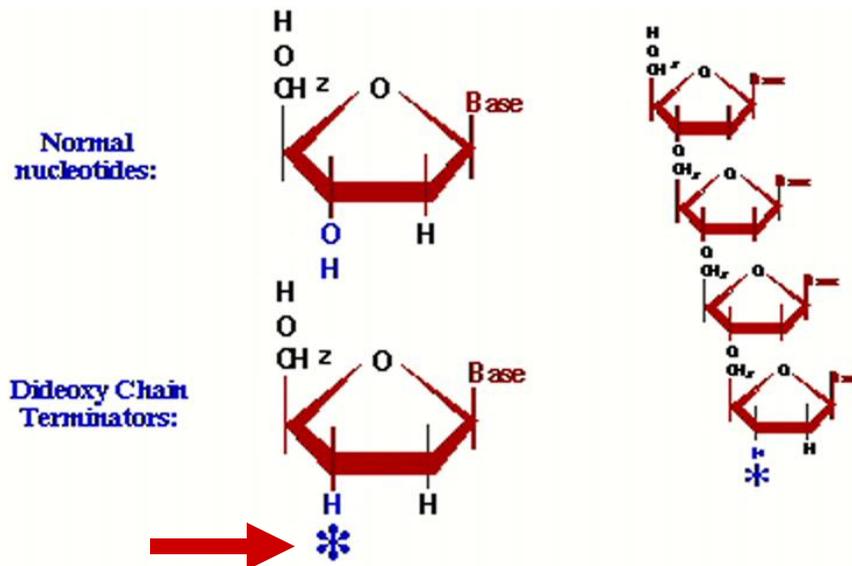
- uno stampo a singola elica
- un innesco specifico (primer)
- la marcatura con un dNTP* marcato, di solito con ^{35}S

ha bisogno di:

- una miscela di ddNTP, uno per ogni reazione di sequenza

Terminazione della catena

La sintesi del filamento complementare, tuttavia non prosegue indefinitamente, perché la miscela di reazione contiene, in quattro distinte reazioni piccole quantità di specifici dideossi nucleotidi trifosfati, ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP, che bloccano l'allungamento perché posseggono un solo atomo di idrogeno al posto del gruppo -OH in 3'



PRIMER

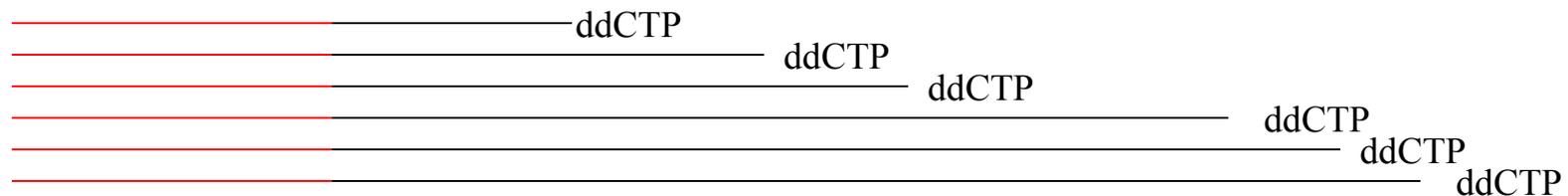


+ ddNTP (per es. ddCTP)

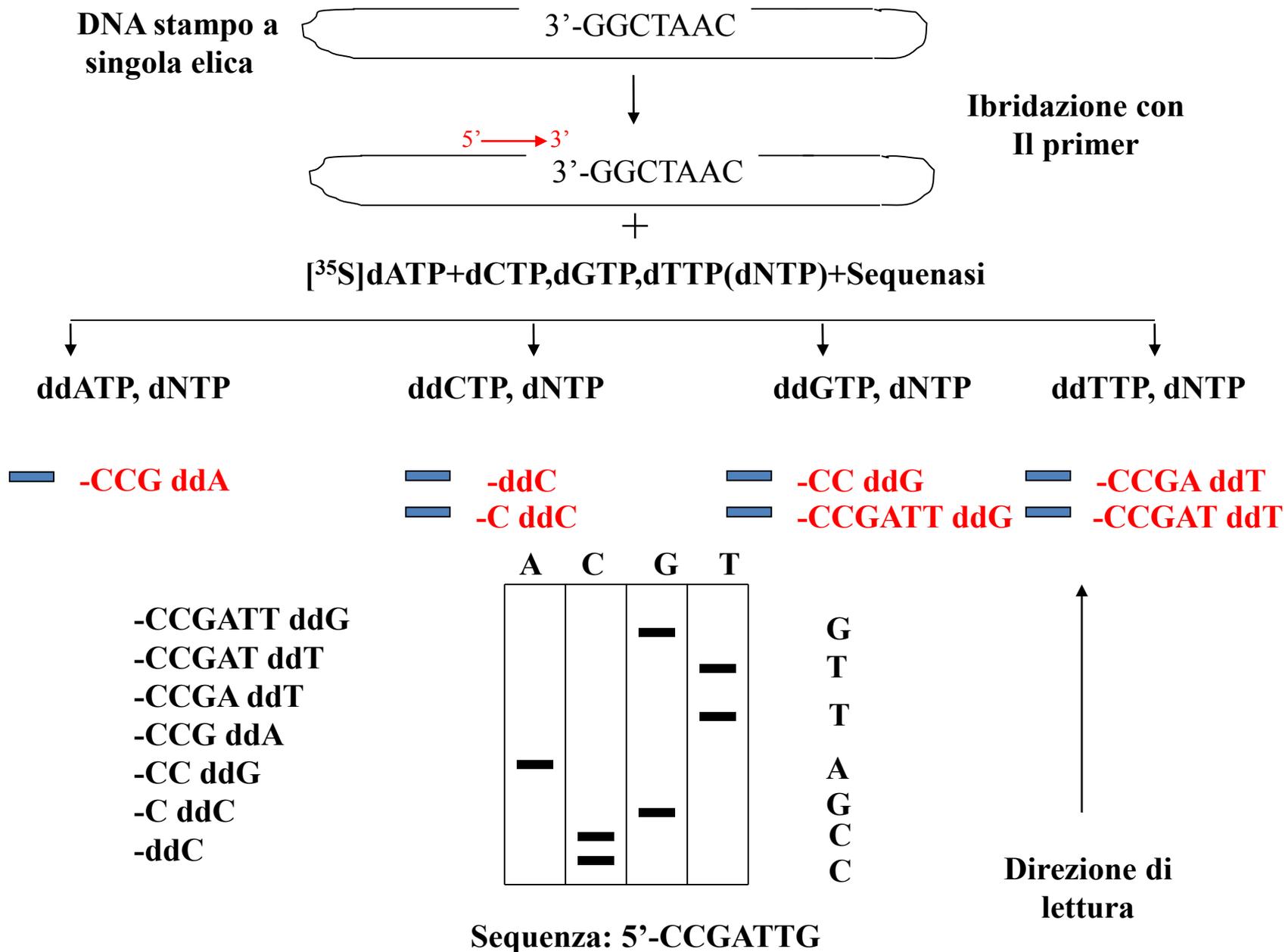
STOP



Il risultato è una serie di frammenti interrotti ciascuno
in corrispondenza di ogni dCTP



Schema di sequenziamento a terminazione di catena



Sequenziamento manuale

Pratica ormai superata dal seq. automatico

Marcatura Radioattiva

Primer marcati con ^{32}P oppure
 ^{35}S dNTP

Colorazione Silver Staining

Evidenzia direttamente su gel le bande senza ulteriori modificazioni,
attraverso la precipitazione di Ag