PCR - Polymerase Chain Reaction

*ideata nel **1983** da **Kary B. Mullis** il quale ottenne, per questo, il **premio Nobel** per la chimica (**1993**).*

Questa tecnica, utilizzando i principi della duplicazione del DNA,
permette di ottenere in poco tempo
notevoli quantità di materiale specifico

Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Related Articles, Links

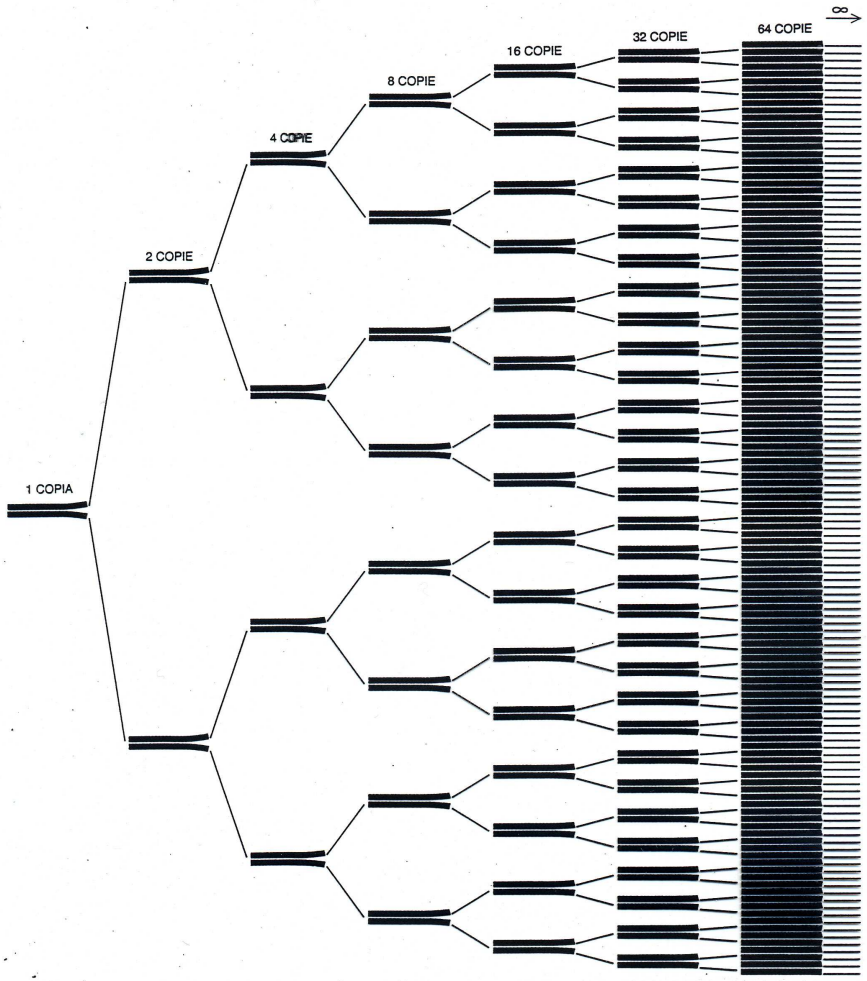
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.

Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, CA 94608.

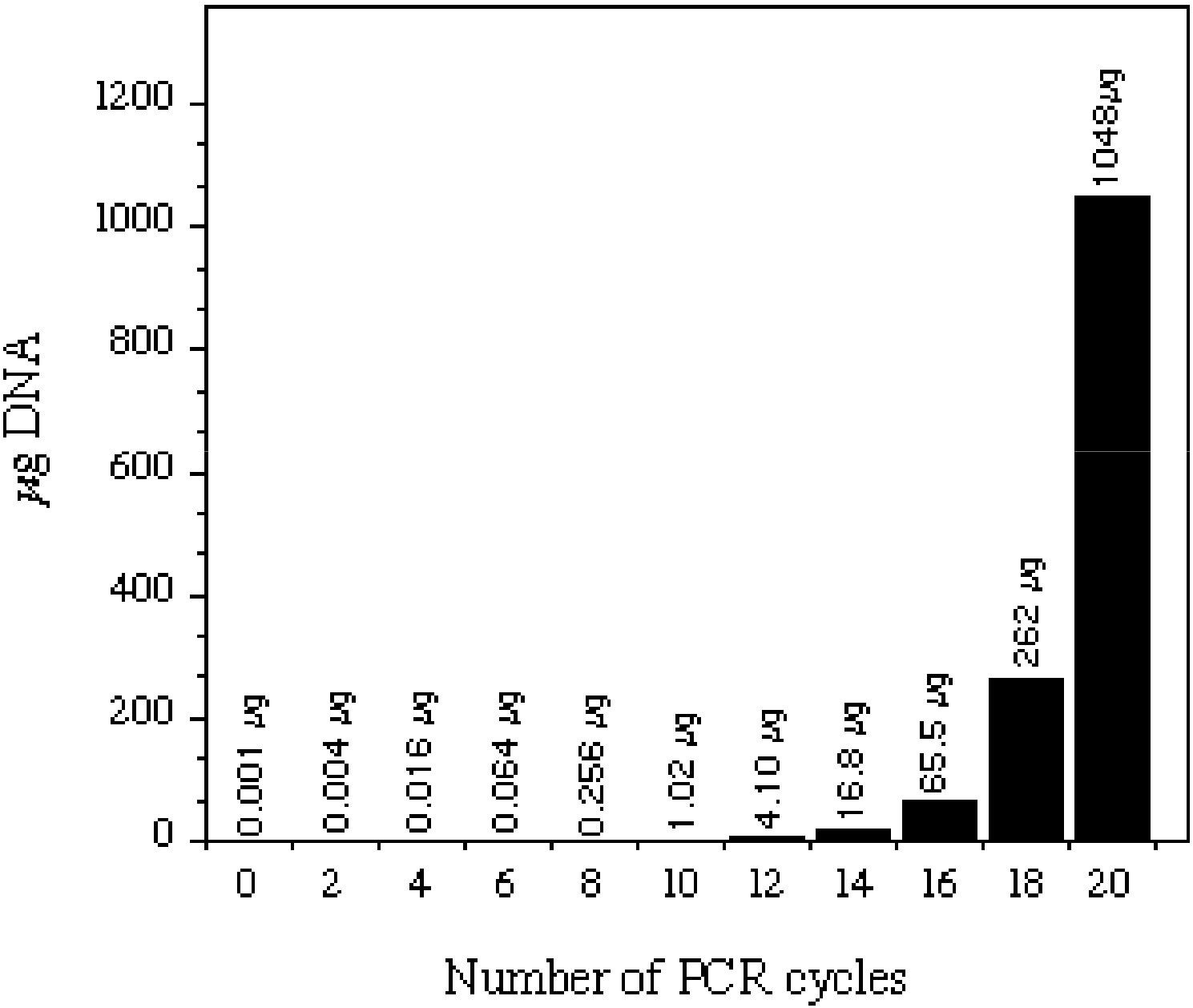
A thermostable DNA polymerase was used in an in vitro DNA amplification procedure, the polymerase chain reaction. The enzyme, isolated from Thermus aquaticus, greatly simplifies the procedure and, by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures, significantly improves the specificity, yield, sensitivity, and length of products that can be amplified. Single-copy genomic sequences were amplified by a factor of more than 10 million with very high specificity, and DNA segments up to 2000 base pairs were readily amplified. In addition, the method was used to amplify and detect a target DNA molecule present only once in a sample of 10(5) cells.

PCR schema



La reazione a catena della polimerasi consente di copiare un segmento di DNA in laboratorio utilizzando reagenti di facile reperibilità. Dato che il numero di copie aumenta esponenzialmente, in poche ore si possono produrre anche 100 miliardi di molecole di DNA.

DNA amplification from PCR of 0.001 μg DNA template



- **DNA bersaglio**
- **Primers**
- **Enzima**
- **Nucleotidi trifosfati**
- **Ioni Mg^{++}**

DNA bersaglio → **Campione**

Primers → **Oligonucleotidi sintetici complementari a sequenze fiancheggianti il tratto di DNA da studiare 20 – 25 bp**

Enzima → **DNA polimerasi**

Nucleotidi trifosfati

Termociclatori

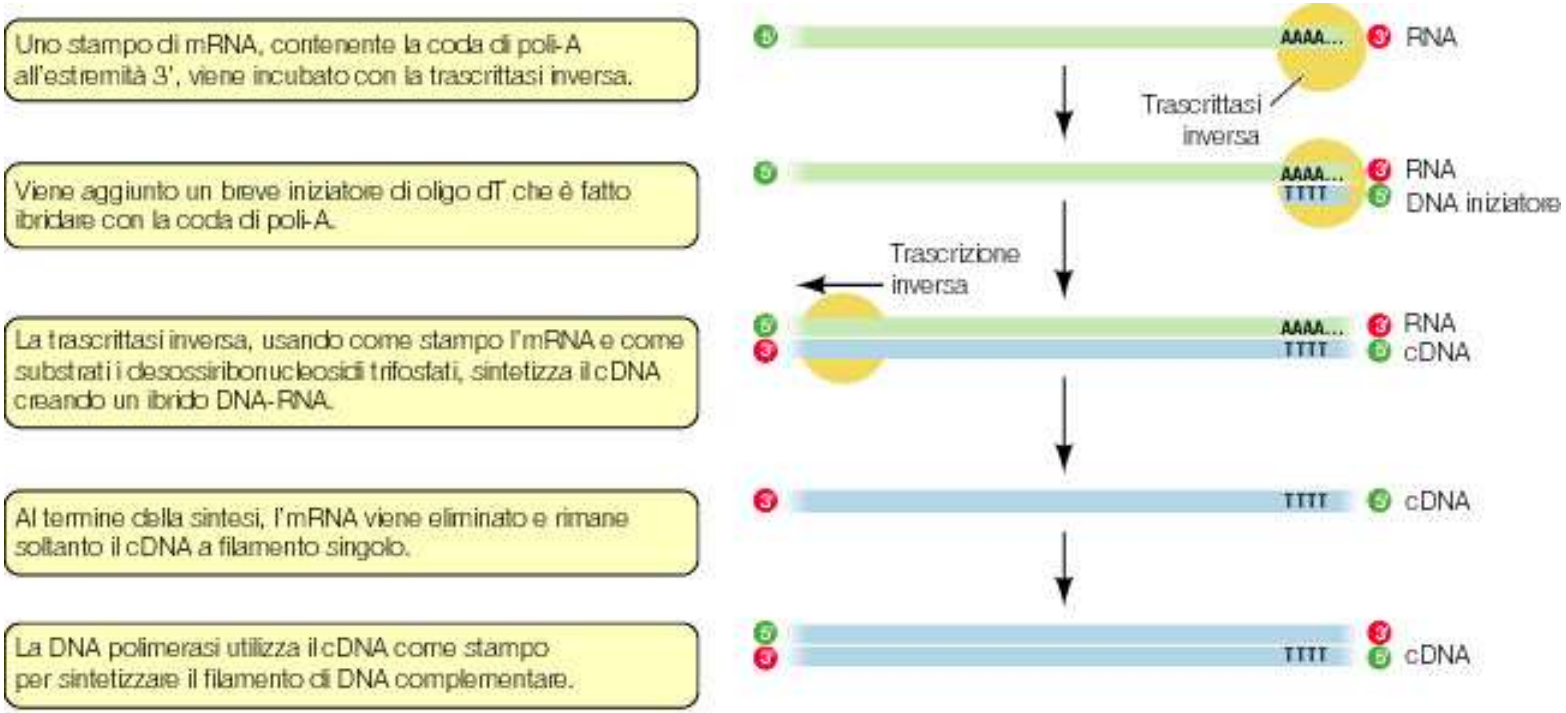
Denaturazione del DNA
(94℃)

Ibridazione dei primers al bersaglio
(40℃ – 60℃)

Sintesi del DNA
(72℃)

RT-PCR

Reverse transcription-PCR



Vantaggi

- **Si può evitare l'uso di tecniche più laboriose. <u>Velocità di esecuzione</u>**

- **Si possono analizzare campioni di poche cellule (anche 1 cellula). <u>Elevata sensibilità</u>**

Biopsie

Analisi prenatale e Analisi preimpianto

Tracce di infezioni virali

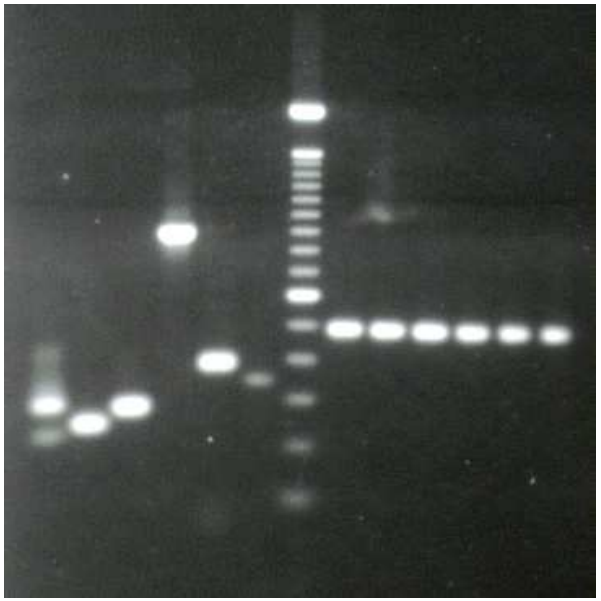
Malattia mimima residua

Medicina forense

End Point PCR

Il campione si sottopone al numero di cicli stabiliti (30-40), alla fine della reazione un'aliquota si sottopone ad elettroforesi su gel di agorosio per verificare:

1. la lunghezza dell'amplificato (controllo del peso molecolare in bp mediante ladder);
2. La quantità di amplificato ottenuto (proporzionale all'intensità della banda);
3. L'assenza di frammenti aspecifici.

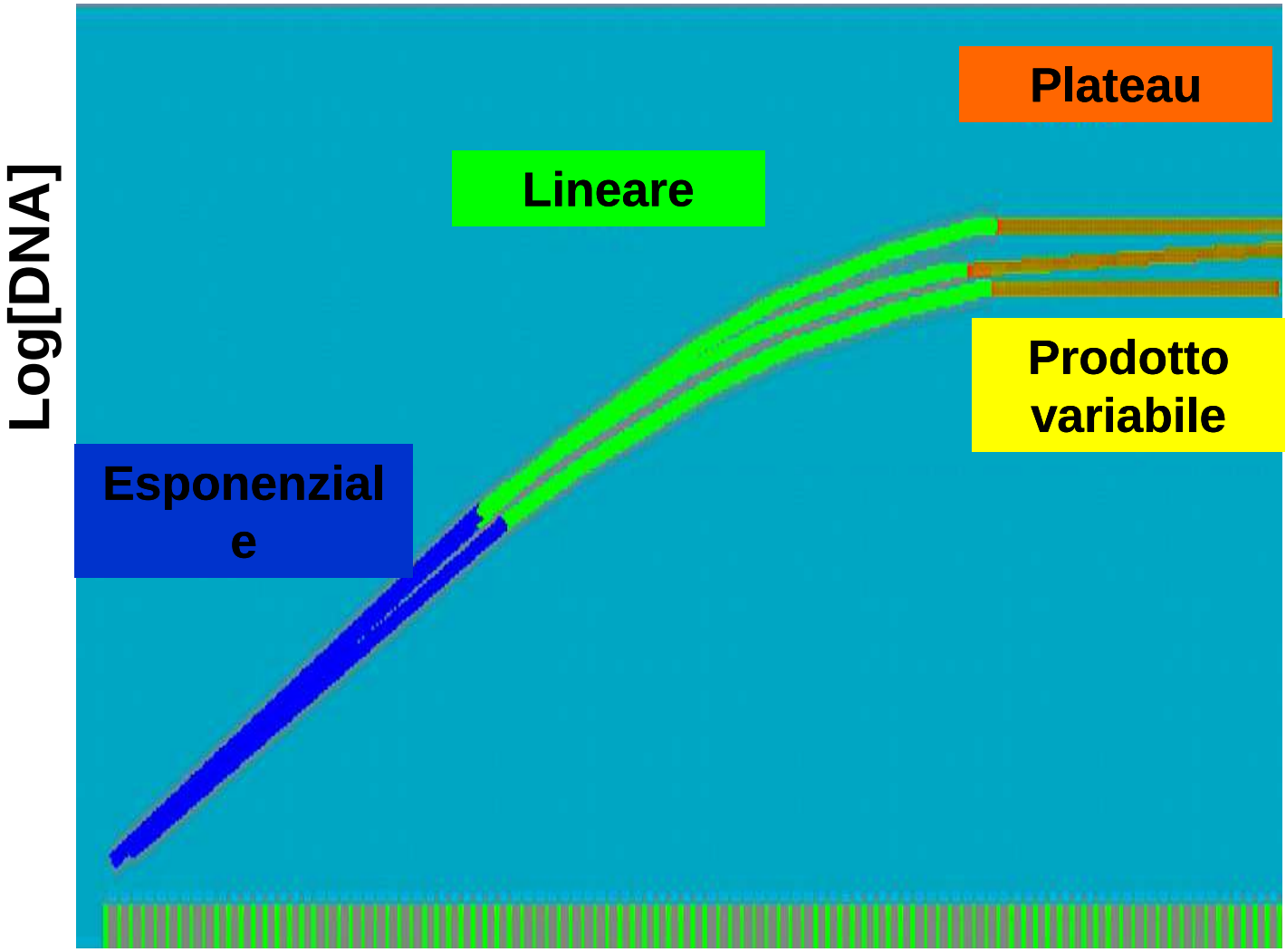


La PCR end-point non è un metodo quantitativo

Alla fine della reazione non sempre la quantità di DNA del campione d'origine è proporzionale all'intensità della banda ottenuta.

Utilizzando particolari accorgimenti può diventare un metodo semi-quantitativo.

- Ricerca di mutazioni note;
- Ricerca di mutazioni non ancora identificate.


Plateau
Lineare
Prodotto variabile
Esponenziale
Log[DNA]
N° cicli termici

Polymerase Chain Reaction: plateau

Resa effettiva: effetto plateau

Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:

- **Quantità dei primers**
- **Attività della Taq polimerasi**
- **Reannealing dei filamenti**

Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

Perché Real-Time?

Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point"

Real Time PCR

Si utilizzano particolari termociclatori in grado misurare la fluorescenza emessa da particolari fuorofori ad ogni ciclo.

La fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando uno strumento quantitativo ma anche dei marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR

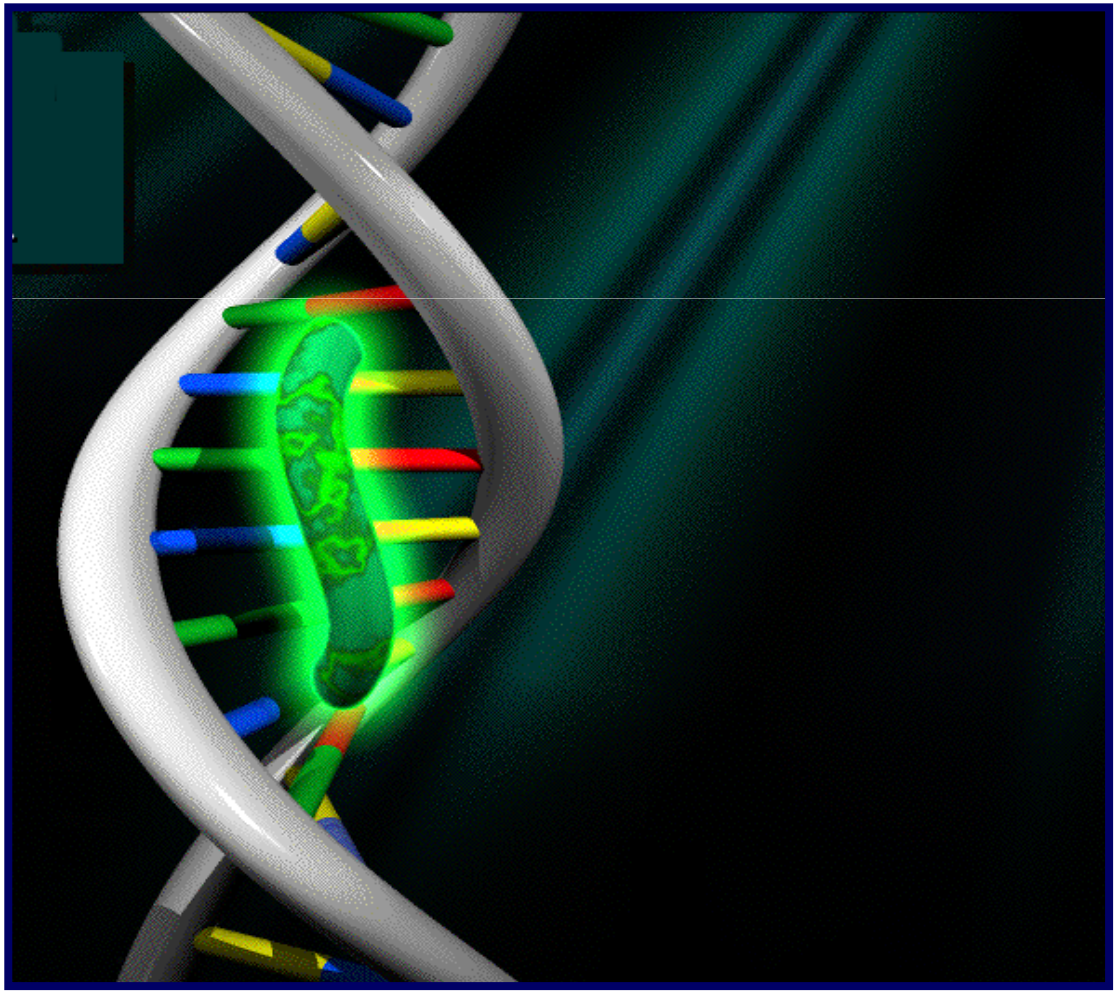
Chimiche fluorescenti per PCR Real-Time

- La fluorescenza si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche

- Le chimiche principali sono basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, sia sull'ibridazione di sonde specifiche.

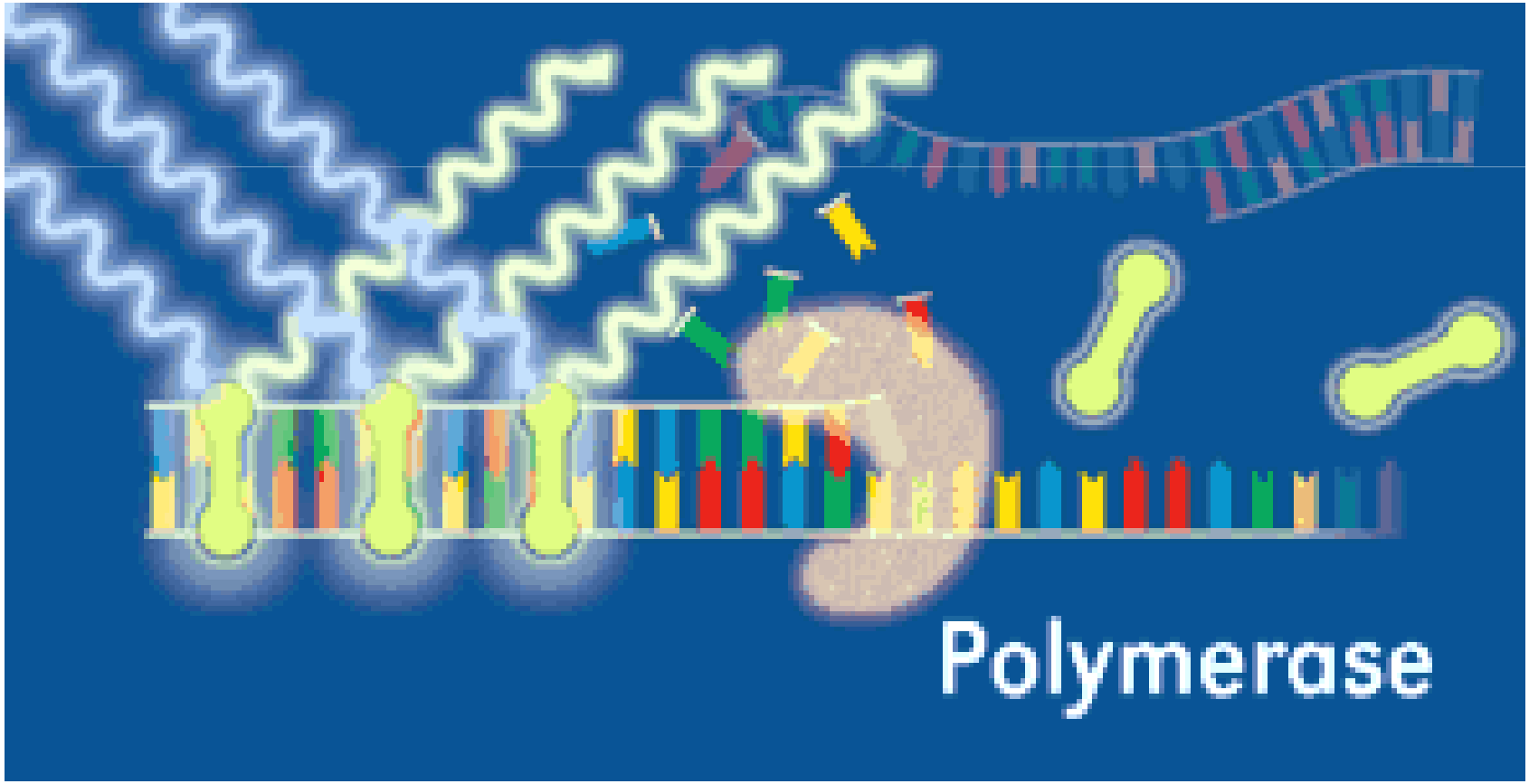
SYBR Green: principio

Utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA



SYBR Green

Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all' aumento del numero di copie dell'amplicone



SYBR green

- **Metodica semplice**

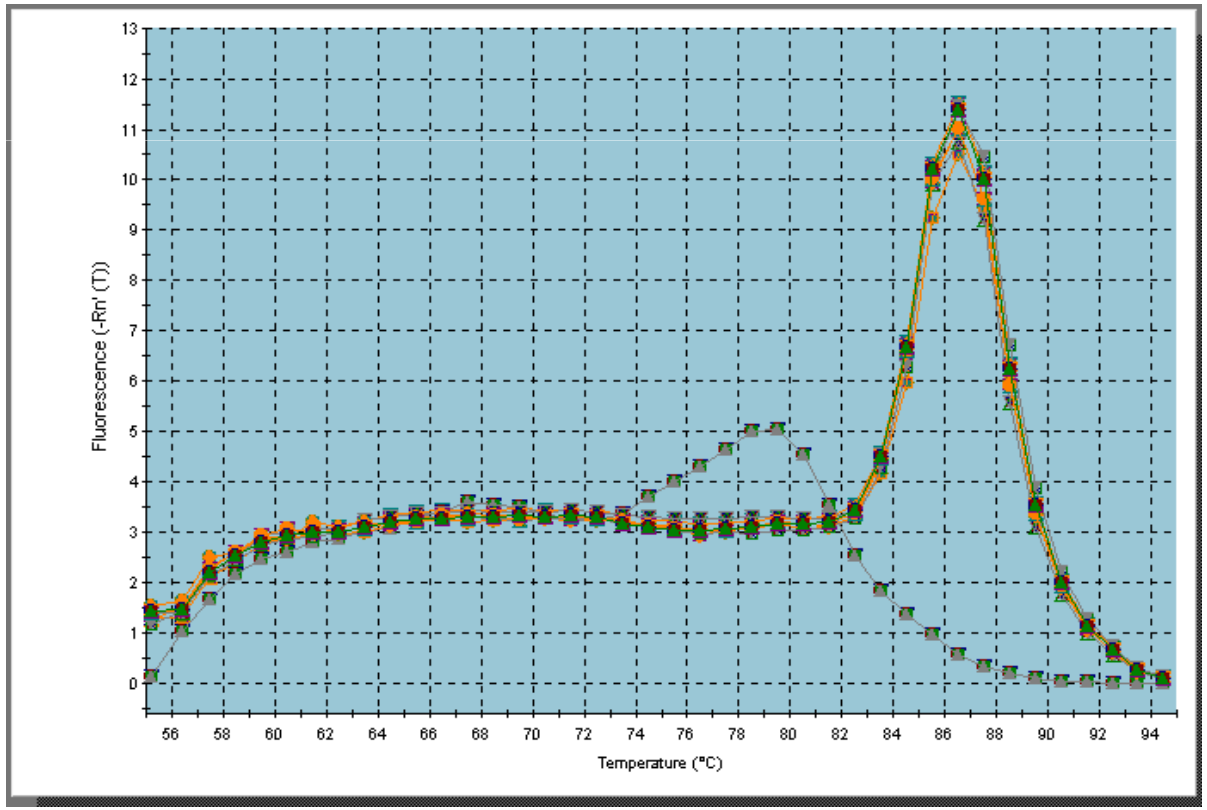
  Possono essere utilizzati primers in uso in qualitativa

- **Non costosa**

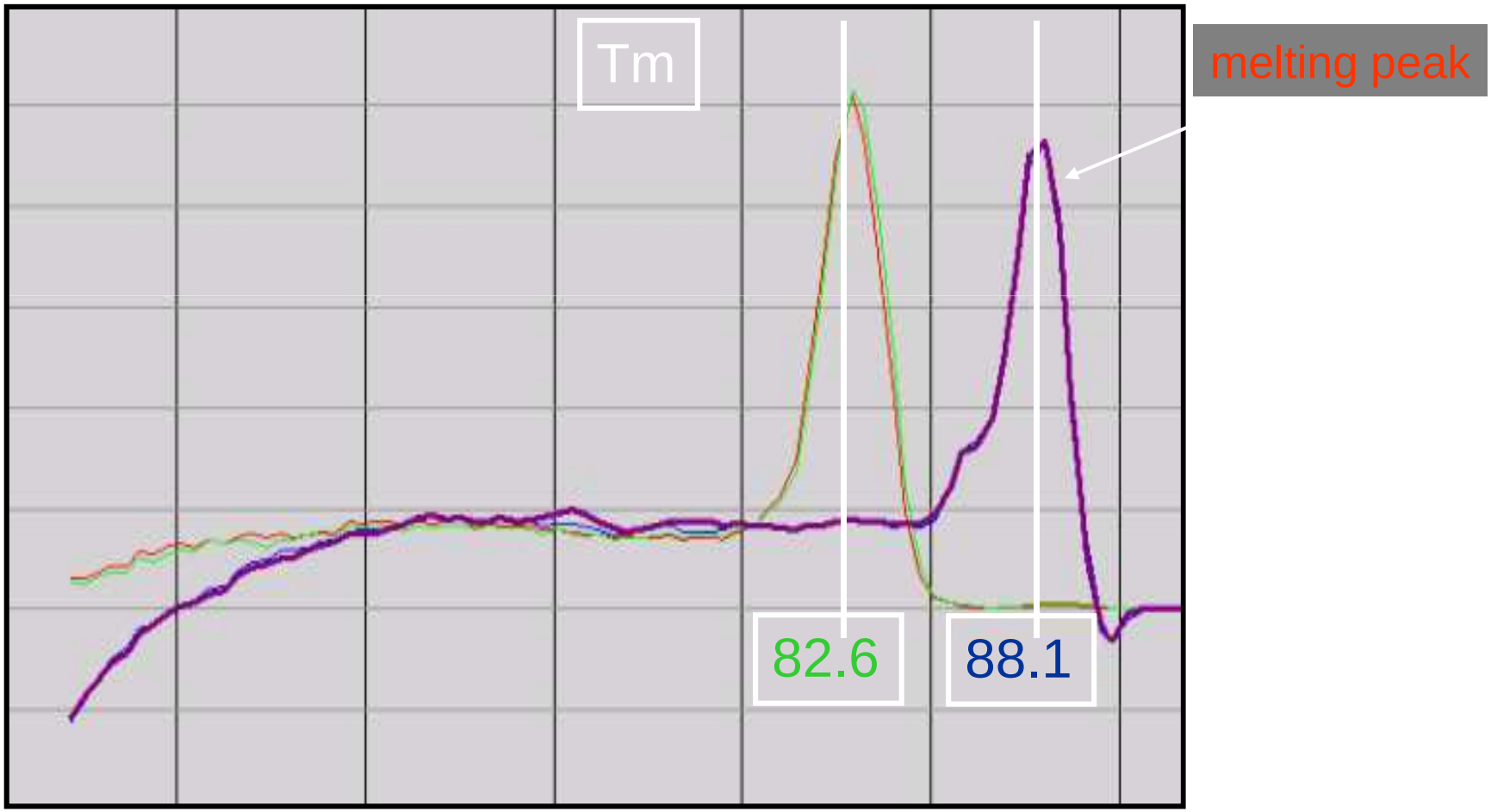
- **Non-specifica**
  - **La molecola fluorescente si lega random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers**
  - **È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici**

Curva di dissociazione

Dopo l'amplificazione, i campioni vengono riscaldati e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di dissociazione



Curva di dissociazione



TaqMan

La Real-Time PCR si può realizzare mediante l'impiego:

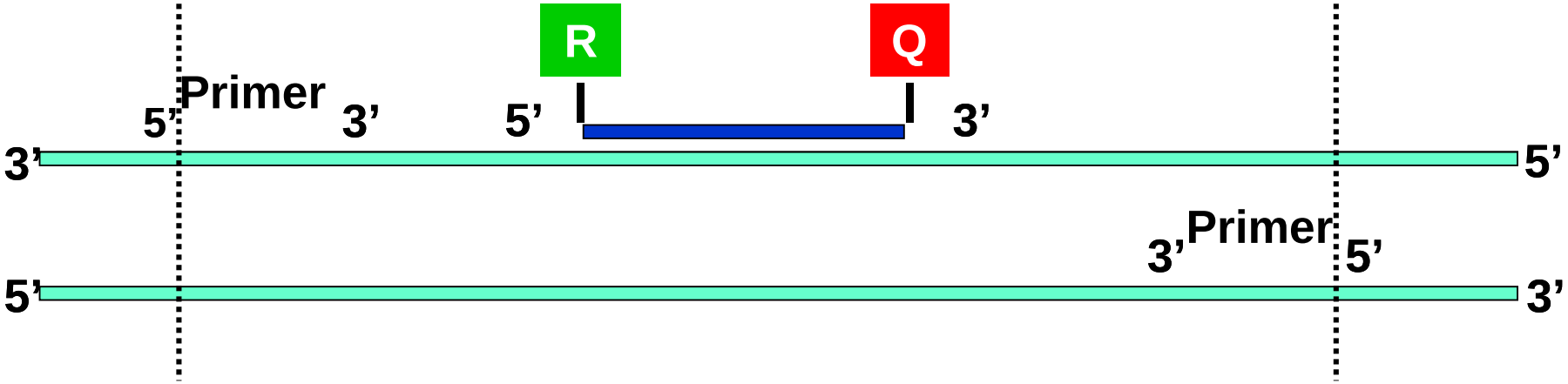
- **coloranti intercalanti (es. SYBR green), che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA**
- **sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti**

Esistono diversi tipi di sonde:

- **Dual-labeled (come le sonde TaqMan)**
- **Molecular beacons**
- **Scorpion**
- **Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**

Sonde TaqMan

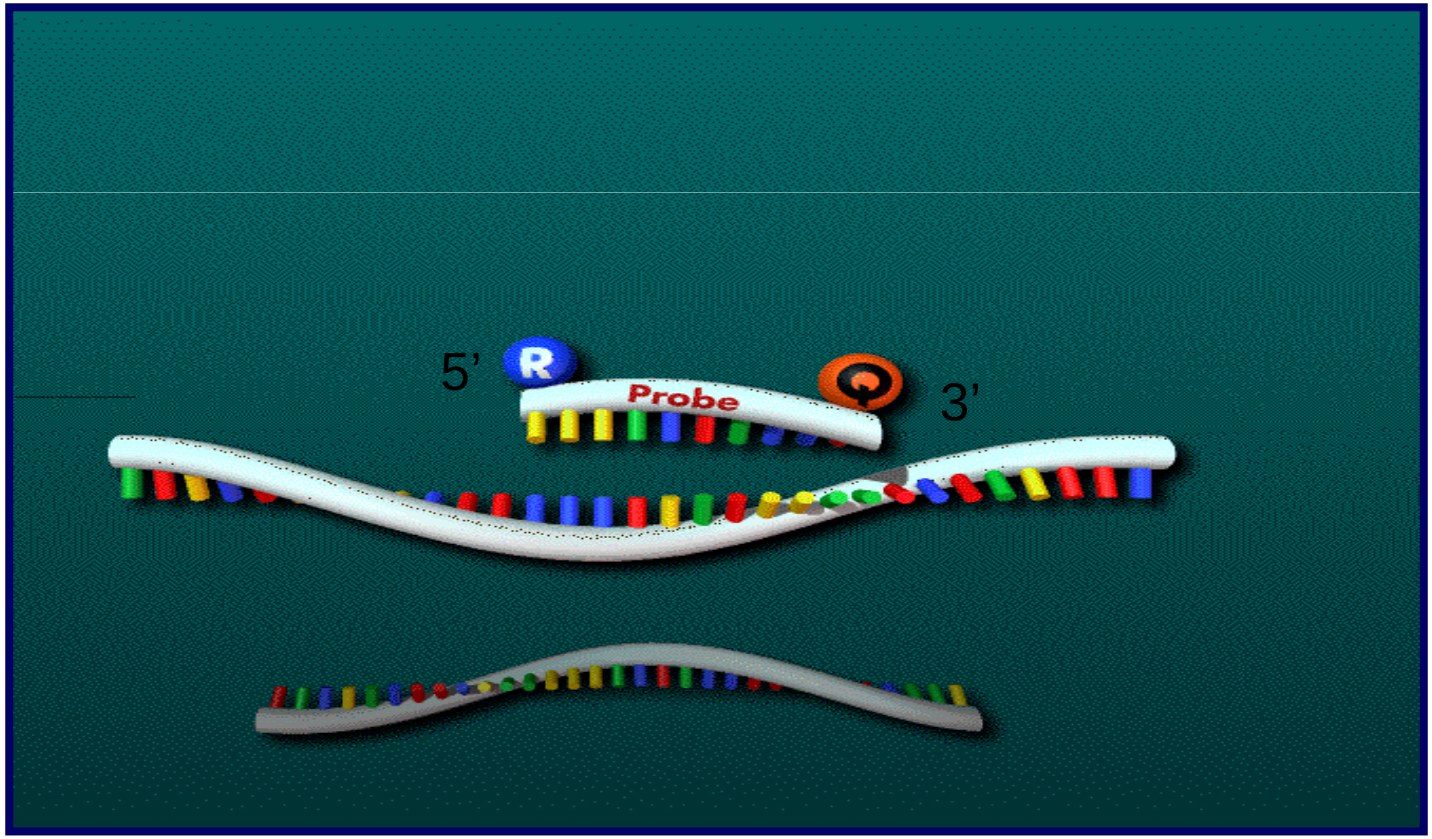
La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare



La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR

Sonda TaqMan

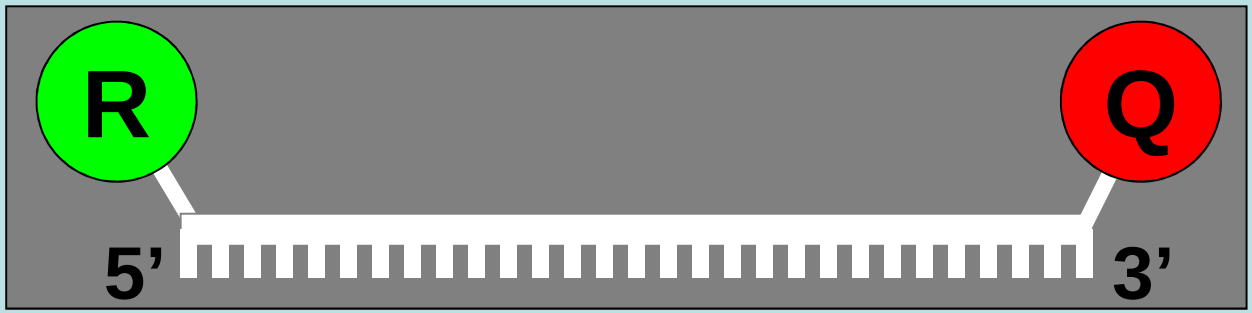
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



Reporter-Quencher

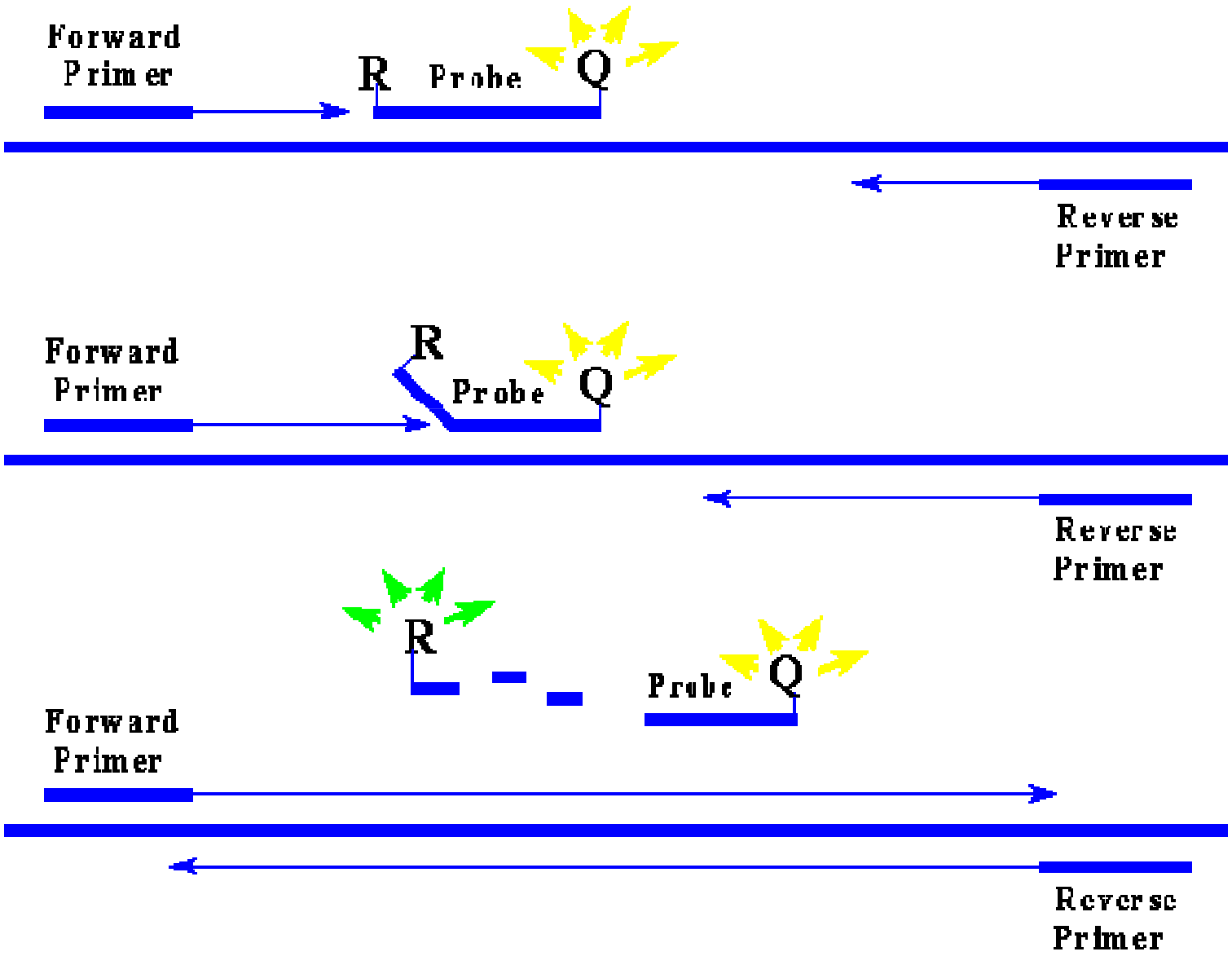
5' REPORTER (R): fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza

3' QUENCHER (Q): fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter

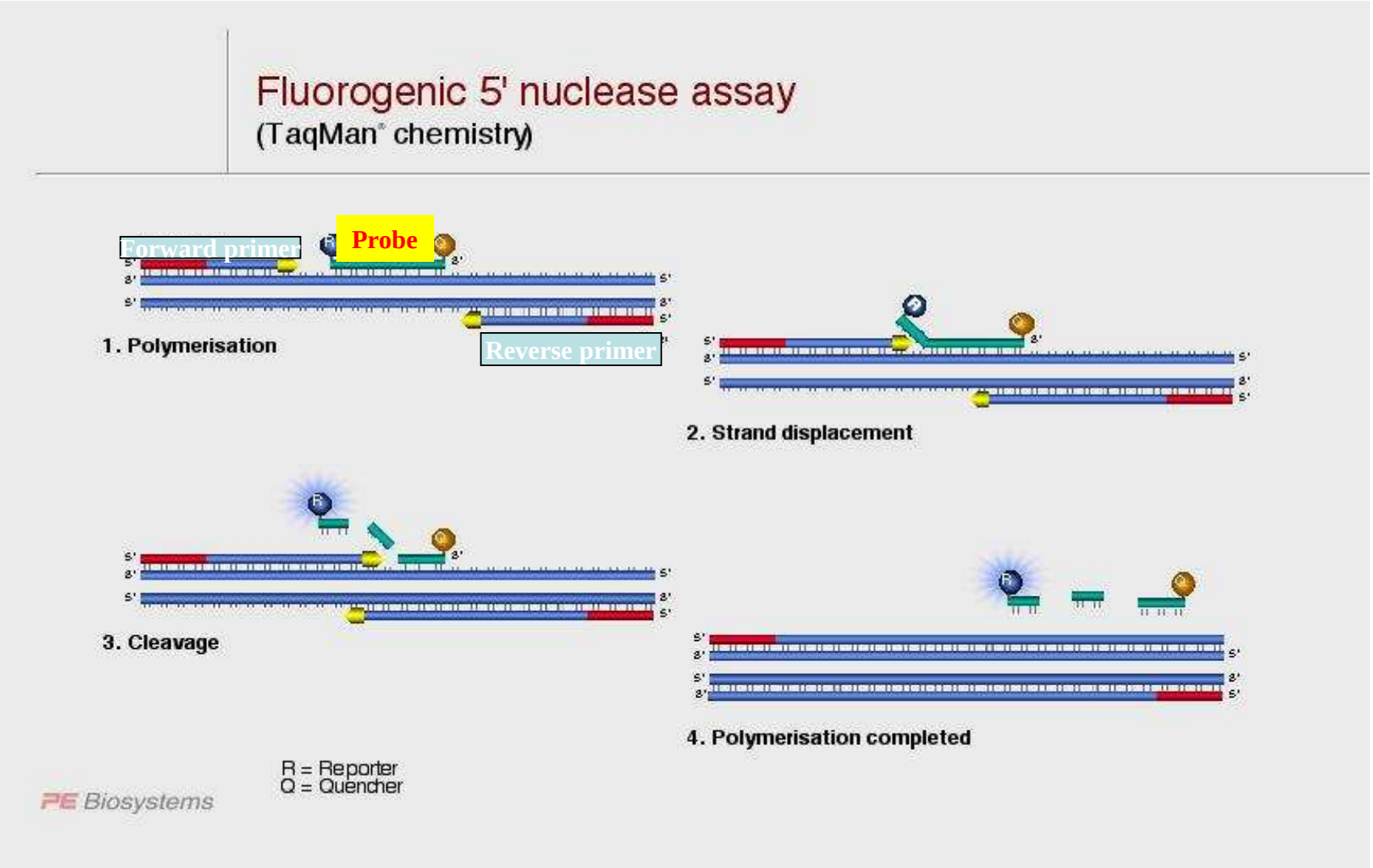


Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q

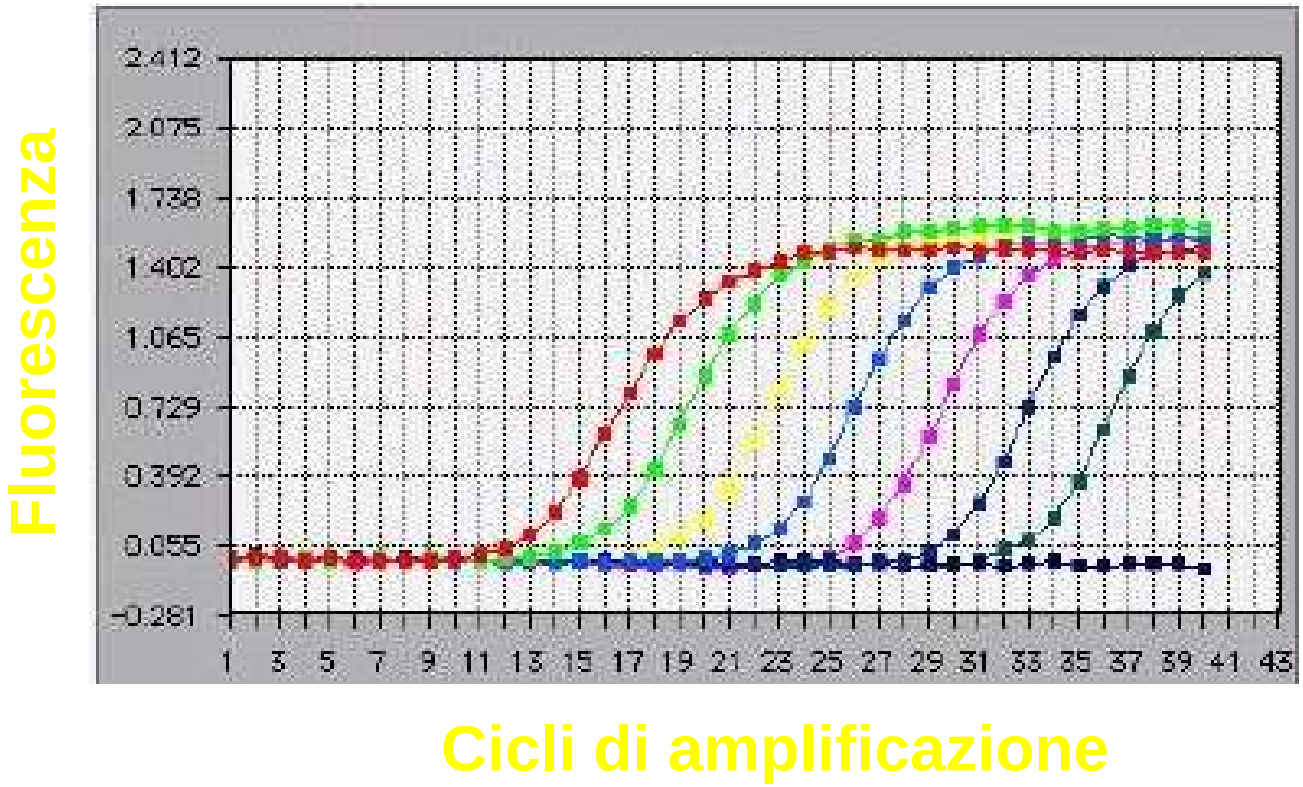
Real Time PCR



L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati



Curve di amplificazione



Plot lineare

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui C_T(=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale

Quantificazione

ASSOLUTA i campioni sono quantificati in modo assoluto

- Necessita di standard di cui si conosce la concentrazione assoluta (utilizzo di una standard curve)
- Per tutti gli unknowns devono essere saggiate identiche quantità di campioni

RELATIVA la quantificazione viene effettuata paragonando i C_T

- Necessita di controlli endogeni (non si utilizza una standard curve)
- Gli unknowns vengono "quantificati" paragonando il loro ΔC_T con quello del controllo endogeno

Quantitativa relativa: analisi dei dati

- **Normalizzare il target con un controllo endogeno (r) espresso costitutivamente (ΔC_T)**

- **Comparare ciascun ΔC_T così ottenuto con il ΔC_T di un trattamento di controllo anche detto "calibratore" (cb) ($\Delta\Delta C_T$)**

$$2^{-(\Delta CT,r - \Delta CT,cb)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

- **Il valore così ottenuto permette di determinare la concentrazione relativa del target**

Real-Time PCR: applicazioni

- Quantificazione virale
- Quantificazione dell’espressione genica
- Efficacia della terapia farmacologica
- Detenzione dei patogeni
- Controllo degli OGM
- Genotyping
- MRD