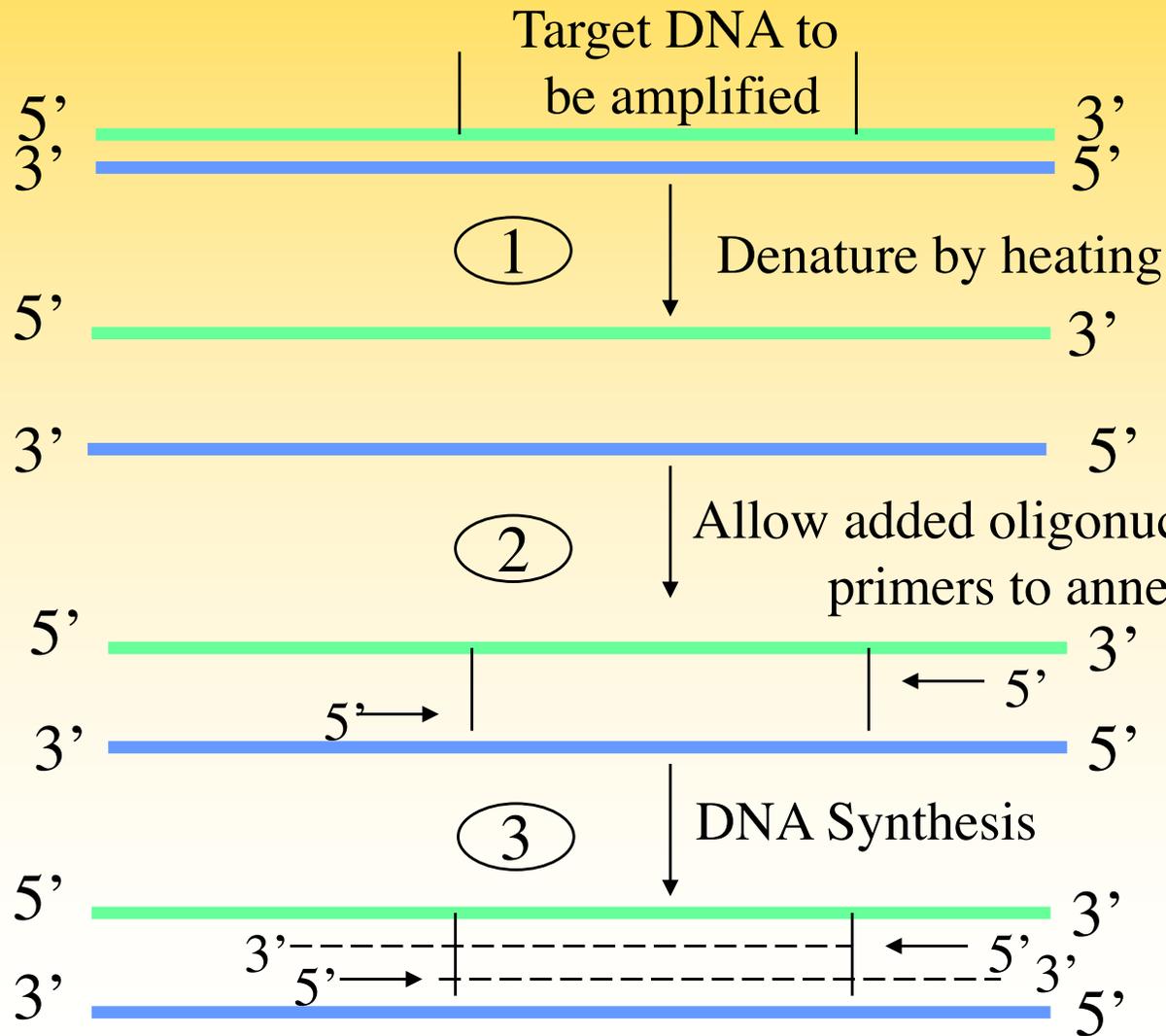


FASI DI UN CICLO DI PCR

NECESSITA

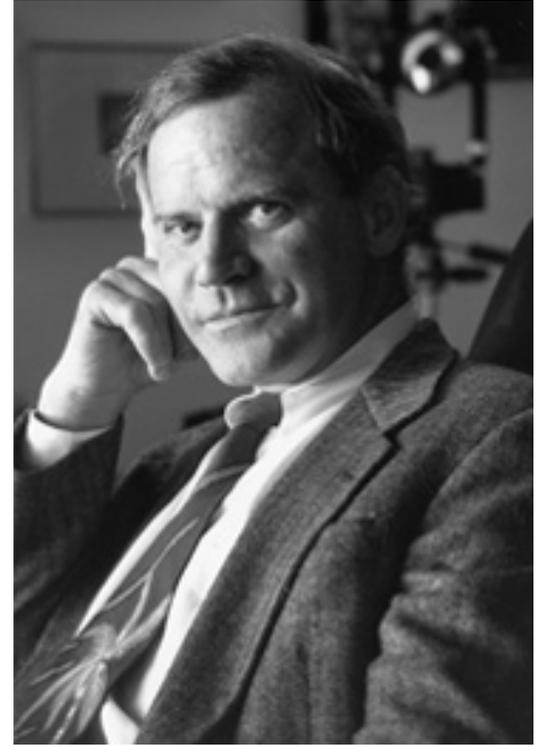
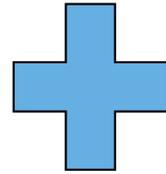
- 📖 informazioni sulla sequenza bersaglio con sintesi dei primers
- 📖 DNA polimerasi stabile al calore



E`:

→ una reazione a catena

→ un metodo di amplificazione selettivo di una sequenza specifica di DNA



= PCR

VANTAGGI

- materiali di partenza diversi, anche degradati
- Alta sensibilità
- Veloce e semplice
- specifica

LIMITI

- Necessitano informazioni sulla sequenza del DNA bersaglio
- Sensibilità-contaminazione
- Amplificazione di sequenze relativamente corte
- Infedeltà della replicazione della sequenza

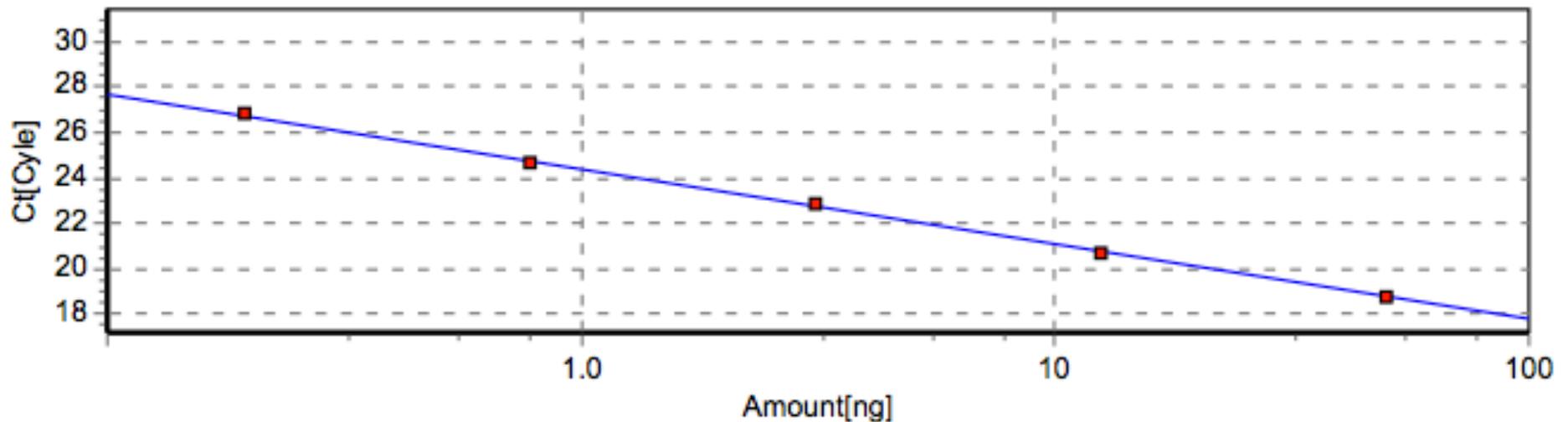
Applicazioni

- Riconoscimento della presenza di una sequenza specifica in una miscela di DNA eterogeneo
- Analisi di polimorfismi
- Analisi di mutazioni
- Analisi di geni sconosciuti appartenenti ad una famiglia
- Analisi di sequenze di DNA adiacenti a sequenze conosciute
- Amplificazione generalizzata del DNA
- Amplificazione del DNA prima di sequenziamento
- Produzione di mutazioni specifiche

FATTORI CHE INFLUENZANO LA PCR

✓ Annealing: $T_a = T_m - 2^\circ$

✓ Efficienza



Slope -3.307 R² 0.999
Y-Intercept 24.43 Efficiency 1.01

✓ **Resa** $X(1+E)^{n-2}$ dove: X=numero iniziale di molecole, E=efficienza, n= numero di cicli.

Efficienza	Resa per n=30	Percentuale
1	$268 \cdot 10^6$	100
0.98	$202 \cdot 10^6$	75
0.95	$132 \cdot 10^6$	49

FATTORI CHE INFLUENZANO LA PCR

•**Magnesio:** alte concentrazioni stabilizzano l'appaiamento dei primers e può aumentarne la sensibilità, ma ridurre la specificità \Rightarrow prodotti aspecifici.

•**[Mg²⁺]= 0.7 mM + [dNTPs]** Se ogni dNTPs è 0.2 mM \Rightarrow [Mg²⁺]=
0.7 mM + 4*0.2= 1.5 mM

•Errore

Si genera in 2 steps: disincorporazione che porta o ad un amplificato più corto o ad un errore di una base nell'amplicon. Più comune in PCR G \rightarrow T

•DNA Polimerasi

Troppo enzima decresce la specificità, mentre poco enzima produce poco prodotto.

Processività:

Numero di nucleotidi che inserisce una molecola di enzima

velocità:

Numero di nucleotidi che inserisce una molecola di enzima nell'unità di tempo.

In condizioni ottimali la Taq fa un errore ogni 10^6 basi, in condizioni normali 1 ogni 1000- 10^5 basi.

• Inibenti

Troppo DNA o RNA, emoglobina per la presenza di Fe^{2+} , ioni metallici, composti aromatici o coloranti.

•Cosolventi

Abbassano la temperatura di denaturazione e salvano l'enzima. Più usati sono il DMSO, glicerolo, formamide (campione ricco di CG). 10% di glicerolo + 5% formamide permettono di abbassare l'annealing Ta

PRIMER DESIGN

- *Equilibrio fra CG- AT*
- 15-25 basi di lunghezza ciascuno
- Tm compresa fra 55 e 68° C
- Bilanciamento fra le Tm dei due oligo (+/- 2° C)
- primers non complementari in 3'
- Corretto uso della Ta
- Non strutture secondarie
- Uso della formula termodinamica per il calcolo della Tm

TERMOCYCLER

Uniformità statica e dinamica

CARRY OVER

- *E` l'inquinamento dato dalle reazioni precedenti*
- *Può esser causato da C+ troppo concentrati o dai collaboratori.*
- *Per eliminarlo: ipoclorito 5% a 95° C a blocco aperto per 5'*

Per evitarlo si può usare l'uracil N-glicosilasi

- Nella mix si usa una miscela di dNTPs con la U al posto della T
- Carry over+ campione → UNG T=50° C degrada il carry over ma non il campione →95° C distruggo la UNG (ed eventualmente attivo la Taq) → amplifico solo il templato
- DNA ds e ss con dUTP sono substrati per UNG, mentre l'RNA e il DNA con dT non lo sono.
- elimina il carry over
- Aumenta l'efficienza del clonaggio da prodotti di PCR
- Può aumentare l'efficienza nella sintesi di mutanti sito specifici (PCR based mutations)
- dUTP 20mM e 10 mM per ciascun dA, dG e dC.

PCR AD ALTA FEDELTA'

- Per ottenere amplificati senza errori
- Uso di enzimi ad attività proofreading 3'exo, hanno una resa < perchè tagliano tutti i nucleotidi non legati al template ⇒ può tagliare amplicon e primers.
- $[Mg^{2+}]$ ~ridotta per ridurre il mismatch, bassa $[dNTPs]$ (da 0.2 mM per ciascun dNTPs a 0.05-0.04 mM), $[Taq]$ più bassa possibile.
- T_a più alta possibile, t estensione più breve possibile, n° cicli basso.

EXTRA LONG PCR

- Per amplificare frammenti di 22 kb. Non si usa Taq normale, non posso avere frammenti tanto lunghi. E' fondamentale:
- INTEGRITA' DEL DNA-adequata estrazione-no fenolo cloroformio, ma colonnine. Determinazione del PM del DNA su gel denaturante
- La depurinazione del DNA ad alte temperature di denaturazione abbassa la resa. Favorita da: pH acido del tris \Rightarrow uso di buffers più basici che non sono tanto sensibili alle ΔT .
- Misincorporazione.

EXTRA LONG PCR

- Tempi di denaturazione brevi (per evitare la depurinazione)
- Titolare Mg^{++}
- Strutture secondarie del DNA e T_a
- Cosolventi: glicerolo + DMSO abbassano la $T_m \Rightarrow t >$ ma non si rovina il DNA.
- PCR a 2 T: annealing/extension assieme. 1 min /Kb
- Uso di miscele di Taq.

Long distance PCR (LD-PCR)

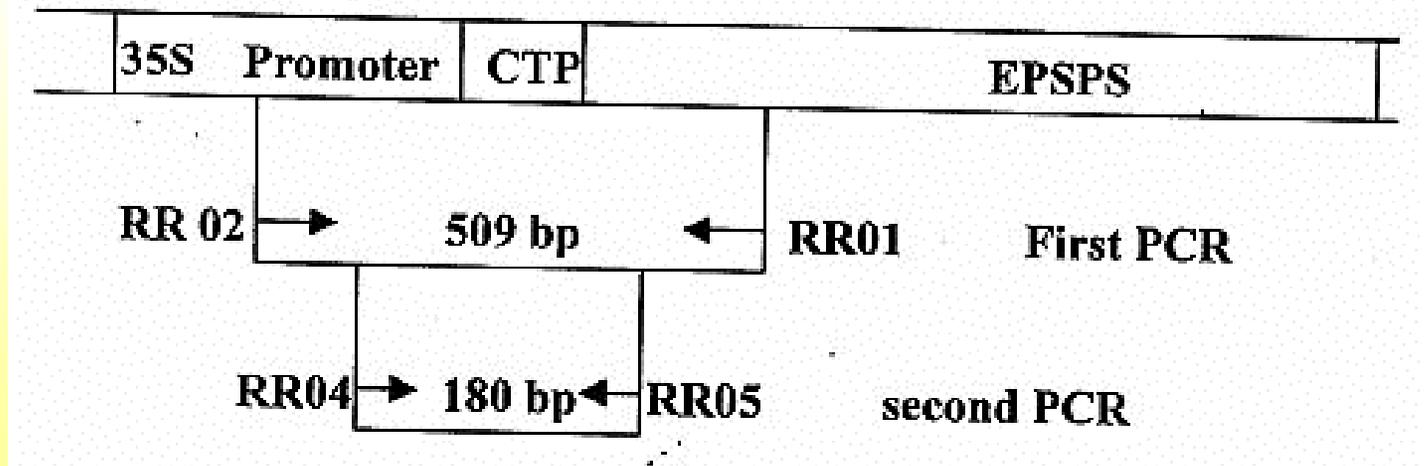
- Uso di un enzima ad attività proofreading per (es Pfu polimerasi) per correggere possibili mismatches ⇒ evita l'inserimento di mutazioni nella sequenza.
- Serve per amplificare frammenti di più di 40kb.
- $[Mg^{2+}] \sim 2.5$ mM (range: $1.1 \div 3.5$ mM), cloruro o acetato.
- Primers di lunghezza compresa fra 21-34 b, $T_m > 58^\circ$ C e concentrazione compresa fra 0.4 a 1 μ M.

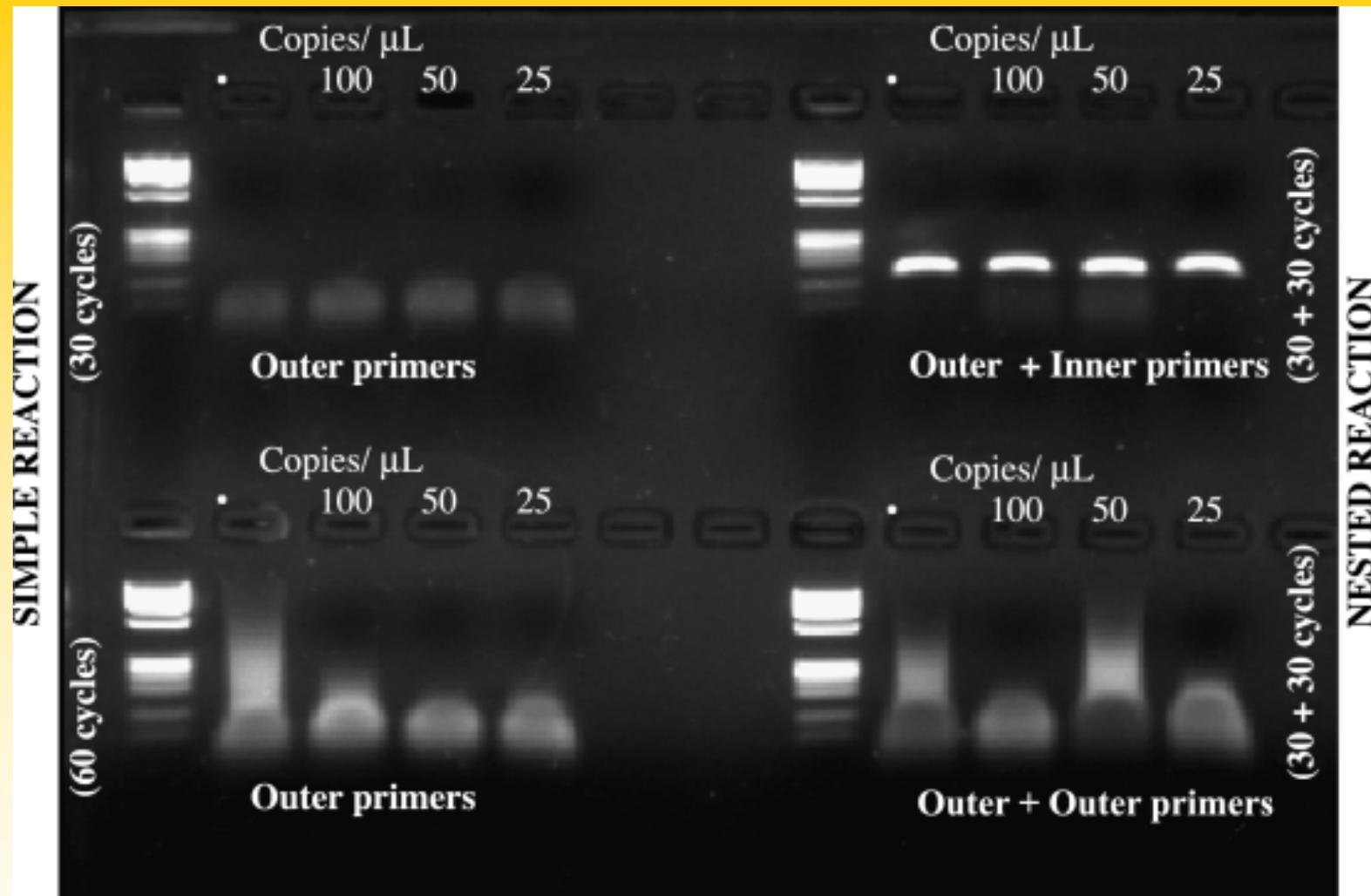
Long distance PCR (LD-PCR)

- Polimerasi preferibile alla Taq tradizionale. La ricombinante è più stabile termicamente.
- Tempalto di DNA 125ng/10 µl reazione. Consigliati 50 µl reazione.
- Denaturazione iniziale 92-95° C per più di 2 min.
- 10-30 cicli: 92-95° C/10-30"; Ta/30-60"; 68° C (se con DMSO o glicerolo) o 72° C senza/3-15 min dipendentemente dalla lunghezza dell'amplicone.

NESTED PCR

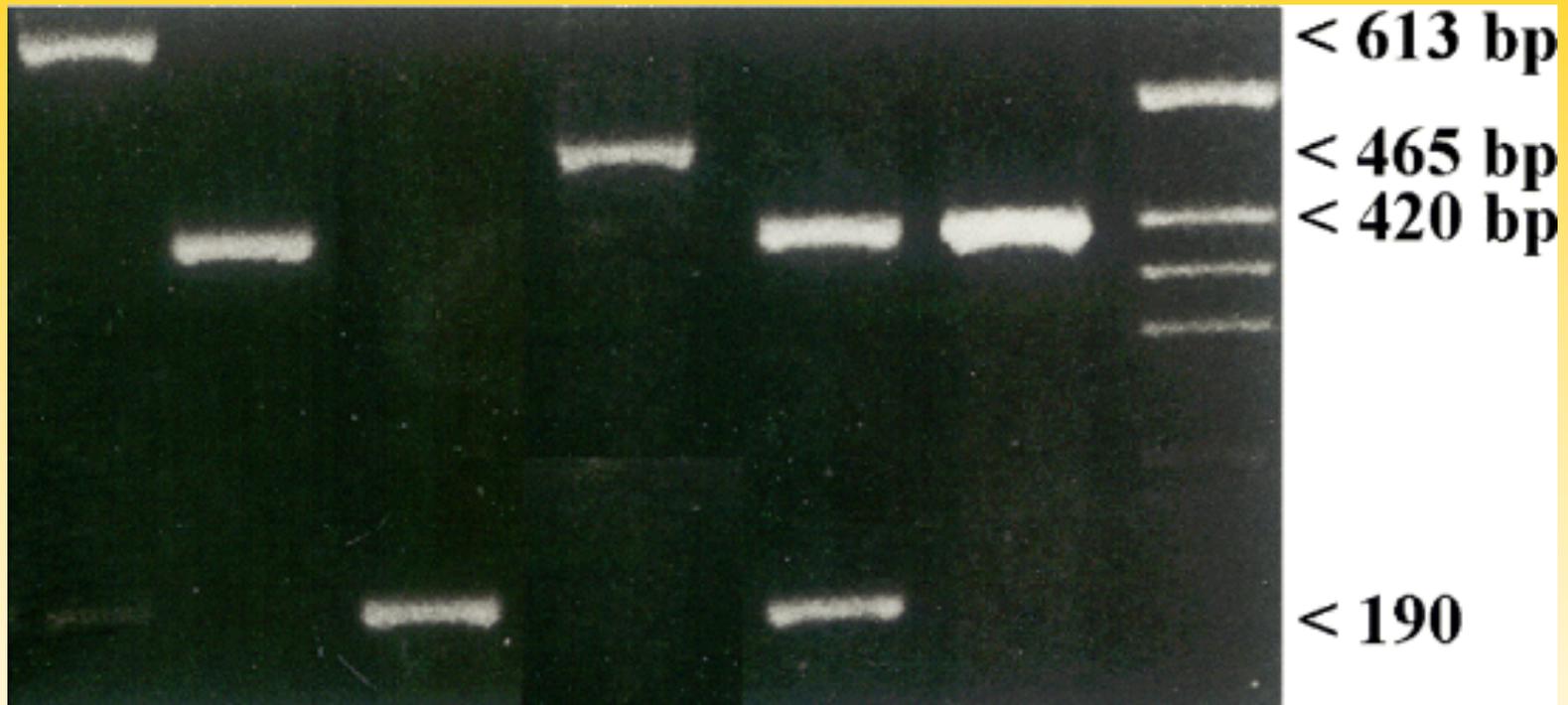
- ✓ Per aumentare la sensibilità del metodo
- ✓ Per minimizzare l'amplificazione di prodotti aspecifici
- ✓ Il prodotto del primo step di amplificazione sono utilizzati come target nella seconda reazione.
- ✓ Può esser condotta in uno step → inserzione della nuova coppia di primer ab inizio o dopo il primo step di PCR
- ✓ In 2 step: il prodotto della prima amplificazione può esser diluito ed utilizzato come tareget nella seconda amplificazione.





A sinistra PCR con i soli primers esterni, 30 e 60 cicli di amplificazione; a destra nPCR (sensibilità stimata da 10 a 100 copie/mL). A destra in basso, nPCR utilizzando solo i primers esterni in entrambe le reazioni.

MULTIPLEX-NESTED PCR



Genotipizzazione di campioni clinici positivi per il CMVg. Da sinistra a ds : gB2 (613 bp), gB 1 (420 bp), gB3 (190 bp), gB4 (465 bp).

TOUCH DOWN PCR



- Sfrutta diverse T_a
- T_a è più elevata nei primi cicli, e diminuisce in quelli finali
- Tempo di extension basso nei primi cicli e in quelli finali viene incrementato soprattutto se c'è poco materiale.

MULTIPLEX PCR

- * Simultanea amplificazione di prodotti multipli sfruttando più di una coppia di primers in una singola reazione di PCR.
- * Utile per delezioni, linkage, studi quantitativi....
- !Sono state utilizzate fino a 15 coppie di primers per singola PCR***
- * Indispensabile includere in ogni saggio un controllo per l'efficienza del metodo

MULTIPLEX PCR- accorgimenti

- * Selezione di frammenti con contenuto simile di G e C
- * appropriata distribuzione dei prodotti in base alla lunghezza
- * primers di lunghezza compresa fra le 23 e 28 basi con %GC di ~ 40%
- * Usare 10% DMSO
- * [Mg⁺⁺], dNTPs ed enzima vanno aumentati rispetto la singola
- * Incrementare l'extension nella PCR ed ottimizzare al meglio le condizioni del termocycler

Vantaggi: risparmio di t e reagenti

Svantaggi: laboriosa ricerca delle condizioni ottimali.

Analisi dei risultati

Se discriminati per lunghezza → elettroforesi

Real time PCR con fluorofori ≠, max 4

Sequenziamento

PCR-ELISA

E' una PCR accoppiata ad un sistema di rilevazione (PCR-ELISA).

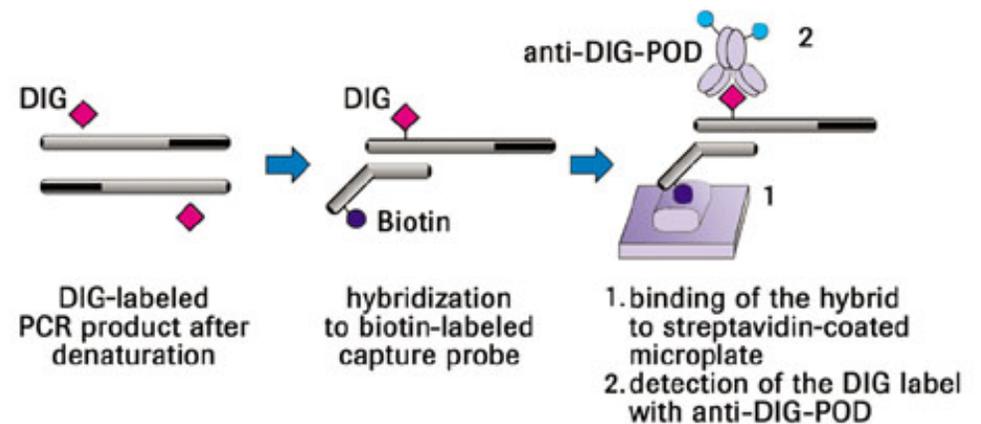
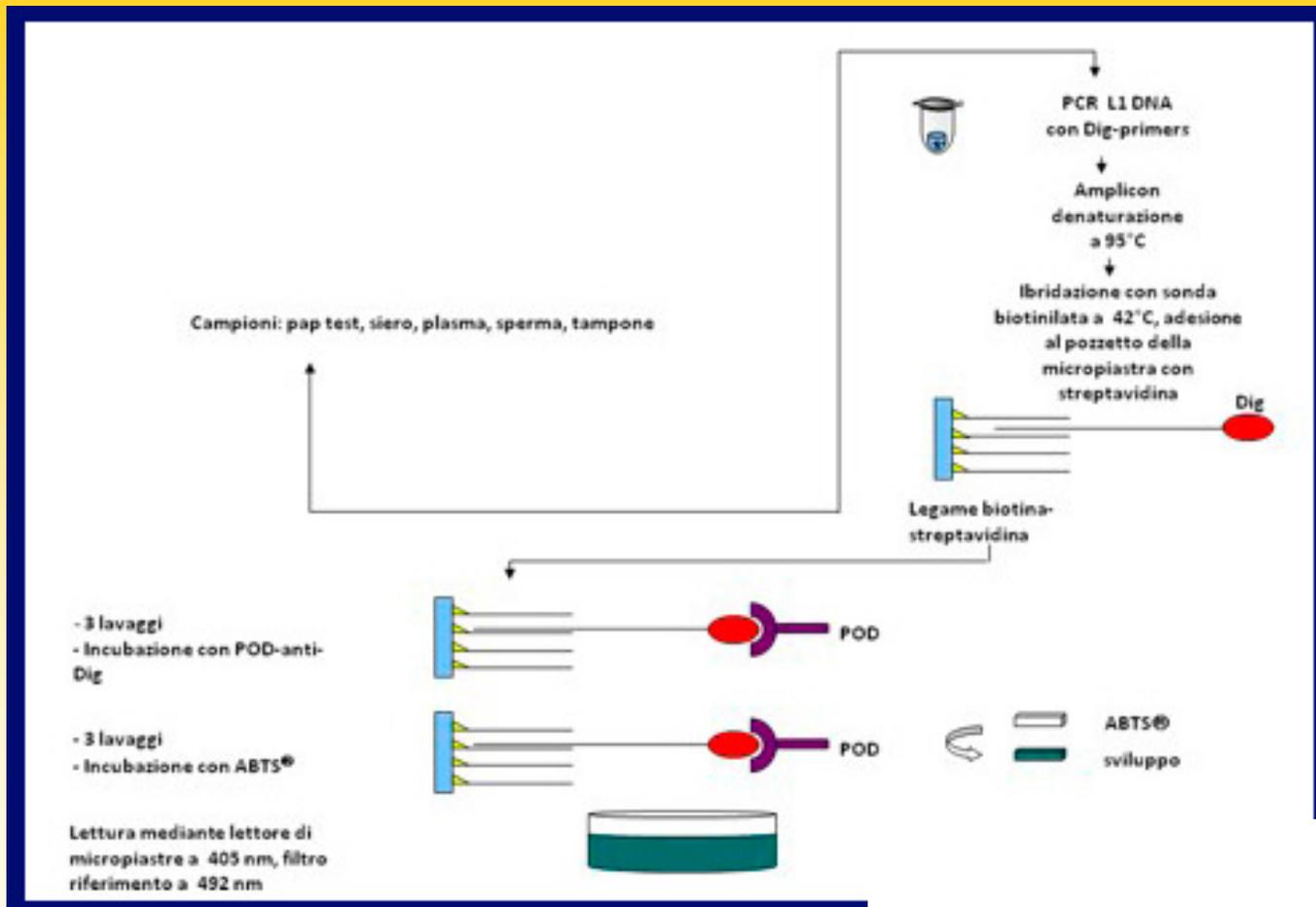
Impiega sonde con sequenza complementare al target amplificato.

Può discriminare diversi prodotti di PCR: prodotti specifici amplificati con primers consensus comuni.

DIG-PCR/ELISA si basa su 2 fasi:

- 1) Amplificazione del template combinato con la digoxigenina (DIG),
- 2) Ibridazione del prodotto amplificato marcato con DIG a una sonda marcata con biotina per la rilevazione colorimetrica.

PCR-ELISA



Tandemly repeated human DNA sequences

DNA satellite (blocchi da 100 kb a 10 Mb) :

- Satelliti 2 e 3 (ripetizioni da 5 basi in tutti i cromosomi).
- Satellite 1 (ricco in AT, 25-48 ripetizioni, eterocromatina).
- Alpha (alphoid DNA, ripetizione da 171 b in eterocromatina centromerica).
- Beta (famiglia Sau3A, ripetizioni da 9-24 b, eterocromatina centromerica 1,9,13,14,15,21,22,y).

DNA minisatellite (blocchi da 0.1 a 20 kb):

- Telomerico (ripetizioni da 6 b a livello dei telomeri).
- Ipervariabile (ripetizioni da 9-24 b in tutti i cromosomi, spesso vicino ai telomeri).

DNA microsatellite (blocchi con meno di 150 bp):

- Ripetizioni di 1-4 basi in tutte le sedi cromosomiche, ripetute 15-30 volte.

MICROSATELLITI

Geni polimorfici possono essere usati per mappare alcune malattie. La > parte del DNA nei cromosomi è ridondante o anonimo. Non codifica nessun gene= no manifestazioni fenotipiche

Poichè non hanno funzione, tali DNA hanno alte frequenze di variazione polimorfica⇒ereditate ⇒mappate per valutare l'ereditarietà dei geni contigui anche se non sono stati caratterizzati.

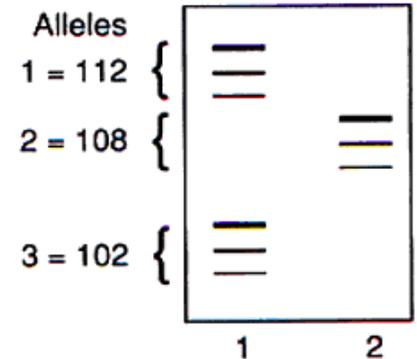
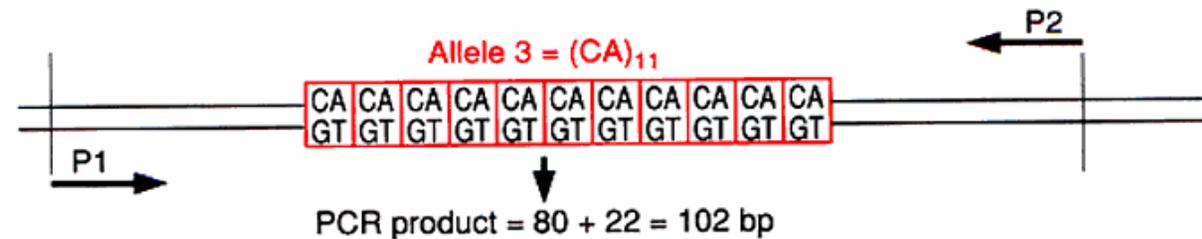
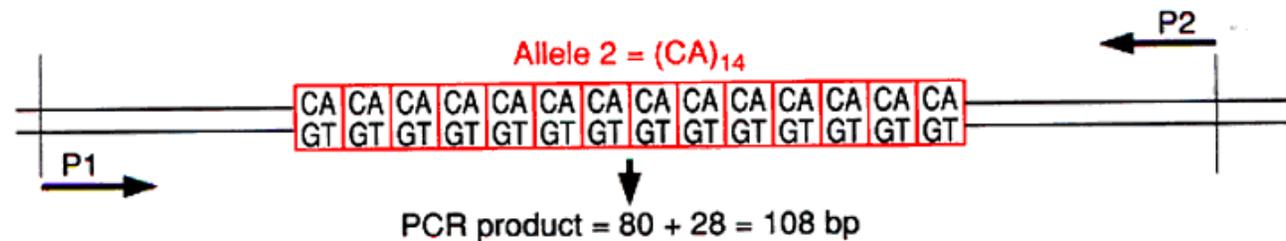
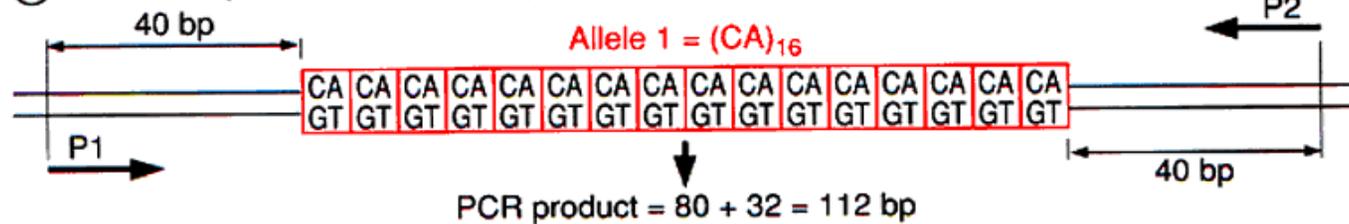
Si amplificano usando come primers le sequenze che fiancheggiano le ripetizioni. La specificità dei loci e il fatto che due alleli sono spesso diversi in lunghezza in virtù del diverso numero di ripetizioni, rende la metodica interessante per lo studio dei polimorfismi. Diverse neoplasie presentano spesso instabilità a livello di diversi loci microsatellitari (3-4 basi).

TECNICA

PCR specifica per il locus desiderato
Elettroforesi su gel PAA

SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHISM (STRPs) MICROSATELLITE ANALYSIS

① Use PCR primers P1, P2 to amplify alleles in genomic DNA samples

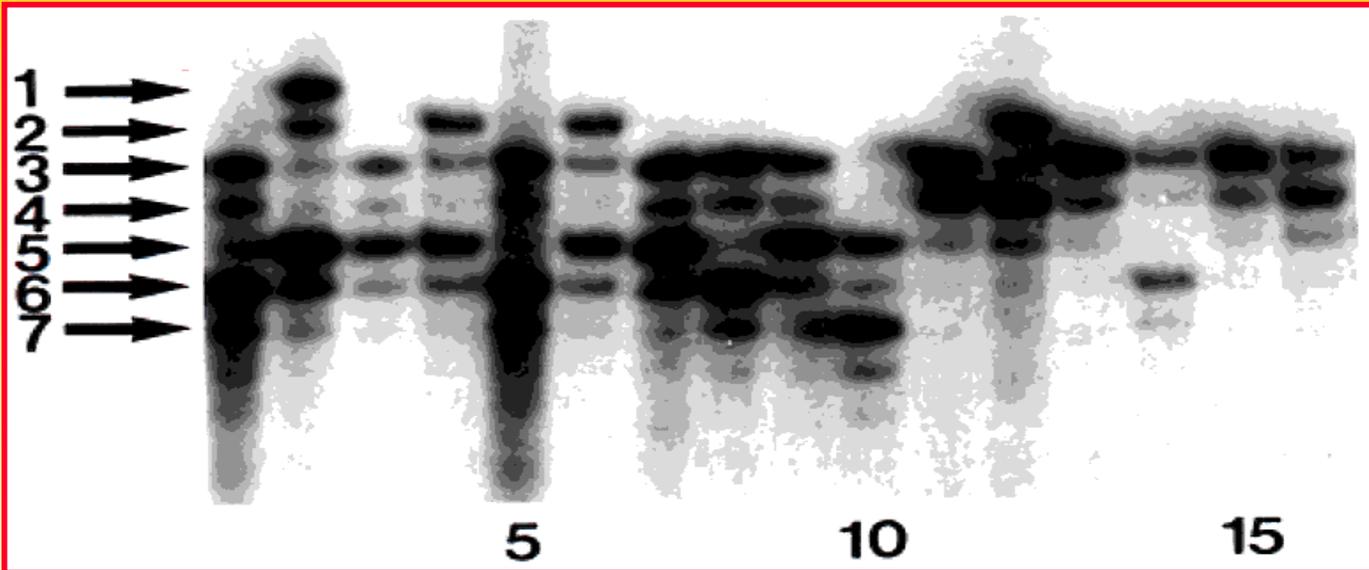


② Denature PCR products and size-fractionate by polyacrylamide gel electrophoresis

③ Autoradiography

INTERPRETAZIONE

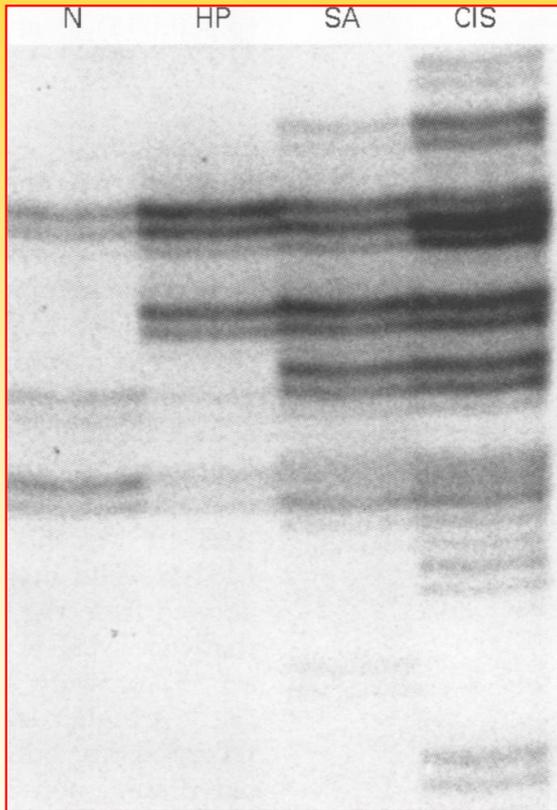
*alleli distinti in base alla lunghezza del prodotto di PCR
*La PCR introduce artefatti di difficile interpretazione dovuti all'elevata processività dell'enzima



Nell'attacco e stacco della Taq si possono avere oscillazioni delle ultime 4 basi o si può generare un loop \Rightarrow < 2 nucleotidi \Rightarrow STUTTER BANDS, non eliminabili

La Taq aumenta di 1 A alla fine del prodotto \Rightarrow prodotti $n-2+A$, $n-4+A$ \Rightarrow al posto dei 2 alleli trovo un pattern di bande di difficile interpretazione soprattutto se ho 50% di prodotto $+A$ e 50% senza.

Per eliminare il $+A$ e $-A$ si fa in modo di avere tutto $+A$, elimino metà bande incrementando il Magnesio e facendo un'xtension finale a 72° C per 30'.



N, normale; HP polipo iperplastico; SA, Adenomi dentellati, CIS carcinoma in situ.

Unità di misura-Morgans-cM, esprime la distanza relativa fra geni su un cromosoma

Adatto per lo studio di malattie genetiche:

A vari livelli: popolazione, famiglia, individui, cellule, cromosomi, geni

Due geni siti nello stesso locus (posto) sui 2 cromosomi= alleli. **Alleli identici= omozigoti**

Alleli \neq eterozigoti

SSCP



Single Strand Conformational Polymorphism

• Metodo che si basa sull'elettroforesi per rivelare sequenze di DNA alterate. Sfrutta l'elettroforesi e la stabilità termodinamica

Perciò

- *Campioni denaturati* (T, formamide o NaOH)
- *Gel non denaturante*

In queste condizioni i singoli filamenti di DNA si riavvolgono su se stessi per ripristinare la loro struttura secondaria che la particolare sequenza del DNA consente.

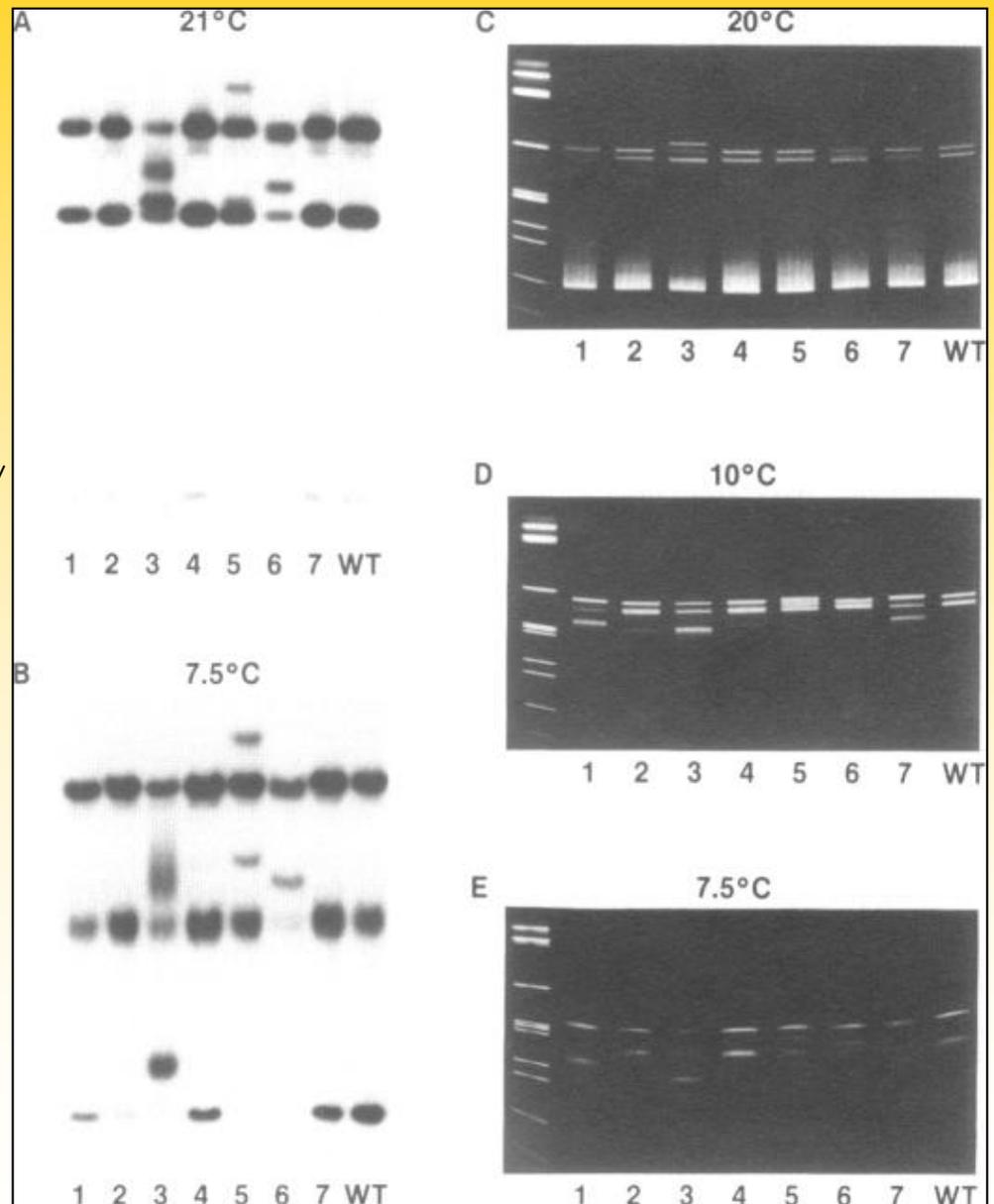
Cambiamenti anche in una singola base possono alterare lo spettro della struttura secondaria formata. I risultati ottenuti non sono semplici da interpretare, ma il metodo è semplice e sensibile per visualizzare diversi hetroduplex.

PCR-SSCP

Amplificazione della sequenza
da esaminare con la PCR

- a) in presenza di radioisotopo
- b) *senza utilizzo di radiosotopi*
- c) blotting e ibridazione dopo elettroforesi

SSCP radioattivo e non
relativo a \neq campioni di
carcinoma gastrico (1-7)
per l'esone 7 di p53. I gels
sono stati corsi a \neq T.



PCR INVERSA

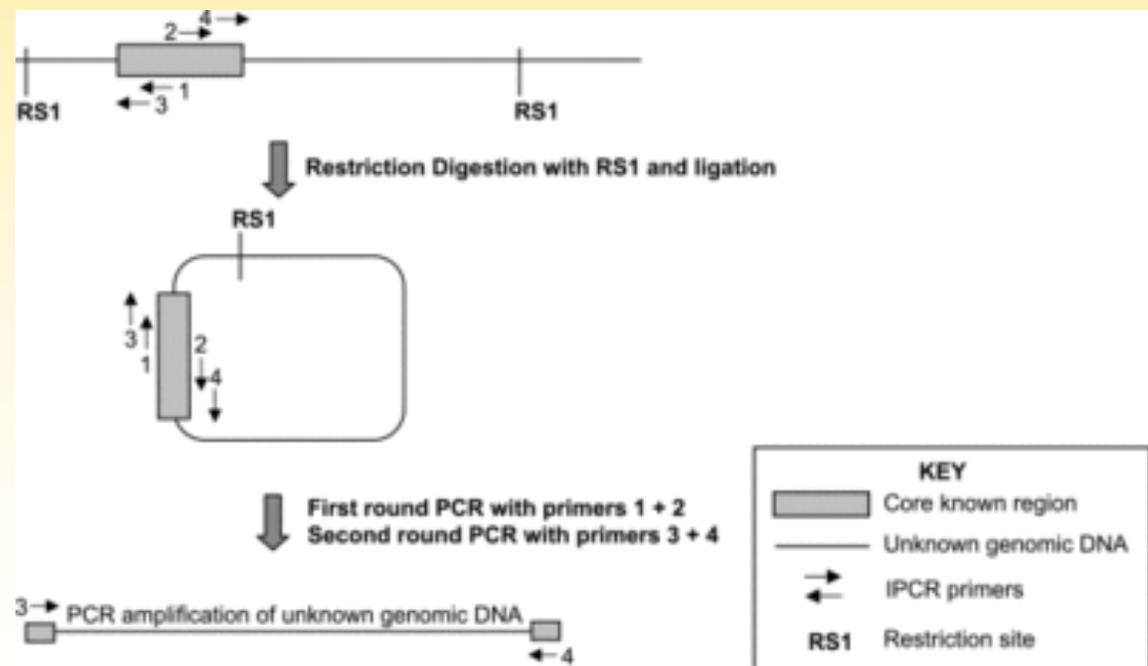


Per amplificare regioni con sequenze non note di DNA

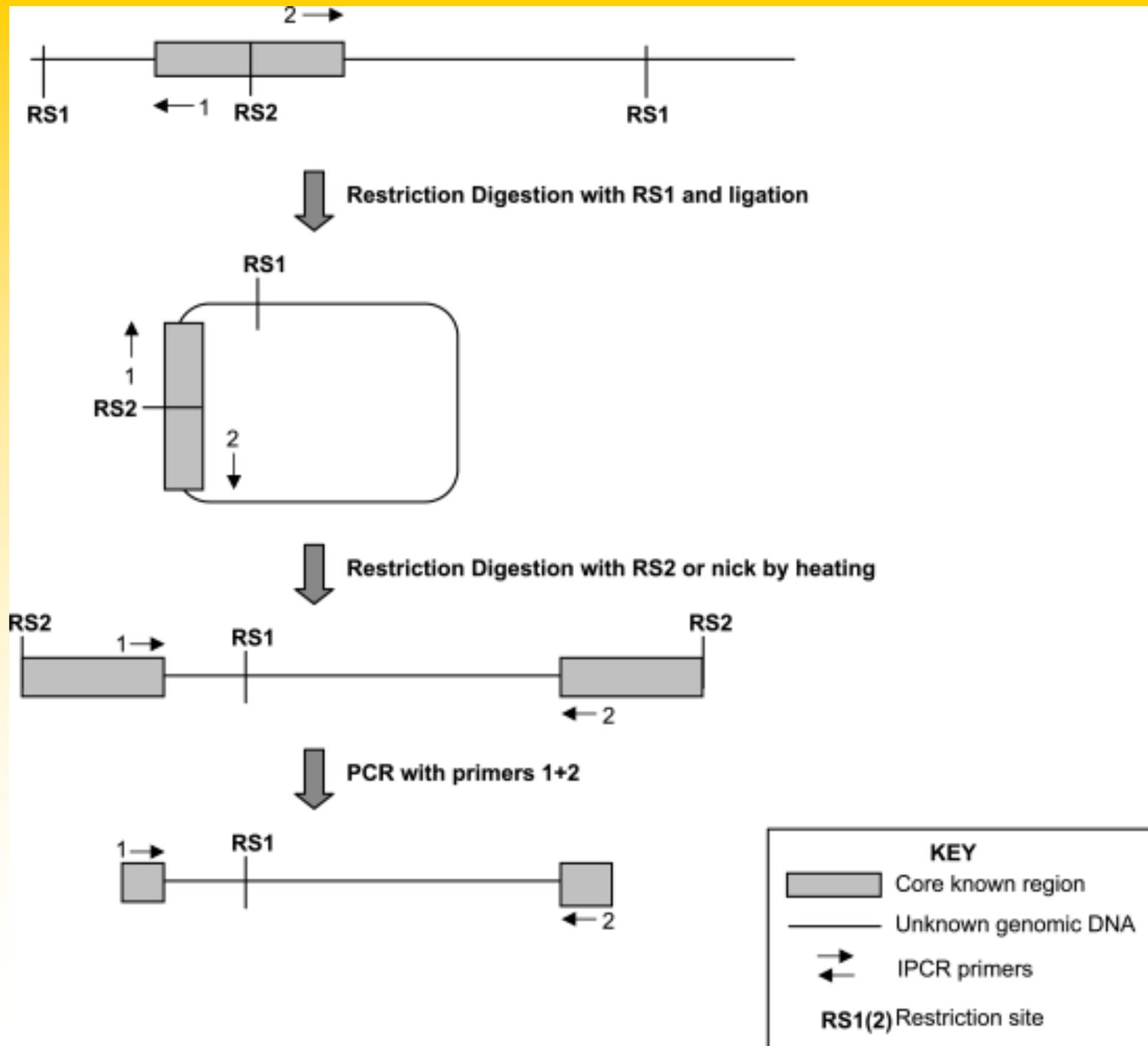
Indispensabile

Una core di DNA a sequenza nota che fornisce l'informazione necessaria per la sintesi dei primers.

Il costrutto circolare è il template per la PCR. Nested PCR per aumentare la sensibilità. DNA chiuso covalentemente è un substrato non molto adatto alla PCR soprattutto nello step di estensione ⇒ variante



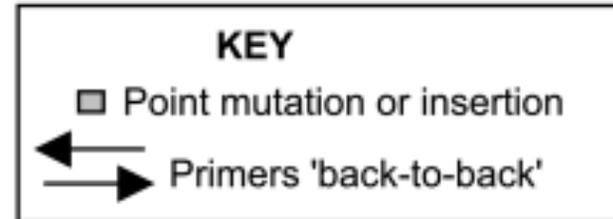
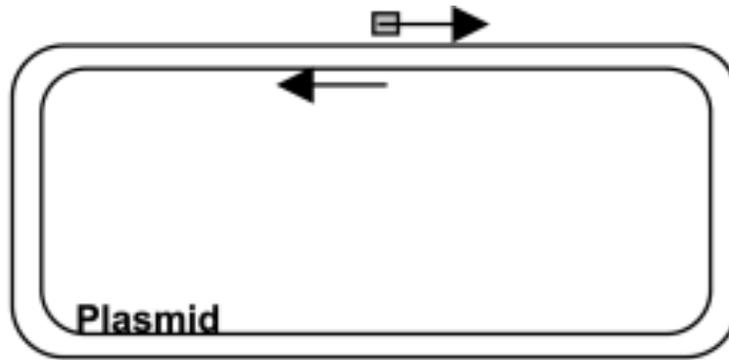
PCR INVERSA COSTRUTTO LINEARIZZATO



CONSIDERAZIONI E APPLICAZIONI

⇒ Step cruciale è la scelta dell'enzima di restrizione per tagliare il DNA target. Se si generano frammenti troppo corti hanno difficoltà a chiudersi, mentre troppo lunghi possono essere un problema per la successiva amplificazione-combinazione con long distance PCR.

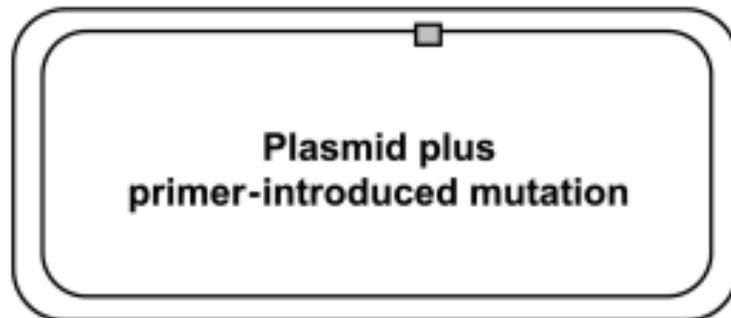
1. **Caratterizzazione di lunghi frammenti di DNA a sequenze ignote e.g., chromosome mapping/walking e identificazione di elementi regolatori (upstream e downstream)**
2. **Determinazione di siti di inserzione di elementi genetici mobili , es integrazione di genomi virali nell'ospite**
3. **Supporto nello studio di meccanismi di mutazione coinvolti in traslocazioni e delezioni**
4. **Costruzione di vettori per knock down per delezioni di geni**
5. **Fingerprinting di microorganismi**
6. **Evoluzione di organismi**



↓ PCR: Including a proofreading enzyme



↓ Self-ligation



↓ Transfection into *E.Coli*

PCR INVERSA-mutagenesi:

PCR del plasmide con un enzima proofreading introduce il cambiamento presente in uno dei primers e porta ad un prodotto a blunt ended. La Self-ligazione del prodotto porterà al plasmide originale e la mutazione. Uso: mutazioni puntuali e inserzioni

80% efficiency mutated plasmid isolation