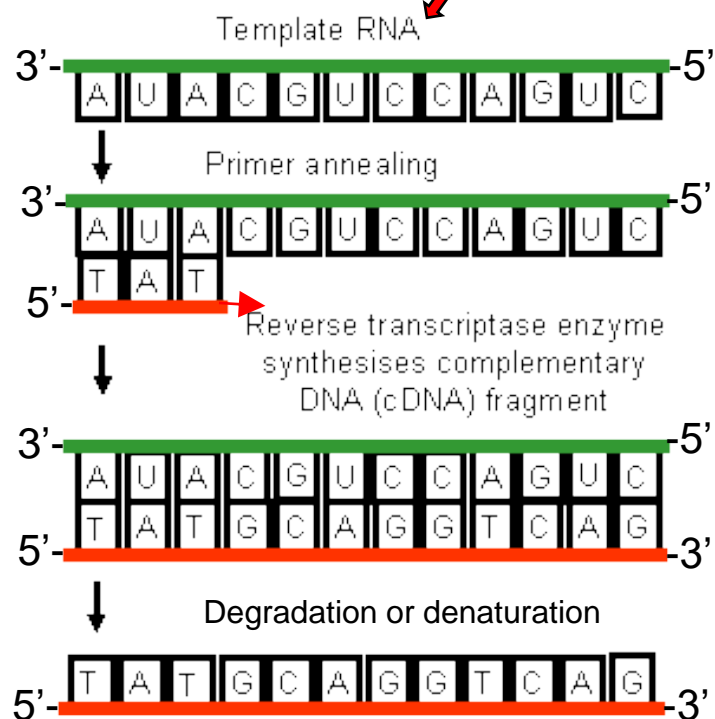
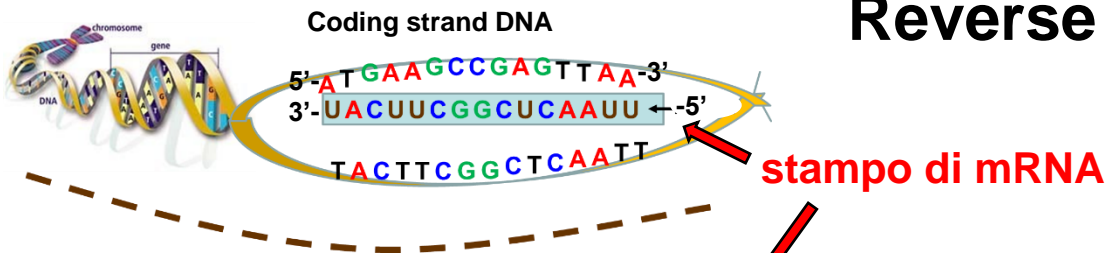


Reverse Transcription (RT)



PCR

Nella trascrizione inversa un DNA a singolo filamento complementare (cDNA) viene sintetizzato in base alla sequenza di RNA stampo.

Un'estensione della tecnica della reazione di PCR prevede l'aggiunta di una fase di trascrizione inversa (RT) prima della PCR vera e propria, permettendo di applicare l'efficacia di questa tecnica anche all'amplificazione di molecole di RNA.

La fase di trascrizione inversa richiede un *primer* (oligonucleotide) per iniziare la reazione di polimerizzazione ed un enzima specifico: **la trascrittasi inversa**.

La transcriptasi inversa è stata scoperta da Howard Temin presso l'Università del Wisconsin-Madison in virioni di **virus respiratorio sinciziale** (VRS), e isolati in modo indipendente da David Baltimore nel 1970 da due virus ad RNA tumorali: **murine leukemia virus** (MLV) e di nuovo RSV. Per i loro successi, hanno condiviso il premio Nobel nel 1975 per la Medicina (con Renato Dulbecco).



David Baltimore



Renato Dulbecco



Howard M. Temin

Prize motivation: "for their discoveries concerning the interaction between tumor viruses and the genetic material of the cell"

Reverse Transcriptases

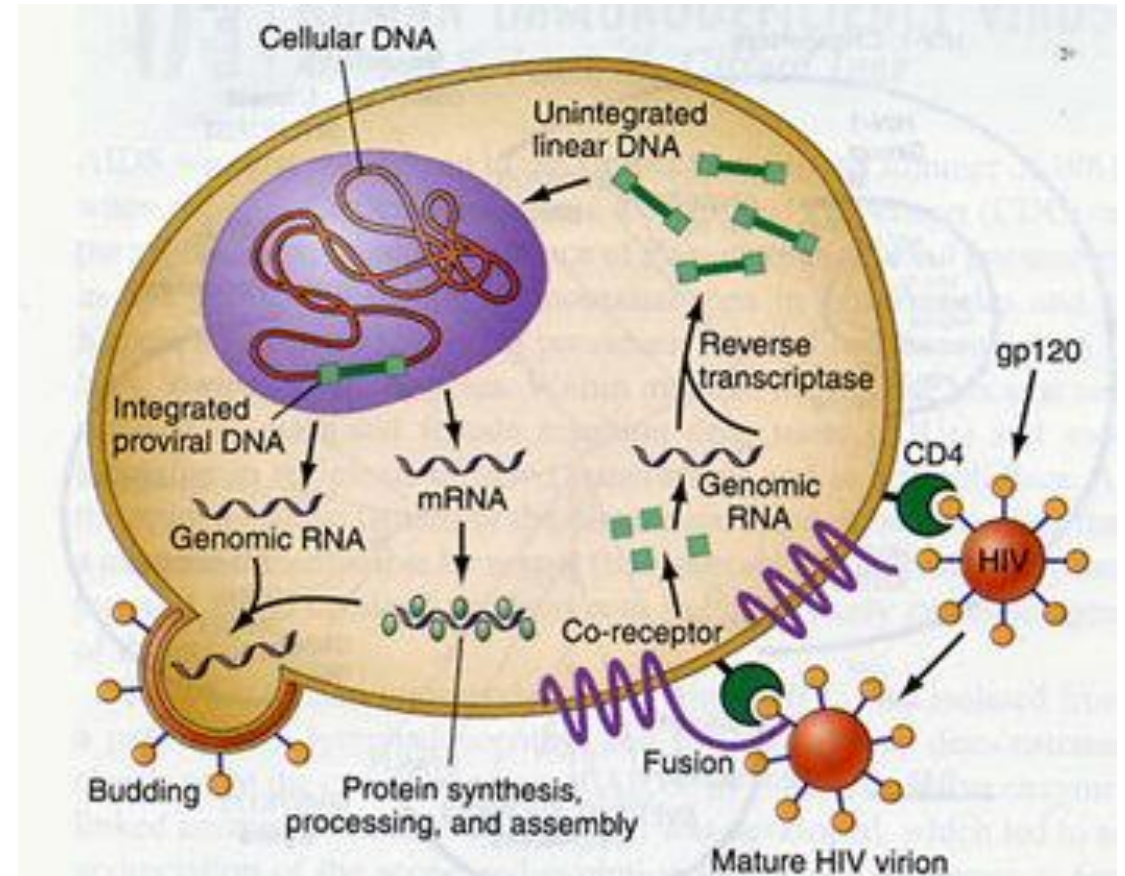
È un enzima utilizzato per generare DNA complementare (cDNA) da una molecola di RNA stampo, un processo associato:

1. a **retrovirus** (inibitori di RT sono ampiamente utilizzati come farmaci antiretrovirus)
2. a **telomerasi**, un enzima adibito alla replicazione delle estremità dei cromosomi e di alcuni elementi genetici mobili (retrotrasposoni, particolarmente abbondanti nelle piante, di cui costituiscono una frazione consistente dell'intero genoma, e nei mammiferi, compresi gli esseri umani, es. sequenze LTR).

Ha tre attività biochimiche sequenziali:

- DNA polimerasi RNA-dipendente**
- ribonucleasi H**
- DNA polimerasi DNA-dipendente**

Queste attività sono tipiche dei retrovirus per convertire l'RNA genomico a singolo filamento in DNA a doppio filamento per la successiva integrazione nel genoma dell'ospite



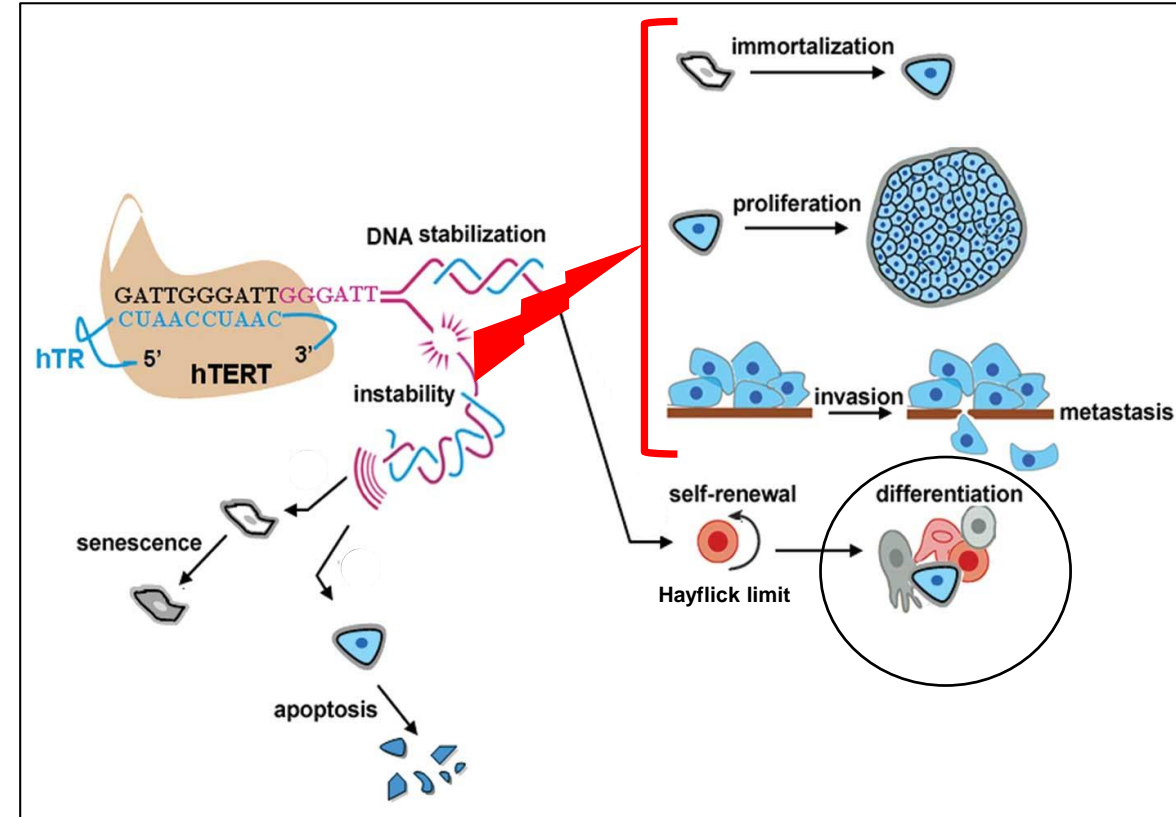
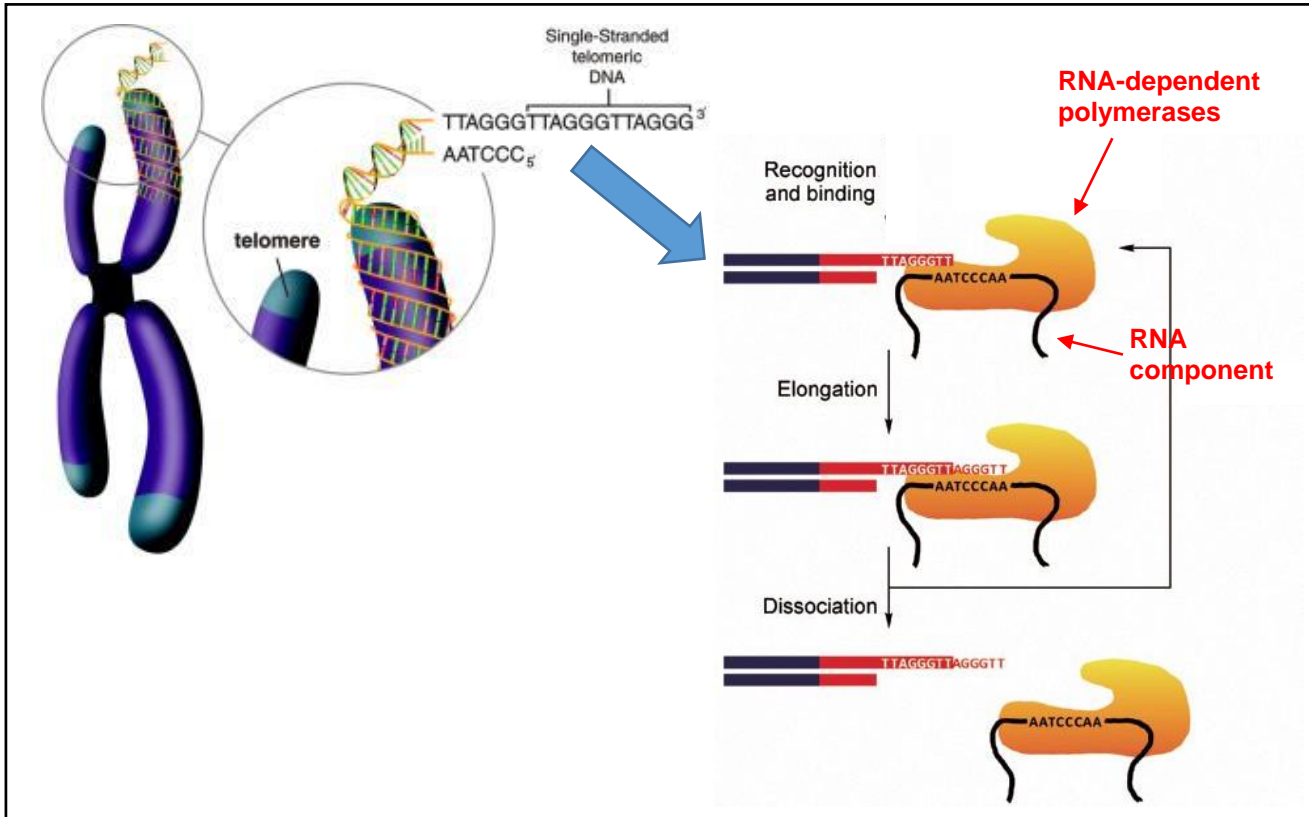
Reverse Transcriptases

La reazione di RT è ampiamente utilizzata in laboratorio per convertire molecole di RNA in DNA con applicazioni per il clonaggio molecolare, l'RNA-sequencing, la PCR, e l'analisi dell'espressione genica in genere.

Le transcriptasi inverse includono:

- 1. *Telomerase reverse transcriptase*** che mantiene la lunghezza corretta dei telomeri nei cromosomi eucariotici
- 2. *HIV-1 reverse transcriptase*** del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (PPB 1HIV) formata da due subunità, del peso molecolare di 66 e 51 kDa
- 3. *AMV reverse transcriptase*** del virus della mieloblastosi aviaria, come l'HIV è costituito da due subunità, una 63 kDa e una di 95 kDa
- 4. *M-MLV reverse transcriptase*** del I virus della leucemia murina di Moloney, un singolo monomero di 75 kDa

Telomerase reverse transcriptase

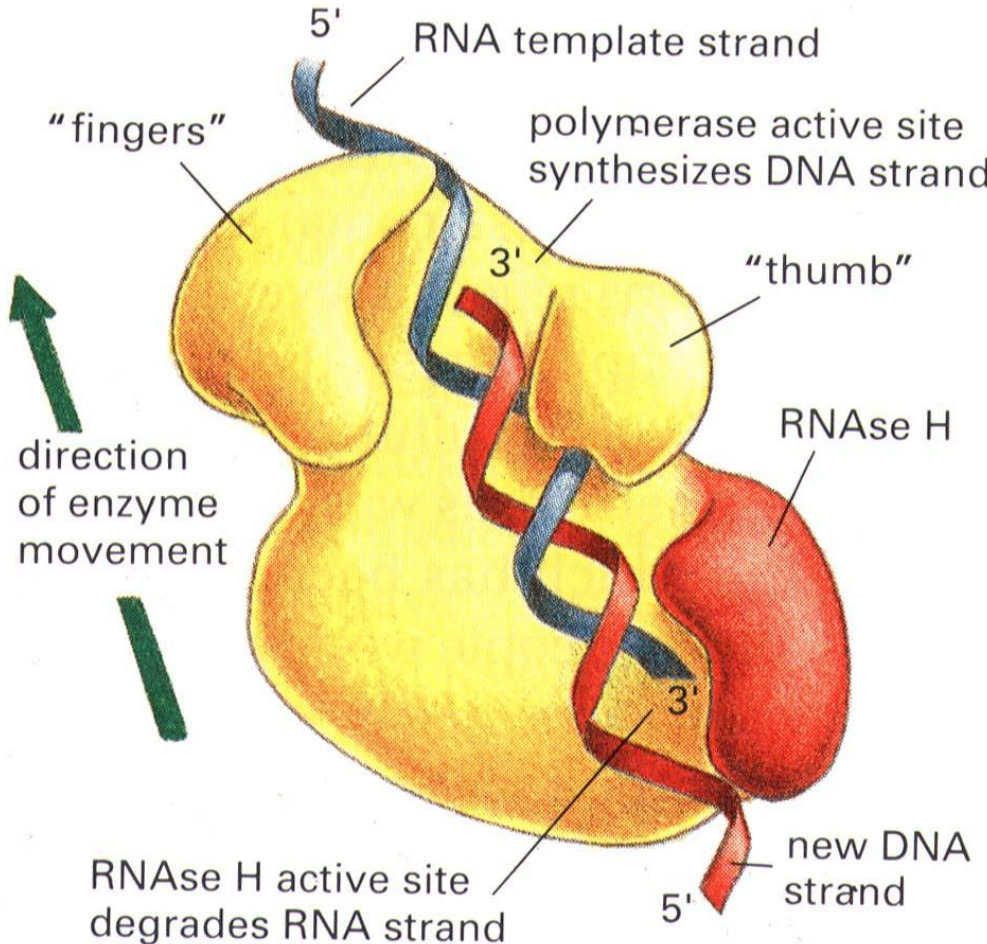
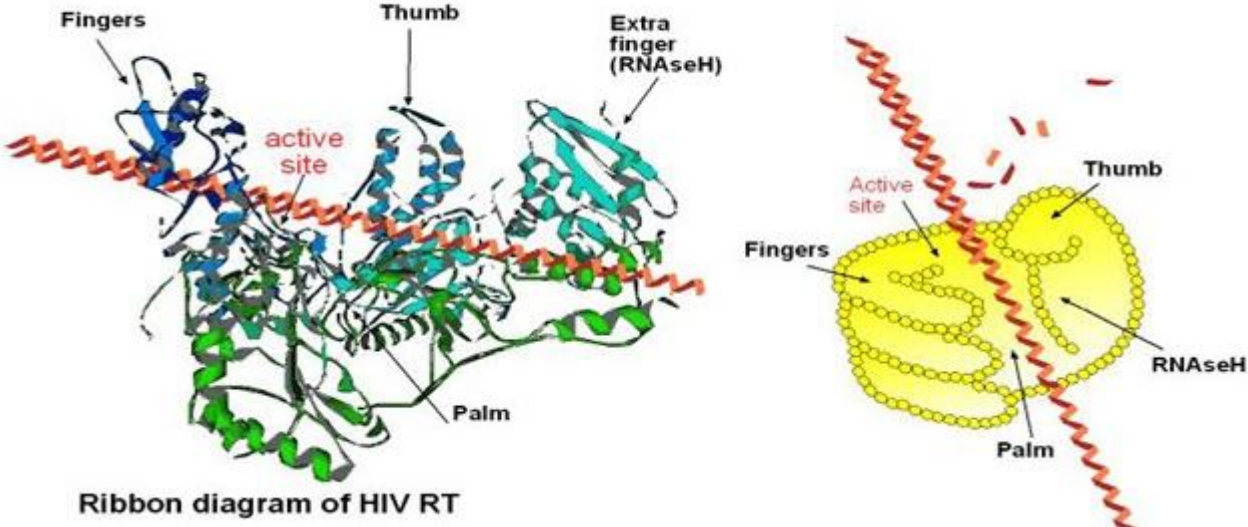


La **Telomerasi trascrittasi inversa (TERT)** è un complesso costituito da una subunità catalitica una polimerasi RNA-dipendente e **una componente della telomerasi di RNA (TERC)**, ed è responsabile dell'aggiunta di nucleotidi in sequenze TTAGGG poste alle estremità dei telomeri dei cromosomi, usando la porzione di l'RNA componente come un stampo e innesco della reazione di polimerizzazione per la ripetizione dei telomeri.

Questa aggiunta di ripetizioni di sequenze di DNA previene la degradazione del cromosoma durante i cicli di replicazione cellulare. Man mano che la cellula diventa senescente e il numero di divisioni cellulari si avvicina al limite di Hayflick (il numero di volte che una popolazione di cellule normali si dividerà) queste regioni cromosomiche diventano instabili, vengono persi dei frammenti durante la divisione e le cellule diventeranno postmitotiche e apoptotiche. Quando invece riescono a superare questo limite e continuano a dividersi diventano potenzialmente immortali, è il caso delle cellule cancerose.

L'assenza di questo enzima hTERT (conseguente ad alterazioni cromosomiche) è associate alla malattia Cri du chat.

HIV-1 reverse transcriptase



Come molte altre DNA polimerasi, RT ha bisogno di un primer e uno stampo: l'RNA genomico è a più filamenti, e il primer per la sintesi del primo filamento di DNA (il filamento meno) è un *tRNA host* della cellula ospite, il cui 3' è abbinato ad un sequenza complementare vicino all'estremità 5' dell'RNA virale chiamato il sito di legame di primer (PBS). Diversi retrovirus utilizzano diversi tRNA host come primer. HIV-1 usa Lys3.

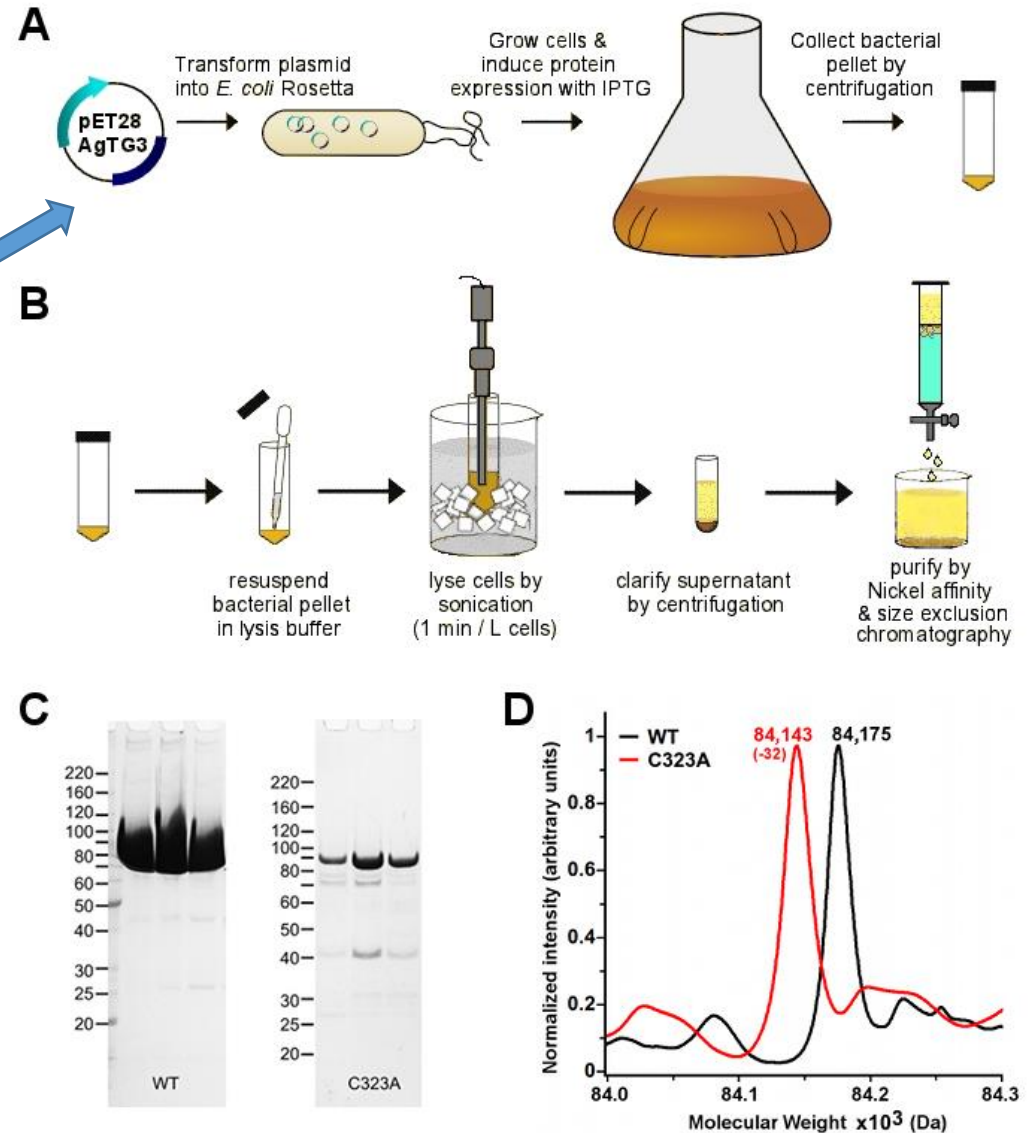
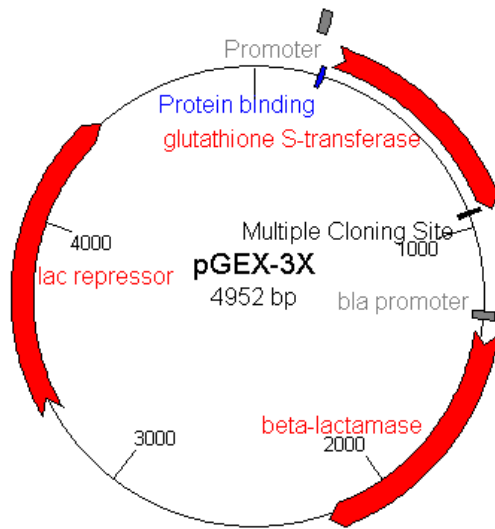
Questa trascrittasi inversa ha un alto tasso di errore, a differenza di molte altre DNA polimerasi, non ha alcuna capacità di correzione di bozze. Questo alto tasso di errore consente di accumulare mutazioni nelle repliche di DNA che produce.

Le transcriptasi inverse disponibili in commercio (modificate per creare proteine ricombinanti in laboratorio) presentano invece tassi di errore nel range di 1 a 17.000 basi per AMV e 1 a 30.000 basi per M-MLV.

<https://www.youtube.com/watch?v=7oy1zIIWmM>

Cloning of HIV-1 reverse transcriptase

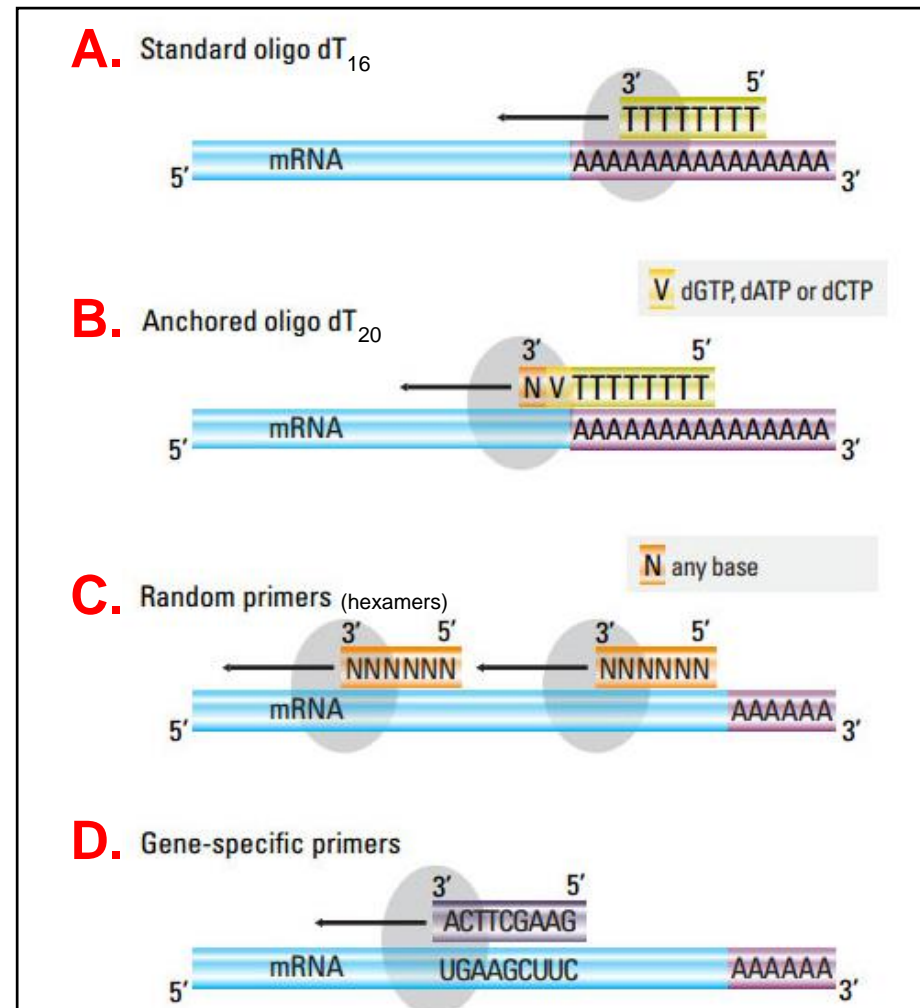
1. La regione che codifica per la GST (glutathione S-transferasi) è stato rimossa dal plasmide
2. L'amplificato delle due ORF RT66 e RT51 (delle due subunità della transcriptasi) è stato clonato
3. I due nuovi vettori ricombinanti sono state espresse in *E. coli*
4. attività di purificazione e di test di funzionalità dell'enzima



Cloning, Expression, Purification, Determining Activity of Recombinant HIV-1 Reverse Transcriptase
 Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42 : 231 - 239 (2008)

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PGEX-3X_cloning_vector.png

in vitro reverse transcription reactions



<https://www.youtube.com/watch?v=68zTyjeUsqY>

Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase

Protocol

1. Use **2 µg of RNA** and **primer** to the RNA sample (ratio 0.5 µg primer/µg RNA in a total volume of **≤11 µl** in water)
2. Heat to **70°C for 5 min**
3. Chill the tube **on ice for 5 min** and centrifuge briefly to collect the solution at the bottom of the tub
4. Add the mix.

Transcriptase 5X Reaction Buffer	5 µl
10 mM dNTP mix	2.5 µl
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	40 units
sodium pyrophosphate 40 mM	2.5 µl
AMV RT	30 units
<hr/>	
Nuclease-free water to final volume	25 µl
5. Incubate for **60 min at 42°C for oligo(dT) primers** or **at 37°C for random hexamer primers**
6. Terminate the reaction by heating at **85°C for 5 min**

Applications of AMV RT:

1. First-strand synthesis of cDNA from RNA molecules (using mix dNTPs each dATP, dCTP, dGTP and dTTP in water at 10 mM final concentration)
2. RNA-sequencing of RNA transcripts (using 2–5µCi [α -³²P]dCTP)

Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase

Protocol

1. Use **2 µg of RNA** and **primer** to the RNA sample (ratio 0.5 µg primer/µg RNA in a total volume of **≤15 µl** in water)
2. Heat to **70°C for 5 min**
3. Chill the tube **on ice for 5 min** and centrifuge briefly to collect the solution at the bottom of the tub
4. Add the mix.

5X Reaction Buffer	5 µl
100 mM dATP mix	1.25 µl
100 mM dCTP mix	1.25 µl
100 mM dGTP mix	1.25 µl
100 mM dTTP mix	1.25 µl
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	25 units
sodium pyrophosphate 40 mM	2.5 µl
M-MMV RT	200 units
<hr/>	
Nuclease-Free Water to final volume	25 µl
5. Incubate for **60 min at 42°C for oligo(dT) primers** or at **37°C for random hexamer primers**
6. Terminate the reaction by heating at **85°C for 5 min**

Applications of AMV RT:

1. First-strand synthesis of cDNA from RNA molecules

Note: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) **can be used in cDNA synthesis with long messenger RNA templates (>5 kb)**. M-MLV RT is the preferred reverse transcriptase for long mRNA templates, because the RNase H activity of M-MLV RT is weaker than the commonly used (AMV RT)

H Minus reverse transcriptase

Protocol

1. Use **1 pg-5 µg of total; 0,1 pg-500 ng poly-A; 0,01 pg-500 ng specific) RNA** and 100 pMol both oligo(dT) and random hexamers, 15-20 pMol of specific **primer ≤14,5 µl** in water
2. Heat to **65°C for 5 min** (only for GC-rich templates)
3. Chill the tube **on ice for 5 min** and centrifuge briefly to collect the solution at the bottom of the tub

4. Add the mix.

5X Reaction Buffer	4 µl
100 mM dNTPs mix	1 µl (0,5 mM final)
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	20 units
Maxima H Minus RT	50-200 units
<hr/>	
Nuclease-Free Water to final volume	20 µl

5. Add the primer and incubate:
 - **if an oligo(dT) or gene-specific primer is used, incubate for 15-30 min at 50°C, if a random hexamer primer is used, incubate for 10 min at 25°C followed by 30 min at 50°C**
 - **for transcription of GC-rich RNA, the reaction temperature can be increased to 65°C**
6. Terminate the reaction by heating at **85°C for 5 min**

Applications of H Minus RT:

1. First strand cDNA synthesis for RT-PCR and real-time RT-PCR.
2. Reverse transcription **at elevated temperatures** to reduce effects of secondary structure.
3. Synthesis of cDNA for cloning and expression.

Note: H Minus RT was developed through *in vitro* evolution of M-MLV RT. The engineered enzyme features dramatically improved thermostability, 50x higher processivity, robustness and increased synthesis rate compared to wild type M-MLV RT.

The eliminated RNase H activity enables the enzyme to produce very long RNA transcripts up to 20 kb. Due to its high thermostability, the reaction temperature can be increased **up to 65°C** for efficient transcription of RNA regions with a high secondary structure or to improve specificity using gene specific primers. The extremely high processivity of H Minus enzyme produces a complete cDNA synthesis in 15 to 30 min and **presents an increased resistance to common reaction inhibitors, such as guanidine, formamide and ethanol** and could also **incorporate modified nucleotides.**

MultiScribe reverse transcriptase

Protocol

1. Use **RNA $\leq 1 \mu\text{g}$**
2. Heat to **60°C for 5 min**, to disrupt RNA secondary structure
3. Chill the tube **on ice for 5 min** and centrifuge briefly to collect the solution at the bottom of the tube
4. Add **1 μl** of 50 μM Oligo d(T)16, or 50 μM Random hexamers, or 10 μM gene-specific reverse **primer** and **RNasin® Ribonuclease Inhibitor 20 units**
5. Incubate for **10 min at room temperature**
6. Add the mix.

10X Reaction Buffer	2 μl
10 mM dNTPs mix (2.5 mM each)	4 μl
25 mM MgCl₂	1,4 μl
MultiScribe™ RT	50 units
Nuclease-Free Water to final volume	20 μl

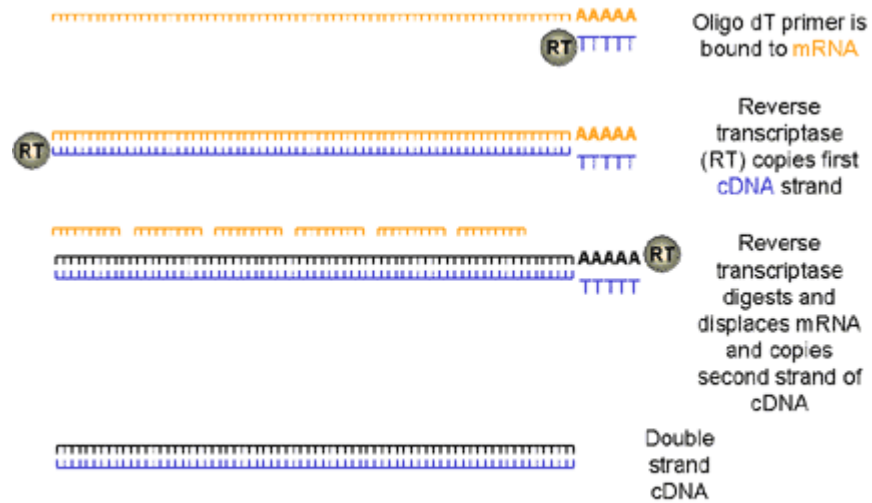
- 7. Incubate for 30 min at 48°C**
8. Terminate the reaction by heating at **98°C for 5 min**

Applications of H MultiScribe RT:

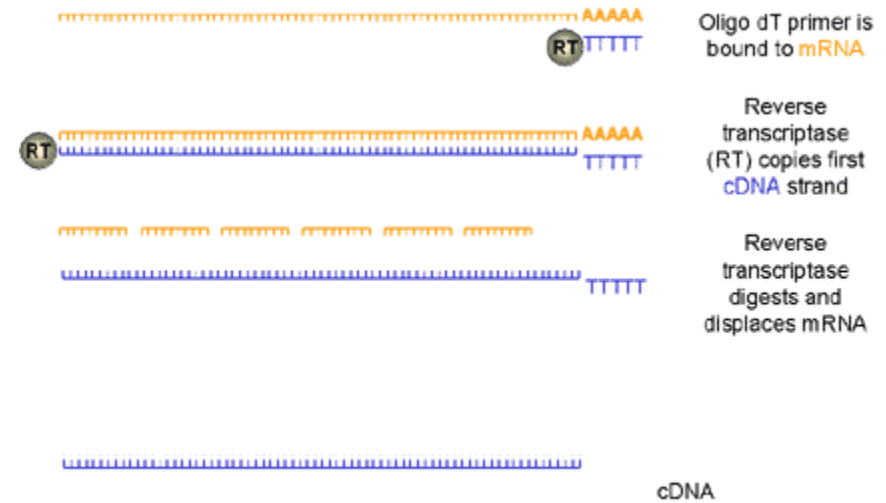
1. First strand cDNA synthesis for RT-PCR and RT-qPCR using TaqMan-based assays:
 - Compatible with one-step and two-step RT-PCR reactions, which provides flexibility in assay setup
 - Individual component design provides versatility in assay setup

Note: MultiScribe™ Reverse Transcriptase is a recombinant moloney murine leukemia virus (rMoMuLV) reverse transcriptase **that has been optimized for TaqMan-based assays. The reaction volume for the RT step can be varied from 10 to 100 μl .** A 100 μL RT reaction will efficiently convert a maximum of 2.0 μg total RNA to cDNA.

Reverse Transcription (RT) and PCR in one step



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription

* ***Tth DNA Polymerase***

Recombinant enzyme with both intrinsic transcriptase and thermostable DNA polymerase activity, a convenient solution for single tube RT-PCR (One-Step). The enzyme tolerates temperatures in range of 50-70°C for the RT reaction, and up to +95°C for the PCR, overcoming problems caused by RNA secondary structures.



PCR



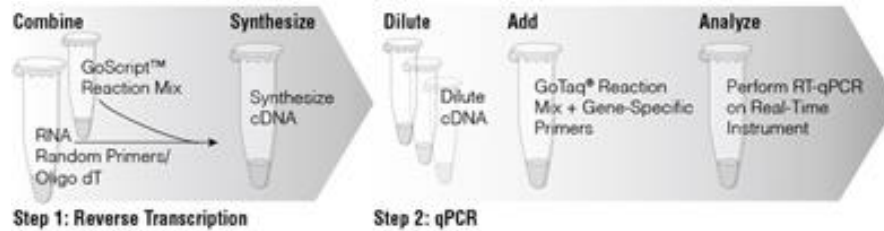
PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR)

One-Step



Two-Step



One-Step

Convenience

- Fewer pipetting steps
- Reduced chances of contamination
- High sensitivity



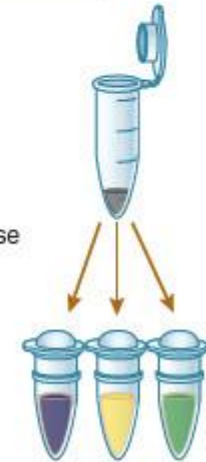
Applications

- Gel-based RT-PCR
- Ideal for analysis of large numbers of samples

Two-Step

Flexibility

- Choice of cDNA Synthesis Primer: dT, random primer, gene-specific primer
- Choice of Amplification System: higher fidelity, GC rich targets, high yield
- Choice of saving cDNA samples for later use



Applications

- Gel-based RT-PCR
- Good for detection of multiple RNA targets in a single sample

Video qPCR

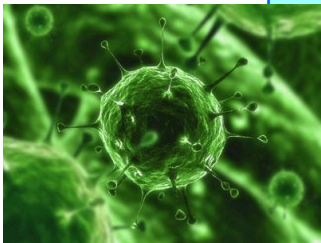
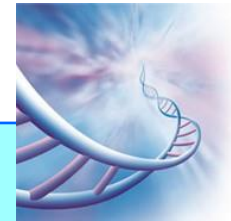
<https://www.youtube.com/watch?v=edJEY5g4X8k>

<https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4>

PCR quantitativa *real time*: applicazioni

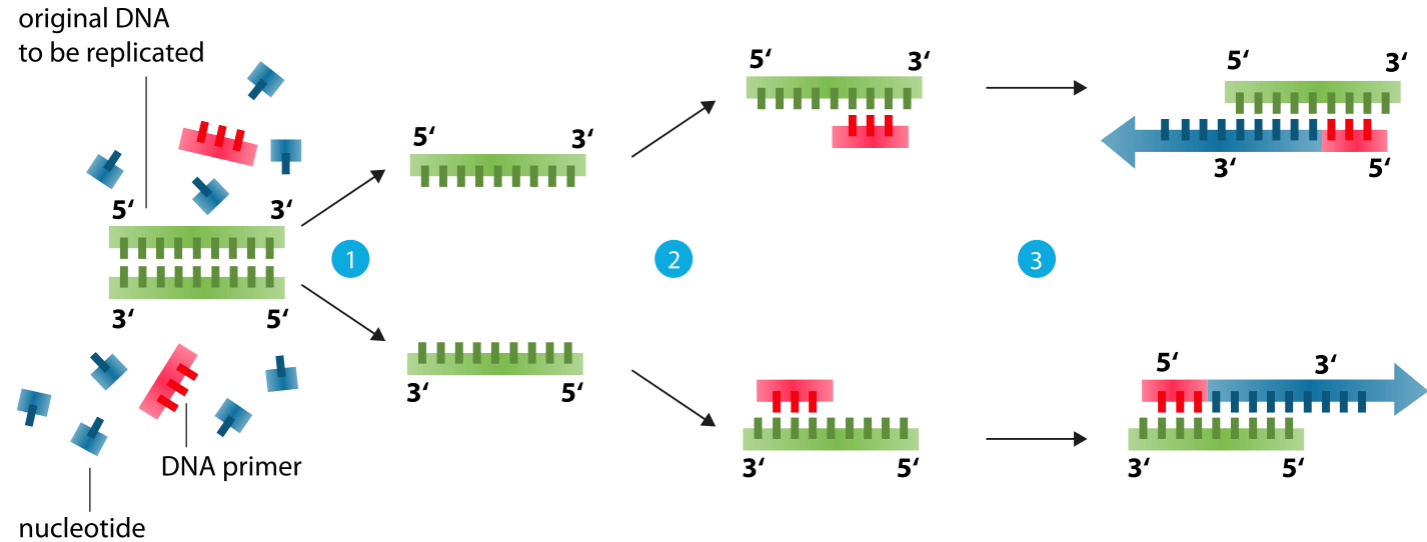
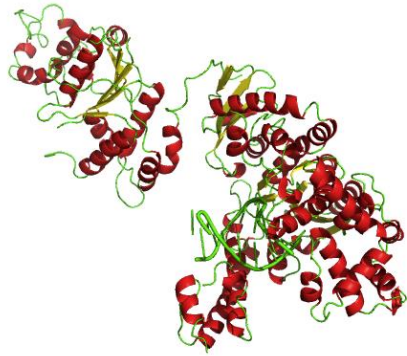
- Quantificazione dell'espressione genica
- Diagnostica in ambito medico-farmacologico
- Controllo di qualità e validazione dei saggi
- Rilevazione di agenti eziologici e quantificazione virale
- Analisi su OGM
- Genotyping
- Medicina forense e archeogenetica

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4697428/pdf/pnas.201519905.pdf>



Polymerase Chain Reaction

Taq polymerase is a thermostable DNA polymerase named after the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* from which it was originally isolated by Thomas D. Brock in 1965



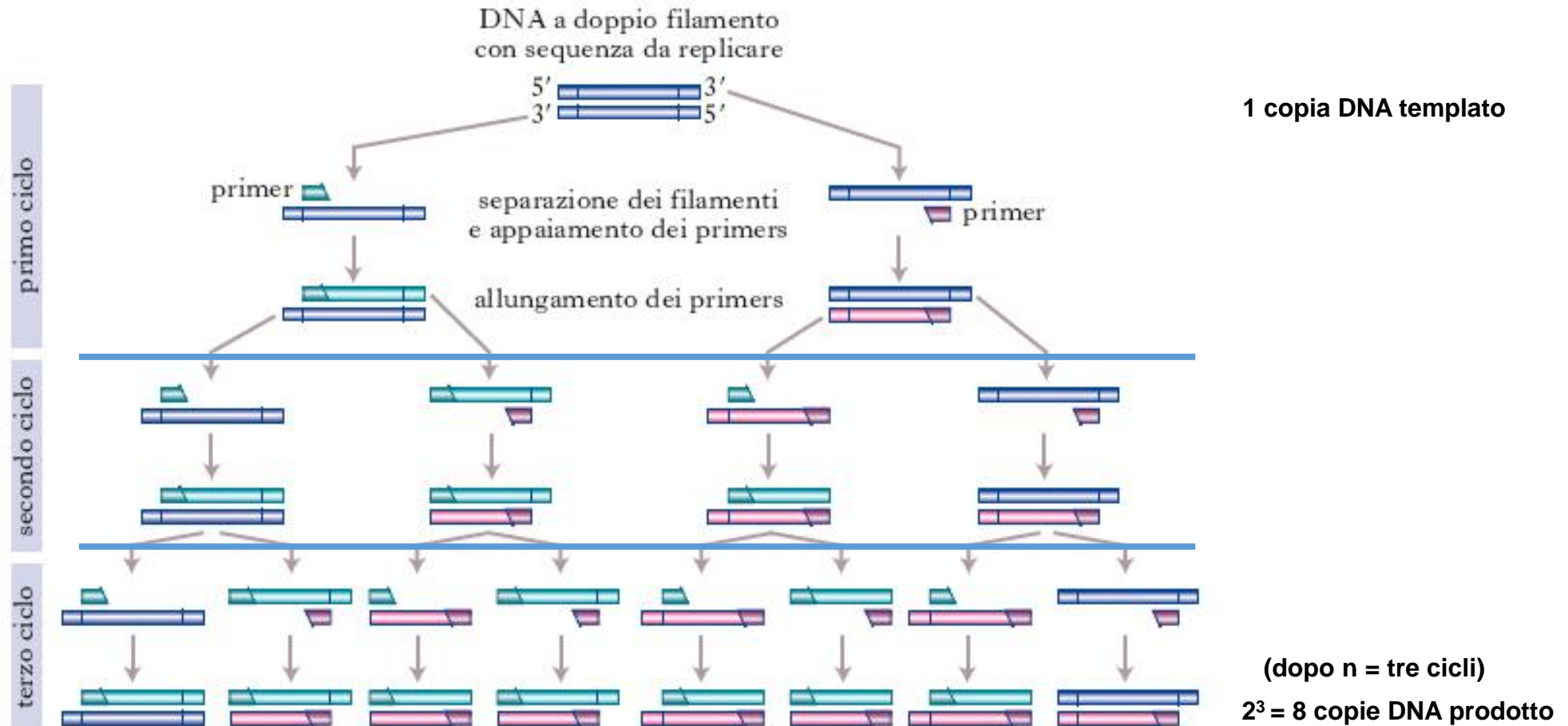
- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

- ☐ **Amplificazione *in vitro* di una sequenza di DNA *target* (bersaglio)**
- ☐ **Amplificazione selettiva, definita dalla sequenza dei *primers* disegnati e impiegati**

Title: The polymerase chain reaction.

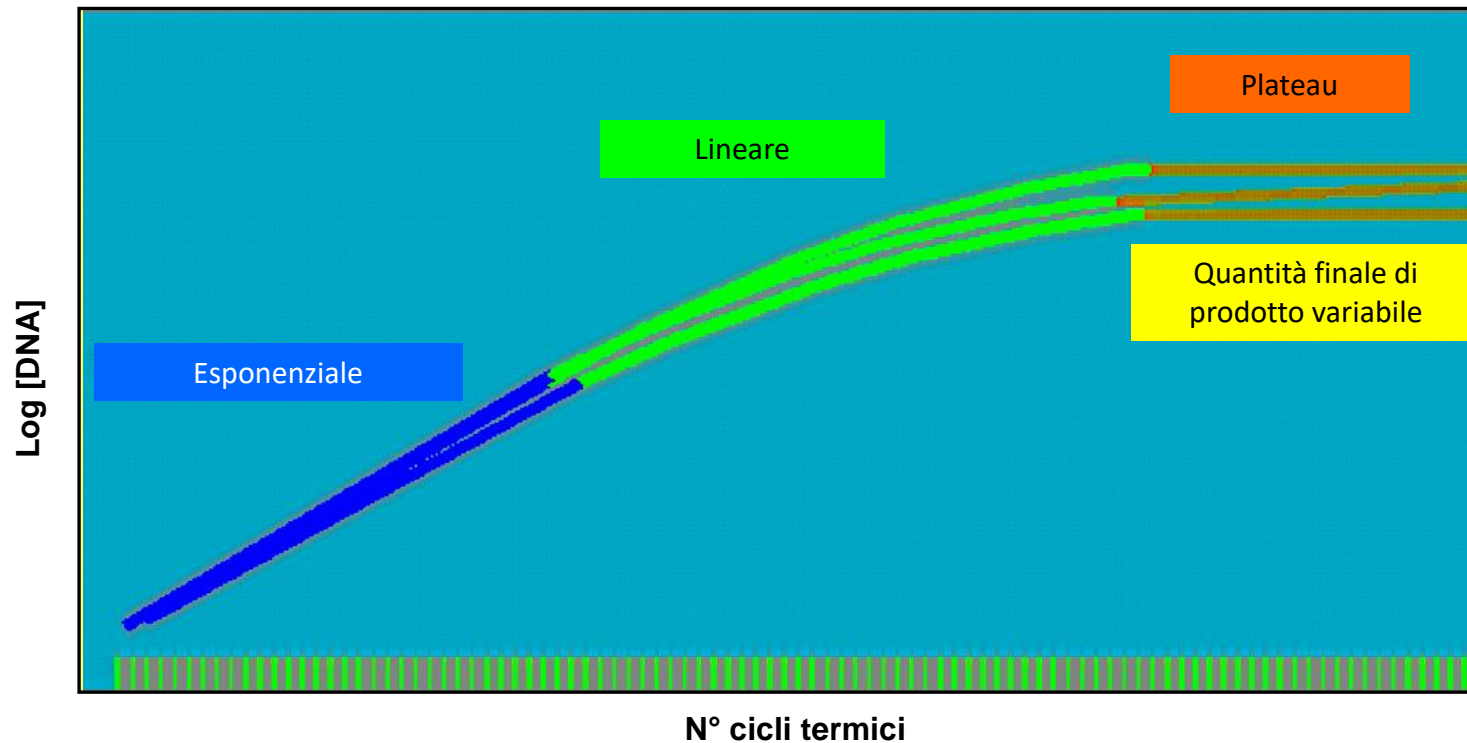
Editors: Mullis, K. B.; Ferré, F.; Gibbs, R. A. Book, The polymerase chain reaction. 1994

Polymerase Chain Reaction



copie di DNA Template $\times (2)^n =$ copie di DNA nel Prodotto di PCR

Polymerase Chain Reaction



1. progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione (es: *primers*)
2. Attività della Taq polimerasi
3. Accumulo di pirofosfati che inibiscono la polimerasi
4. *Reannealing* dei filamenti ottenuti (competizione con i *primers* stessi)

Esponenziale



In questa fase il prodotto di PCR raddoppia esattamente la sua quantità ad ogni ciclo. La reazione è molto specifica e precisa.

Lineare



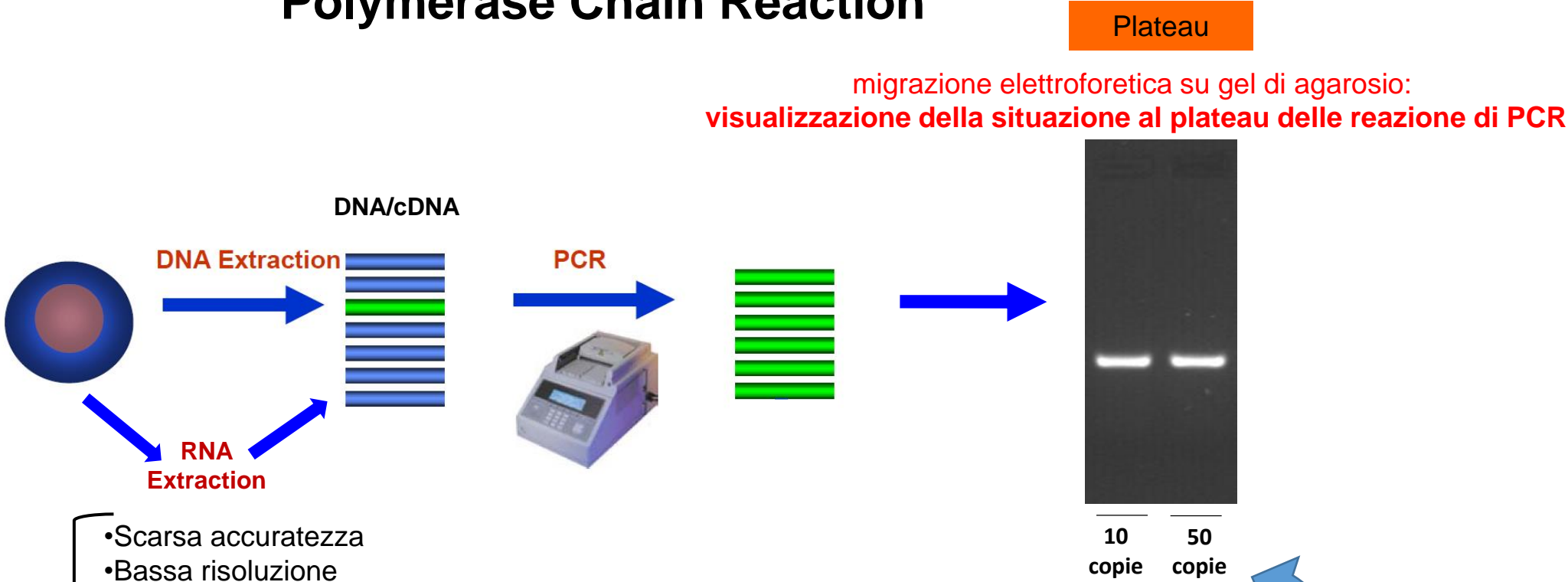
In questa fase i componenti della reazione incominciano ad essere consumati, come i *primers* inglobati nei nuovi filamenti sintetizzati e la miscela di nucleotidi. La reazione rallenta. Fase di alta variabilità.

Plateau



Fase *end-point*: procedendo con i cicli nessuna nuova molecola di DNA viene prodotta. Il processo di duplicazione non procede "all'infinito" e la reazione di amplificazione ha così termine.

Polymerase Chain Reaction

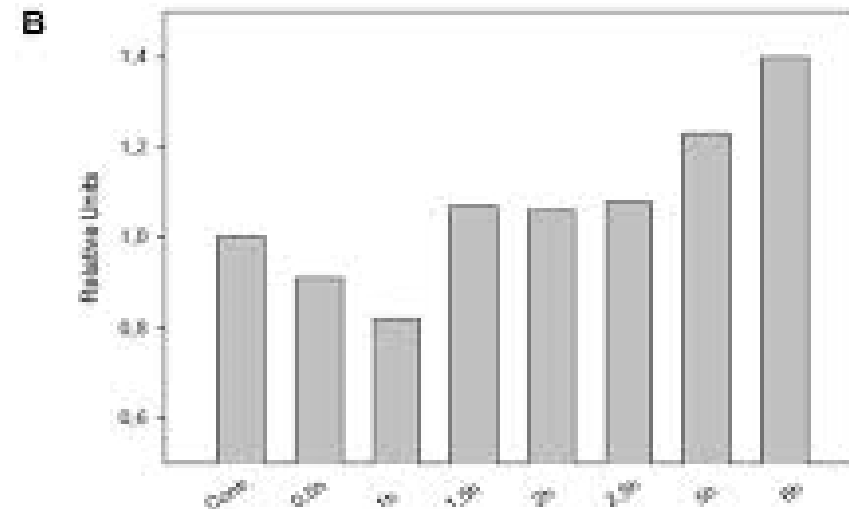
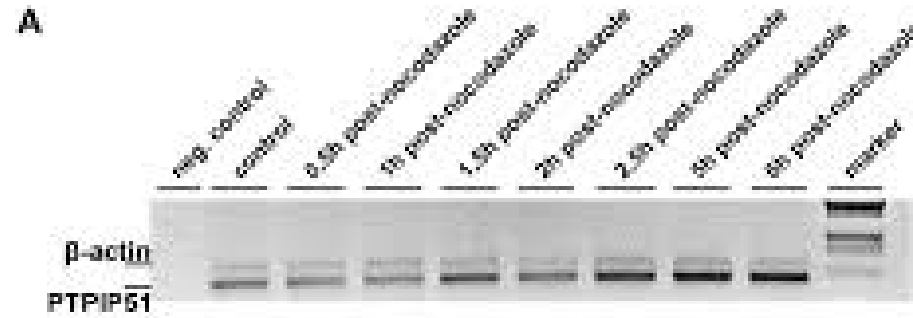


Limiti

- Scarsa accuratezza
- Bassa risoluzione
- Procedura non automatizzata
- L'etidio bromuro non è quantitativo, oltre che essere altamente tossico
- Discriminazione principalmente in base al peso molecolare
- Il risultato finale non è numericamente espresso
- **Non si ottiene un dato quantitativo, ma solo qualitativo**

non è indicativo del numero di copie di partenza nel campione

Semi-quantitative Polymerase Chain Reaction



Permette di vedere cosa succede prima del plateau:

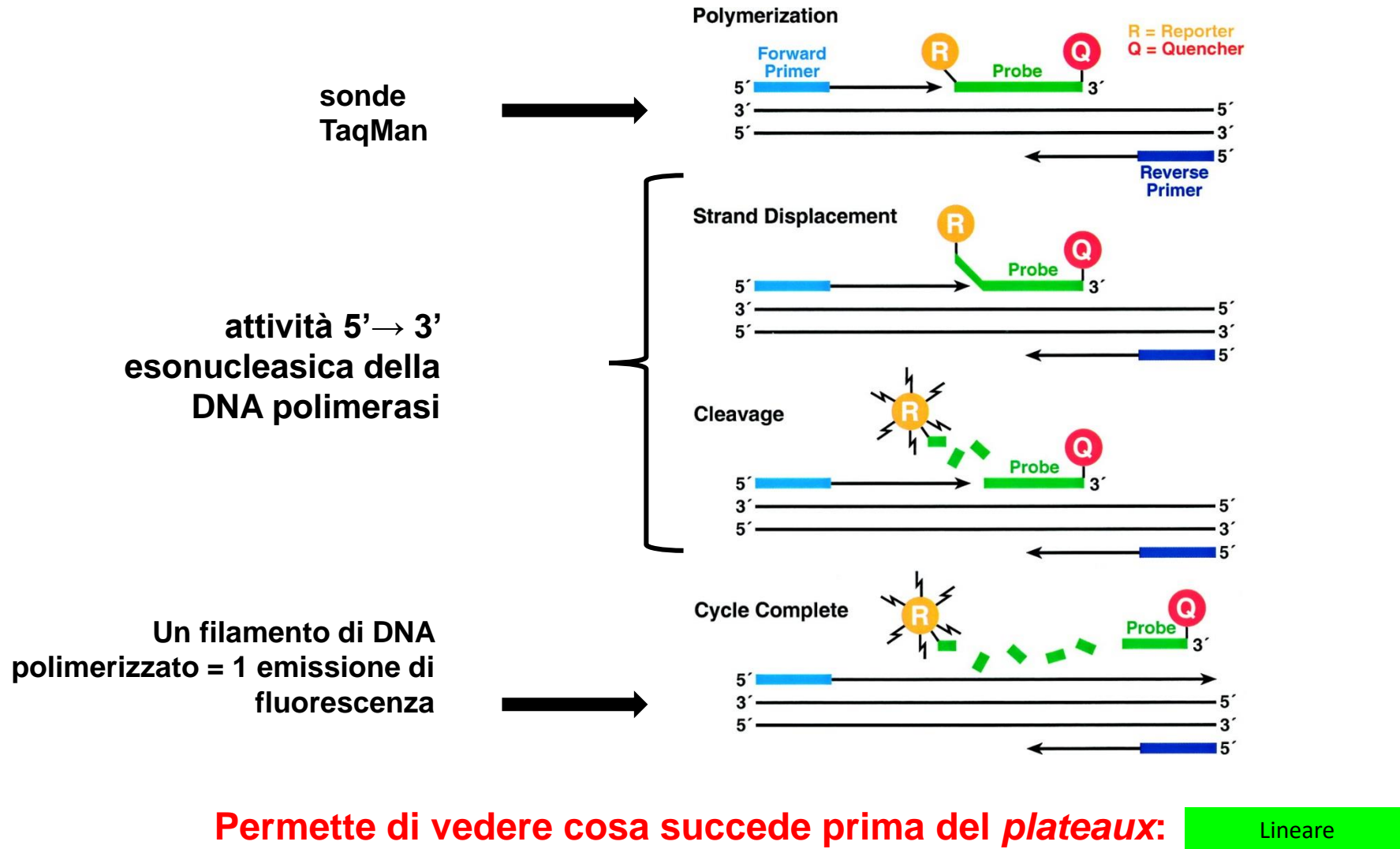
Lineare

<https://www.youtube.com/watch?v=QVeVIM1yRMU>

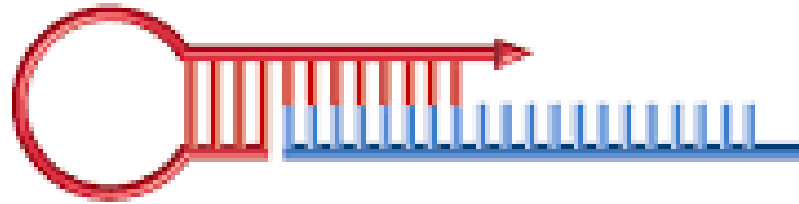
<https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4>

<https://www.youtube.com/watch?v=DNsRiFT3jBs>

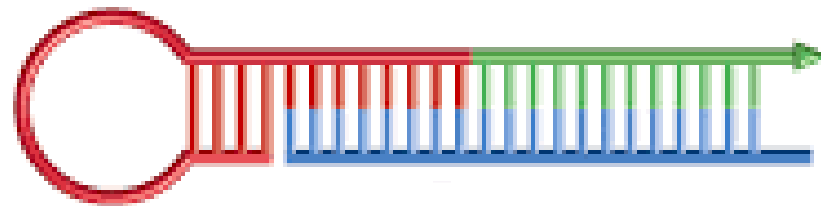
quantitative real time Polymerase Chain Reaction



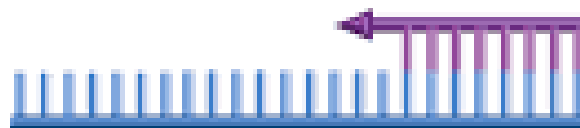
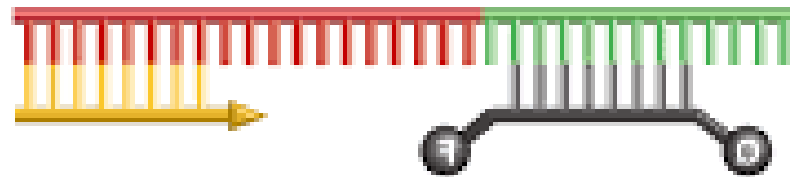
RT-qPCR analysis of microRNA expression



Anche se piccolissimi...
possono essere retrotrascritti....



Produzione cDNA



PCR quantitativa

quantitative real time Polymerase Chain Reaction

Perché *real time*?

Perché si misura l'amplificazione in tempo reale **durante ogni ciclo** di amplificazione, acquisendo i dati e consentendo di monitorare ad ogni ciclo l'andamento della reazione

Perché “quantitativa”?

Perché utilizzando i dati ottenuti durante la fase esponenziale, quando cioè l'efficienza di amplificazione non è influenzata dalle variabili di reazione e **la quantità di prodotto amplificato è proporzionale al quella del templatato iniziale**

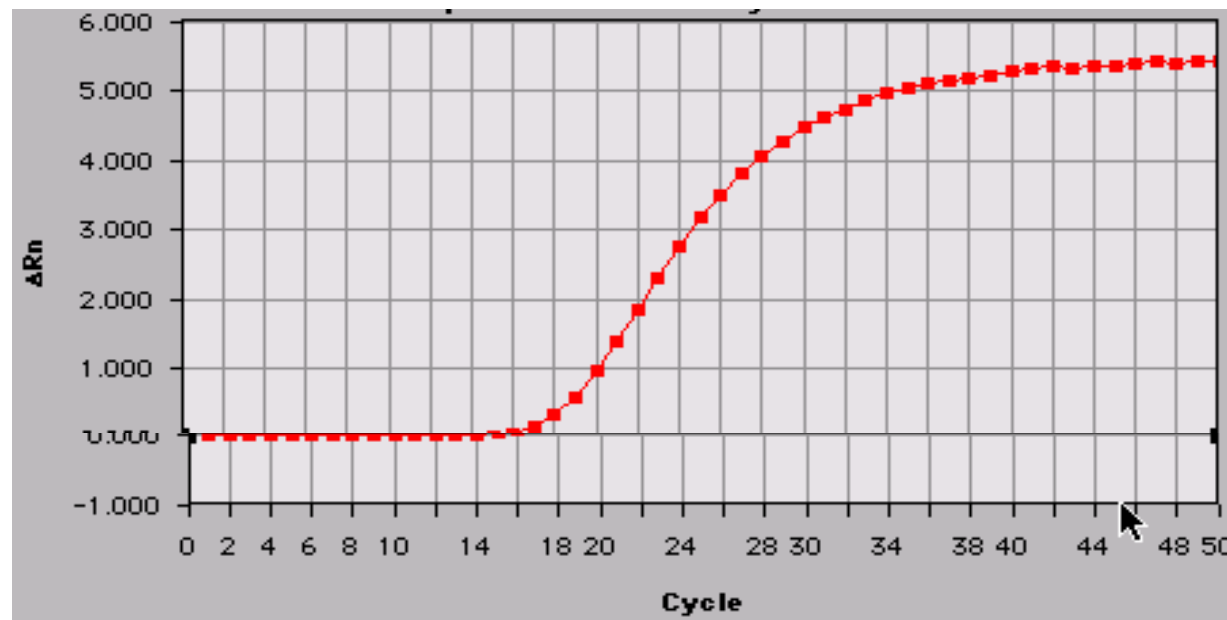
Plot di amplificazione lineare

Visualizzazione in tempo reale

(non solo al *plateau*):

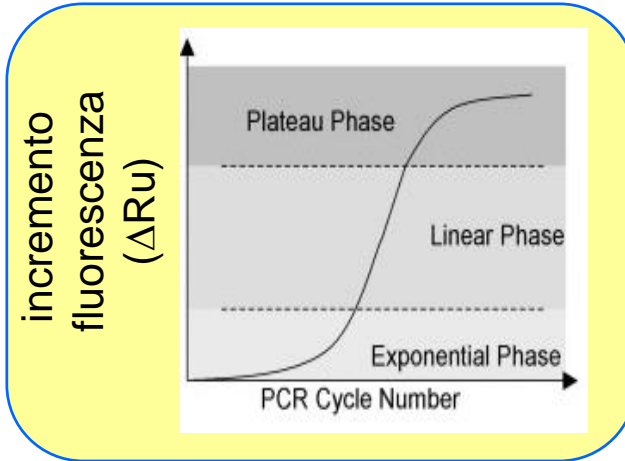
Le unità di fluorescenza emessa ad ogni ciclo, sottratta la fluorescenza di *background* (ΔR_n)

Incremento di fluorescenza

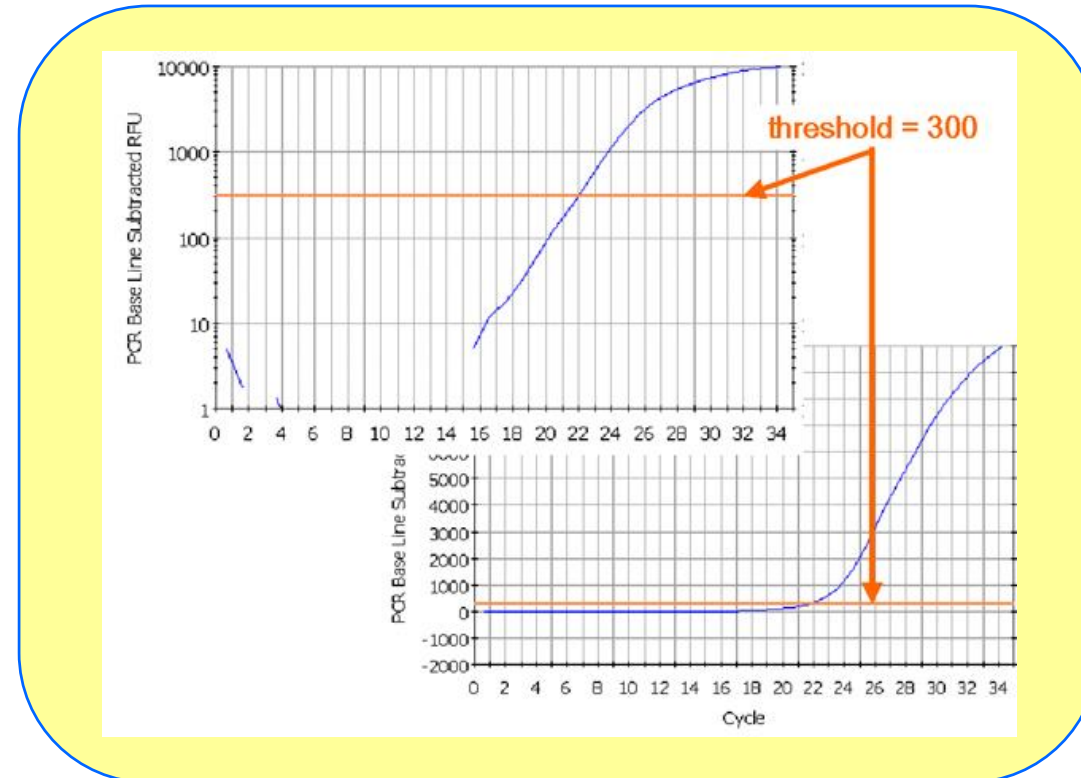
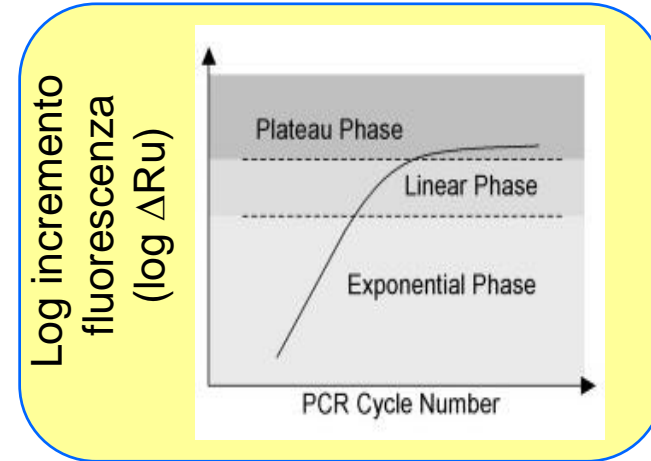


Cicli di PCR

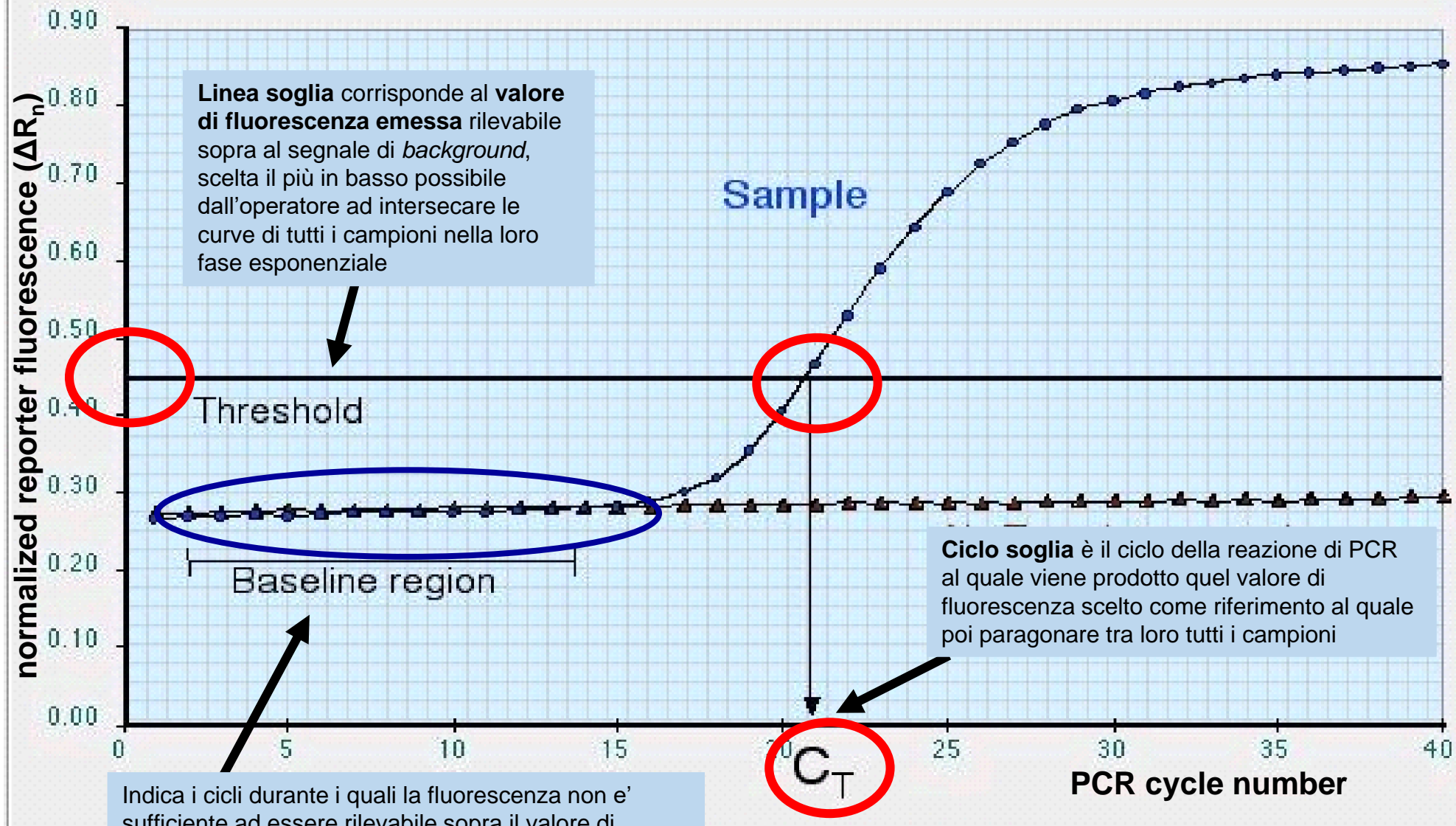
Plot di amplificazione lineare



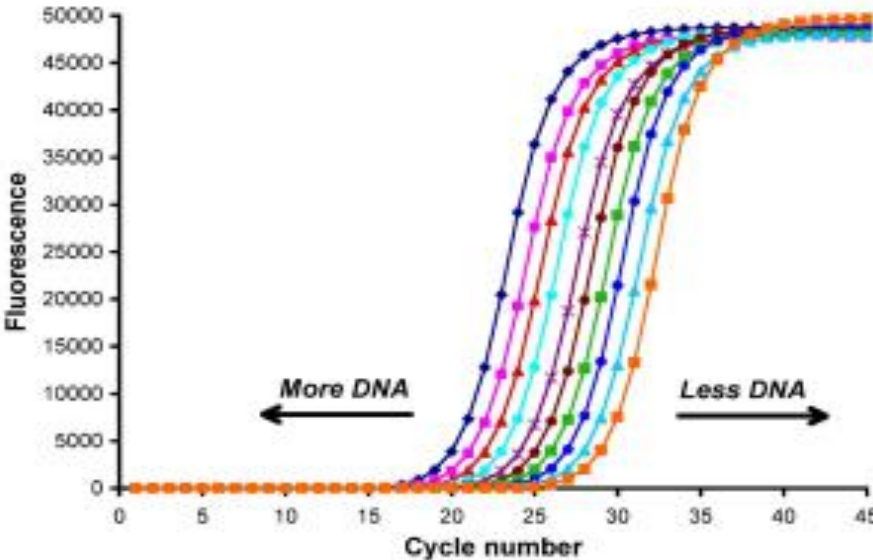
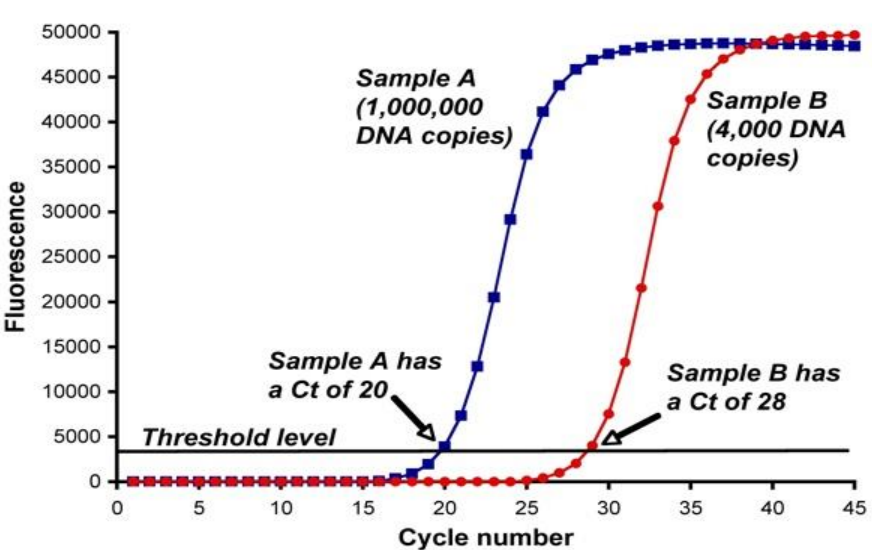
Plot di amplificazione logaritmico



Plot di amplificazione lineare



quantitative real time Polymerase Chain Reaction



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione e (definita una *threshold*) il relativo CT (*Threshold Cycle*) è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale contenuto nel campione

Quantification methods

