



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE

TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO DEL DNA E METODICHE DI REAL-TIME PCR



* Premesse

Tessuto
Neoplastico

Tessuto
Normale

Eterogenicità

Mutazione in
eterozigosi

Non Mutato

Prevalente

Nasconde il
segnale



**!!! Microdissezione
per
ridurre il background
da tessuto normale**

✓ Principi generali del sequenziamento secondo Sanger

- 🔍 Nella reazione di sequenziamento si utilizza un solo primer
- 🔍 Per ogni reazione si ottiene la sequenza di un solo filamento di DNA
- 📖 Per sequenziare un frammento di DNA bisogna conoscere la sequenza delle regioni fiancheggianti
- 📝 I dNTP e i ddNTP (presenti in piccole quantità) sono **in competizione** per *l'incorporazione nella catena in crescita*. Questa competizione permette di ottenere reazioni parziali → sequenza



➔ *Si utilizzano ddNTP marcati con molecole fluorescenti e si prepara un'unica reazione*

L'output è un elettroferogramma

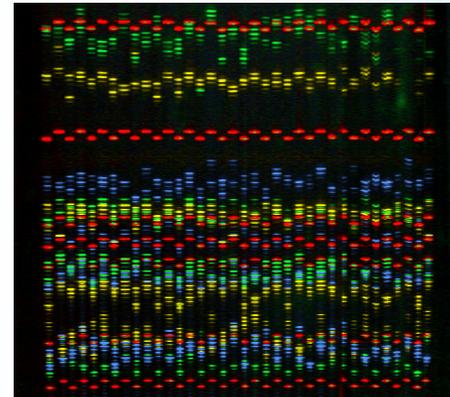
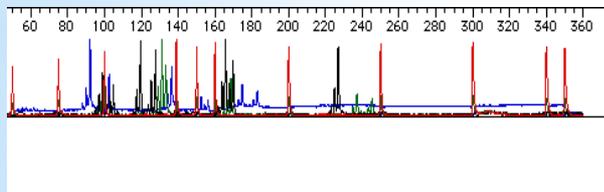
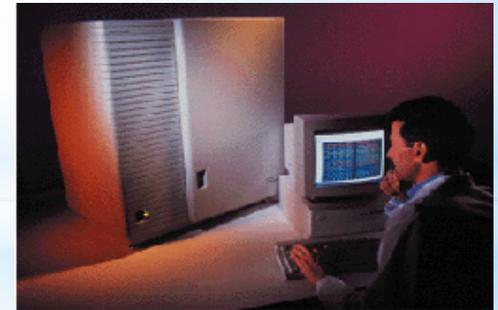
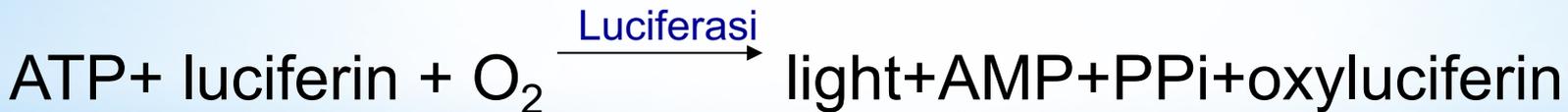


Immagine
Computerizzata
dell' elettroforesi

✓ Pirosequenziamento

Si basa sulla rilevazione del **pirofosfato** rilasciato dall'incorporazione di un nucleotide durante la sintesi del DNA

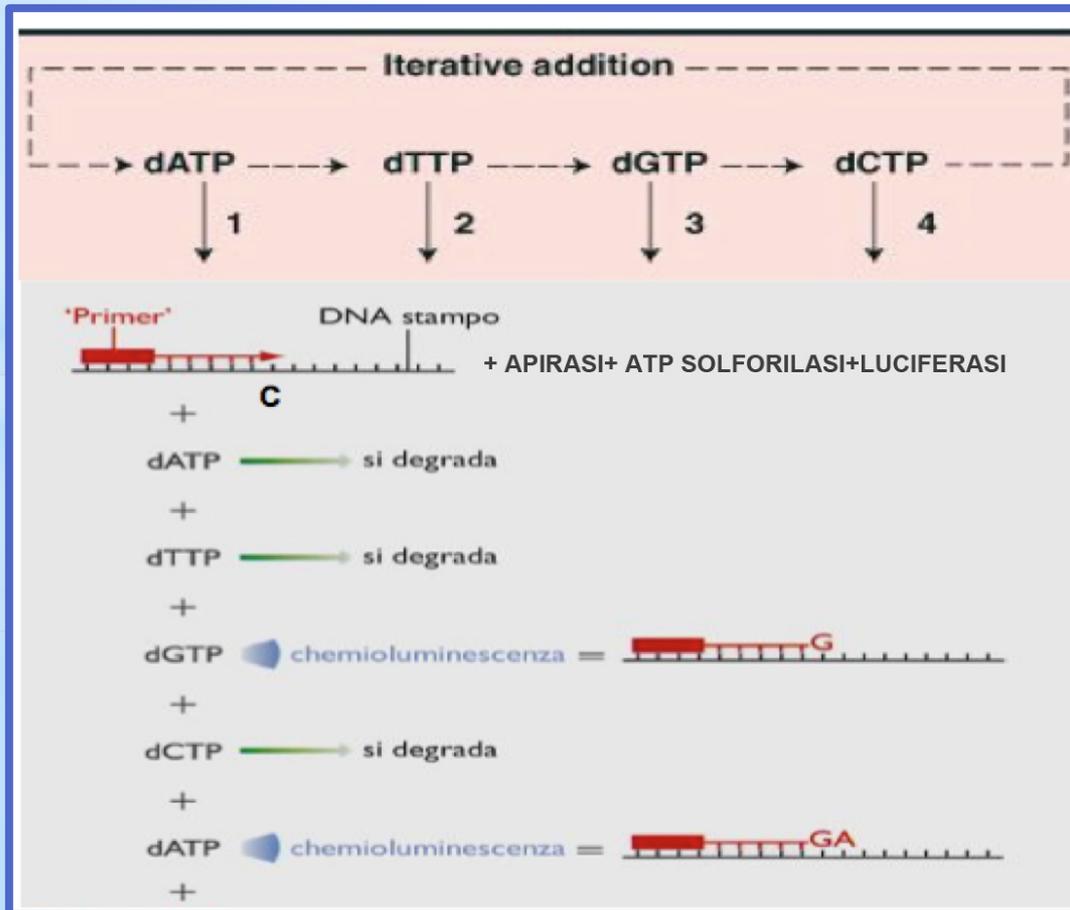


1. La **sequenza da analizzare**, amplificata con la PCR e denaturata, viene incubata con la DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati **adenosinolfosfato** (ASP) e luciferina.
2. La **DNA polimerasi** catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare con il residuo del template. In tal caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato inorganico Ppi
3. Il Ppi viene trasformato in ATP, ad opera della solforilasi e usando l'ASP come substrato. **L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi** con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD).
4. L'enzima **apirasi** **degrada** i dNTPs non incorporati e l'ATP prodotto dalla solforilasi.

✓ Pirosequenziamento

🔓 Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione (ritornando allo step 1)

🔍 Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i d(NTP) fino alla **deduzione completa della sequenza**



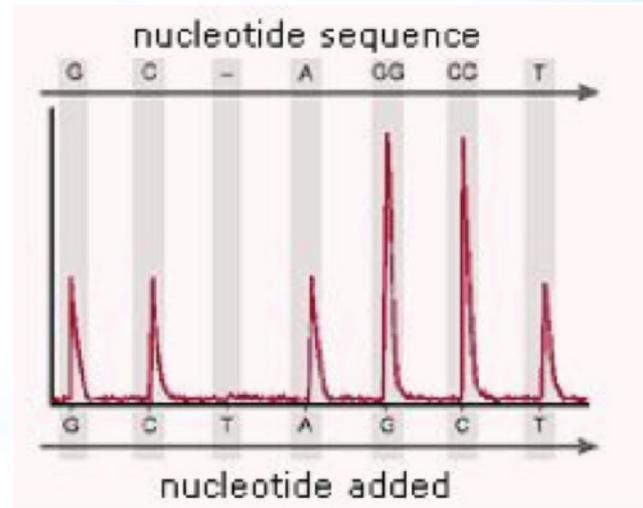
Il segnale luminoso viene registrato in un **"pirogramma"**. Il segnale è proporzionale all'ATP prodotto e quindi al nucleotide inglobato.

Non si utilizza l'ATP come dNTP per non confondere se il segnale rilevato proviene da una corretta incorporazione del nucleotide o dall'attività intrinseca dell'ATP. Si utilizza in alternativa **l'adenosina-tio-trifosfato**, che è riconosciuta dalla DNA polimerasi come se fosse ATP, ma non dalla luciferasi.

✓ Pirosequenziamento



Un picco di intensità doppia, ad esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTP (ripetizione della stessa base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare.

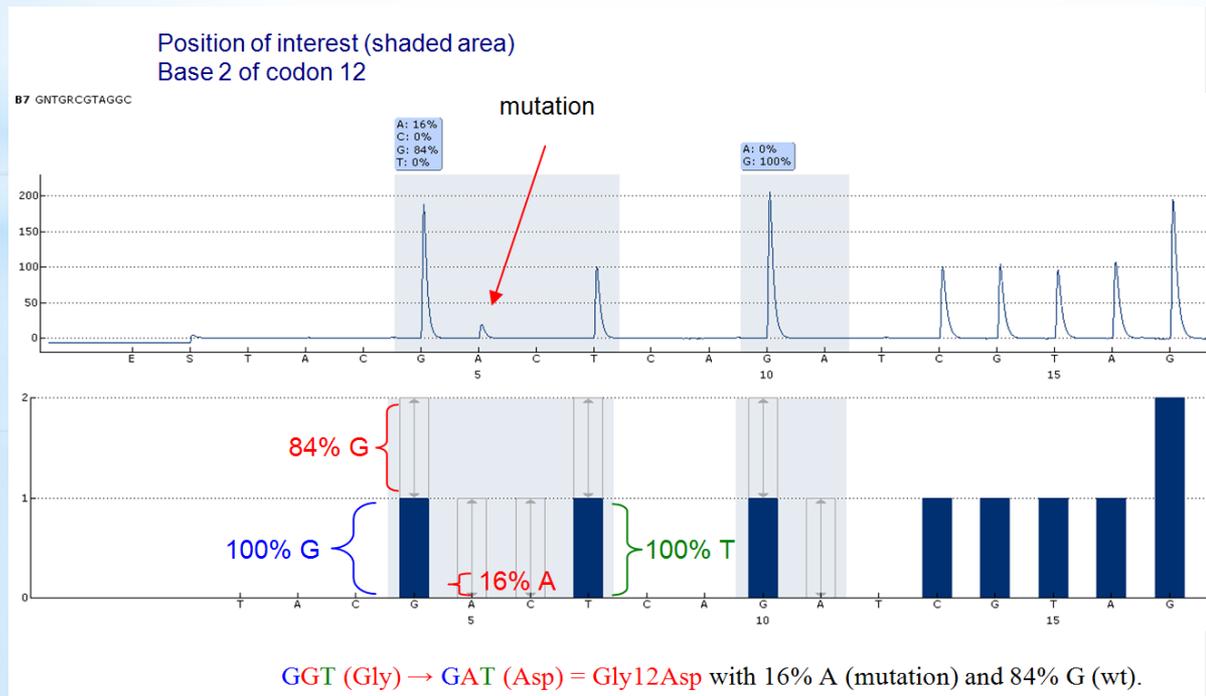


LIMITE: sequenziamento di frammenti relativamente corti, max 800 basi, ma consigliati 300 basi.

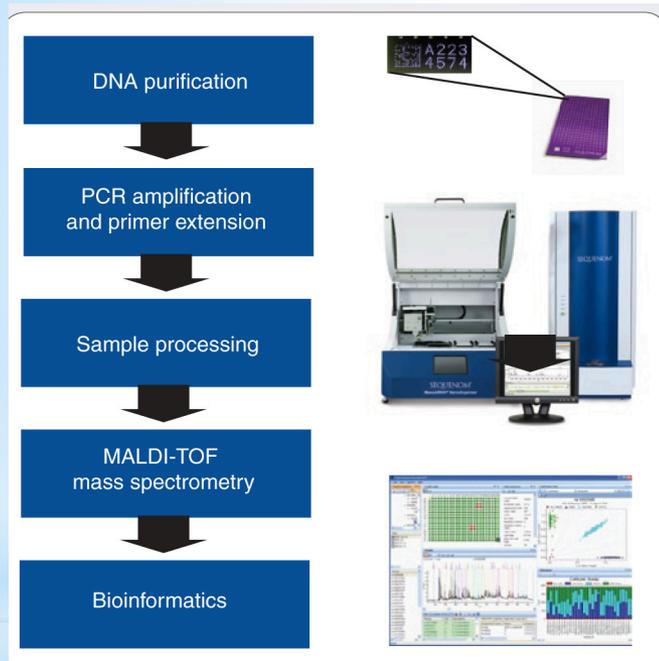
✓ Pirosequenziamento

* In pratica in FFPE

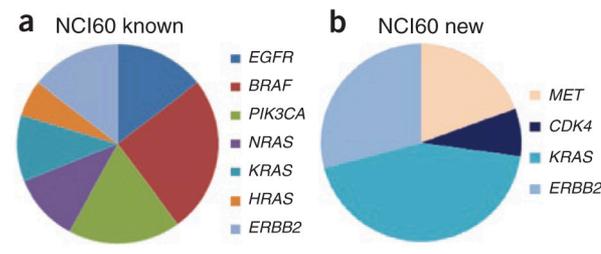
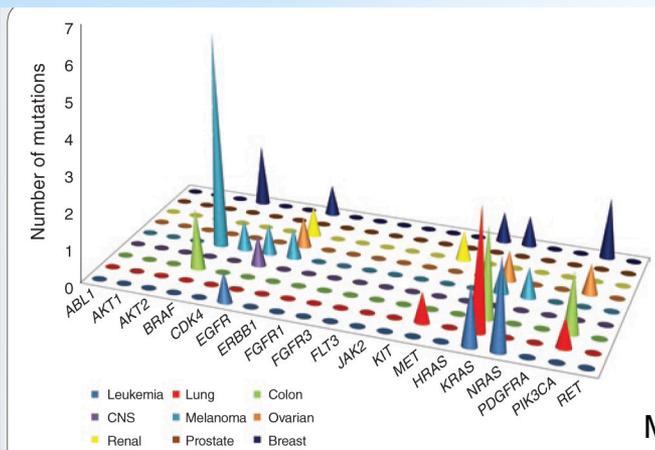
1. Amplificazione con primer biotinilati e rilevazione dei prodotti su un gel di agarosio.
2. Immobilizzazione degli ampliconi su beads di sefarosio
3. Preparazione del DNA ss e appaiamento al primer per la sequenza
4. Caricamento dei campioni e corsa.



✓ MALDI (sequenom)

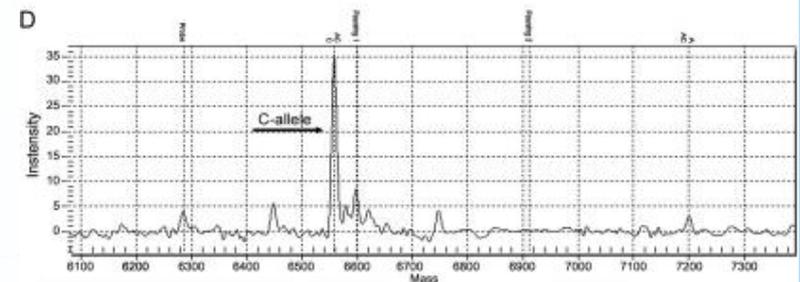
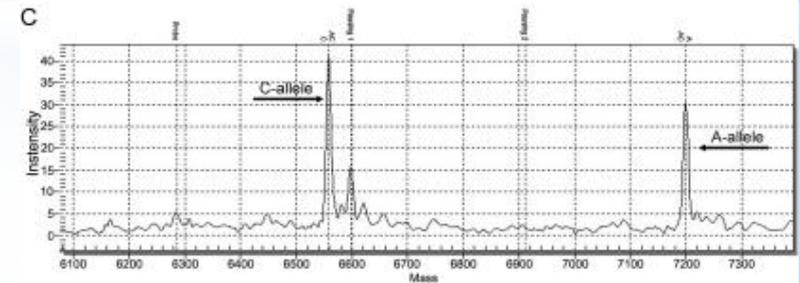
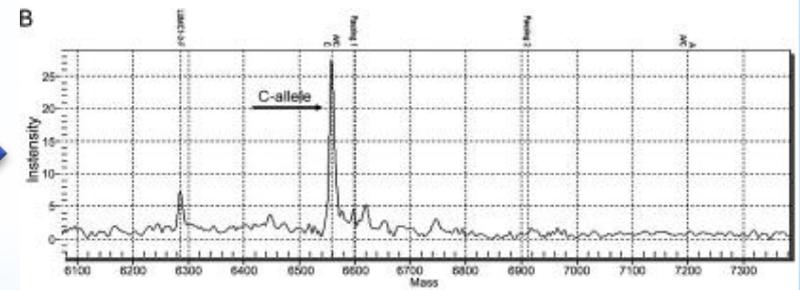
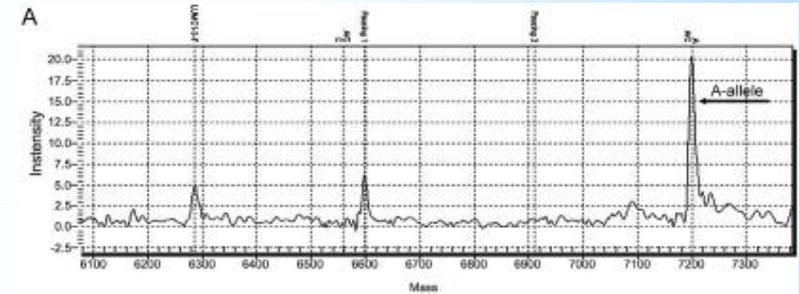
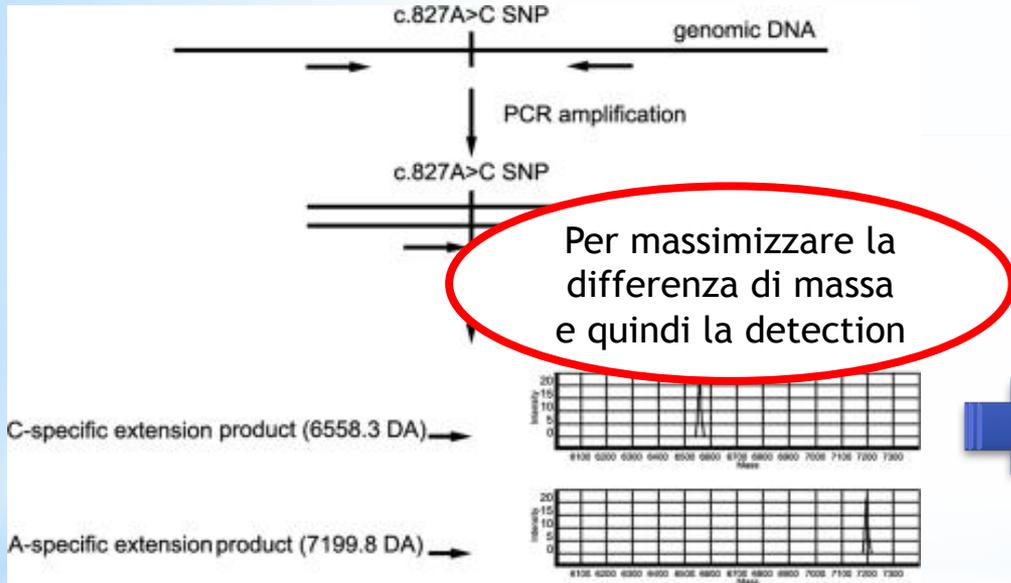


1. Amplificazione PCR che include il sito di mutazione.
2. MassEXTEND reazione specifica di “primer extension” adiacente al sito d’interesse
3. MALDI-TOF per rilevare le differenze in massa



Marisa Pearce, Amy Cullinan, Grant Hogg, Dana Hosseini & Mathias Ehrich
Nature Methods 6, doi:10.1038/nmeth.f.254

✓ MALDI



Il primer per l'extension è adiacente allo SNP o mutazione.

Oltre al primer di extension sono visibili i prodotti di estensione per i 2 SNP o (mutato, non mutato)

Rilevazione in real-time con il software dedicato.

✓ Realtime PCR



Rilevazione di sequenze



**HRM-High
resolution
melting analysis**

**Real Time PCR
con sonde
mutazione
specifiche**

STRUMENTAZIONE

Termocycler interfacciato ad un sistema capace di indurre e leggere la fluorescenza. La stimolazione dell'emissione in fluorescenza viene indotta da un laser. La rilevazione di λ da 500 a 660 nm permette di effettuare analisi in multiplex PCR con l'utilizzo di più fluorofori in un singolo tube.

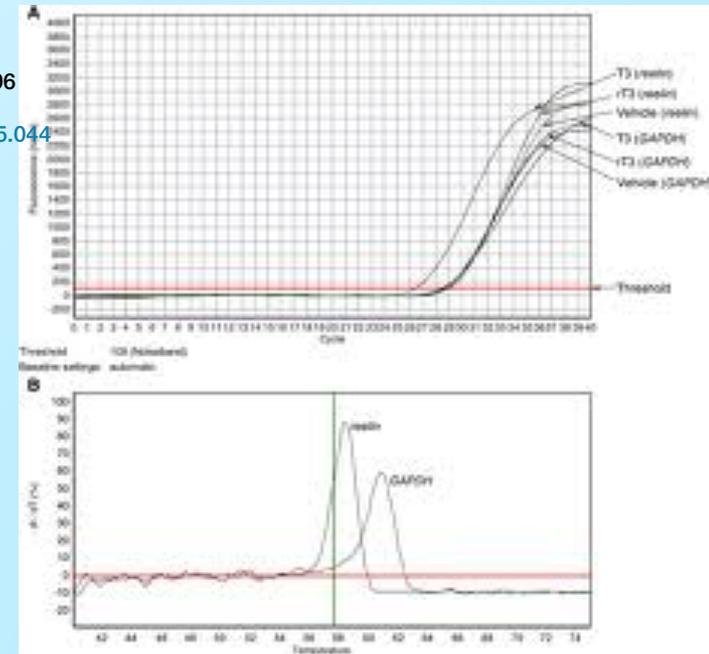
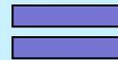


CrossMark

Akbani et al., 2015, Cell 161, 1681–1696

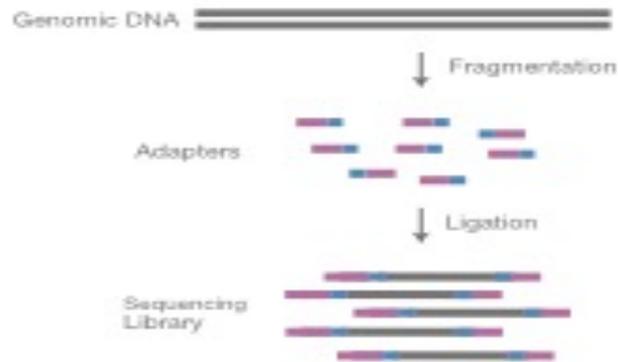
June 18, 2015 ©2015 Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>



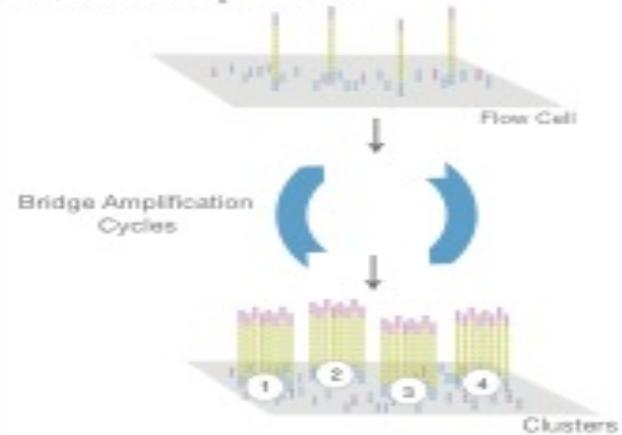
NGS

A. Library Preparation



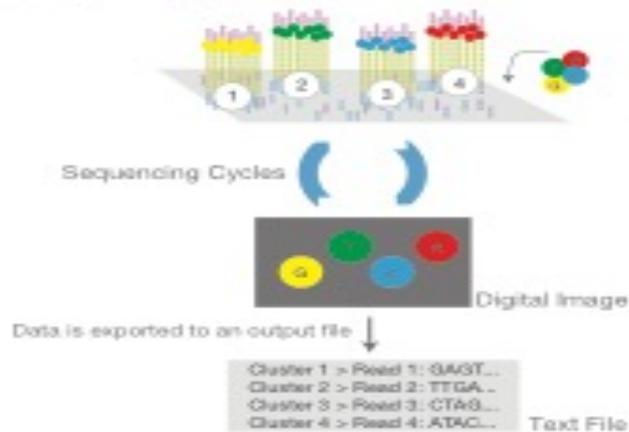
NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

B. Cluster Amplification



Library is loaded into a flow cell and the fragments hybridize to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

C. Sequencing



Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

D. Alignment & Data Analysis



Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

Sequencing Principles

- Sequencing by **Synthesis**
 - Sanger/Dideoxy chain termination (Life Technologies, Applied Biosystems)
 - Pyrosequencing (Roche/454)
 - Reversible terminator (Illumina)
 - Ion torrent (Life Technologies)
 - Zero Mode Waveguide (Pacific Biosciences) 3rd generation sequencing
- Sequencing by Oligo **Ligation** Detection
 - SOLiD (Applied Biosystems)
- Direct reading of DNA sequence
 - Nanopore sequencing 3rd generation sequencing
 - Electron microscope 3rd generation sequencing