

4° esercitazione: PCR - Polymerase Chain Reaction



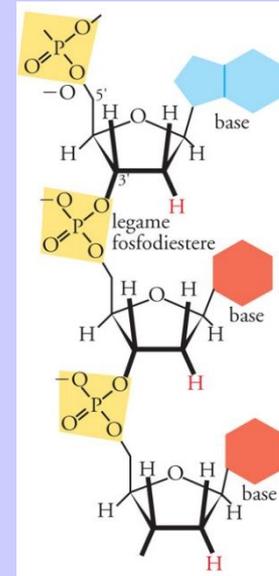
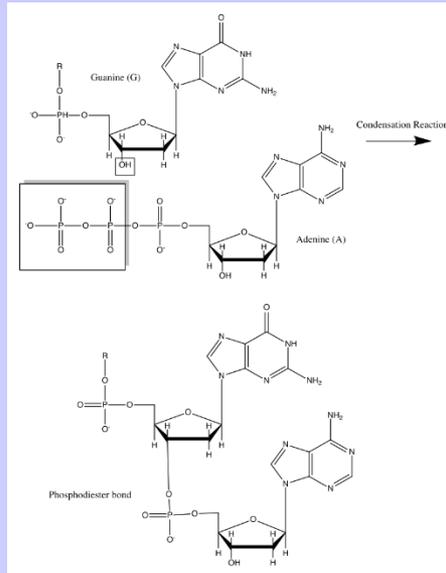
Stabilità del DNA

Parametri intrinseci ed estrinseci che influiscono sulla stabilità

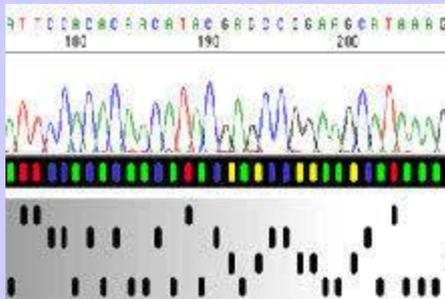


La tecnica si basa sulla possibilità di denaturare e rinaturare il DNA tramite la **temperatura**

Caratteristiche del DNA



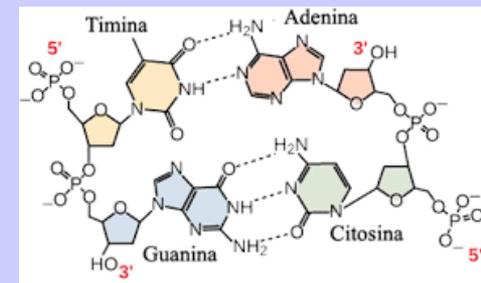
sequenza



Complementarietà delle basi
=
Struttura a doppia elica



composizione

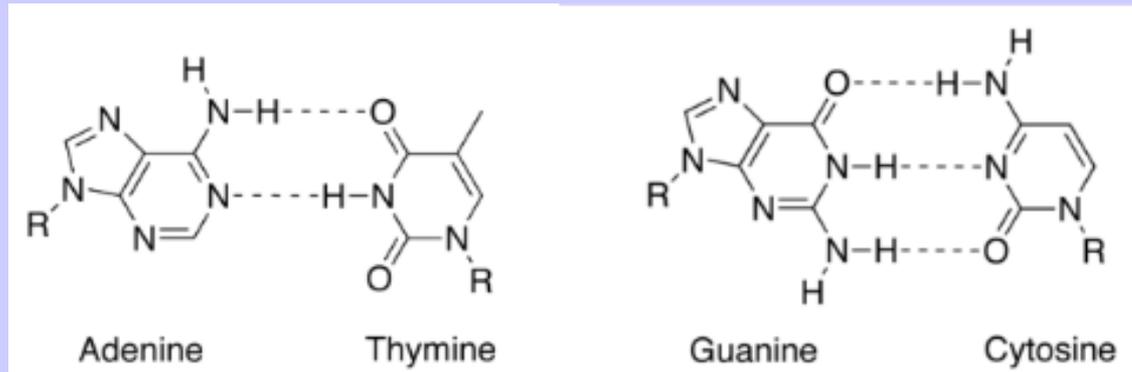


DNA: parametri principali che influenzano la stabilità

Parametri **estrinseci** ed **intrinseci** che influiscono sulla stabilità

temperatura

pH



lunghezza

composizione

PCR – origine

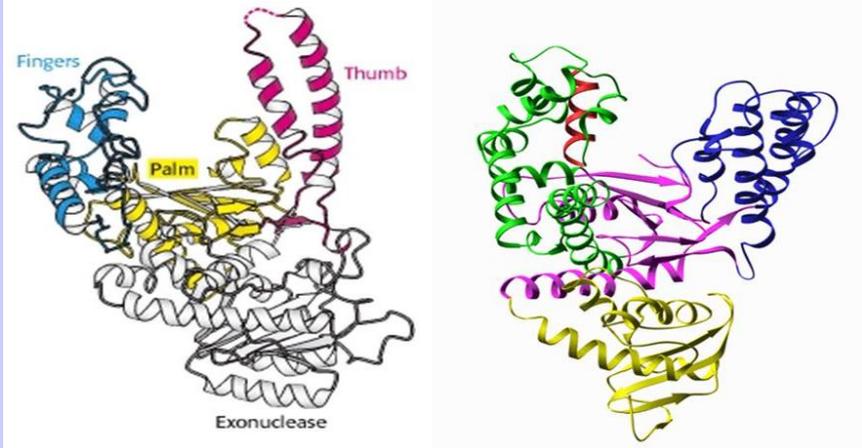
Tutto nasce dalla scoperta di un enzima del batterio termostabile *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969)



TAQ polymerase!



Thermus Aquaticus DNA polymerase

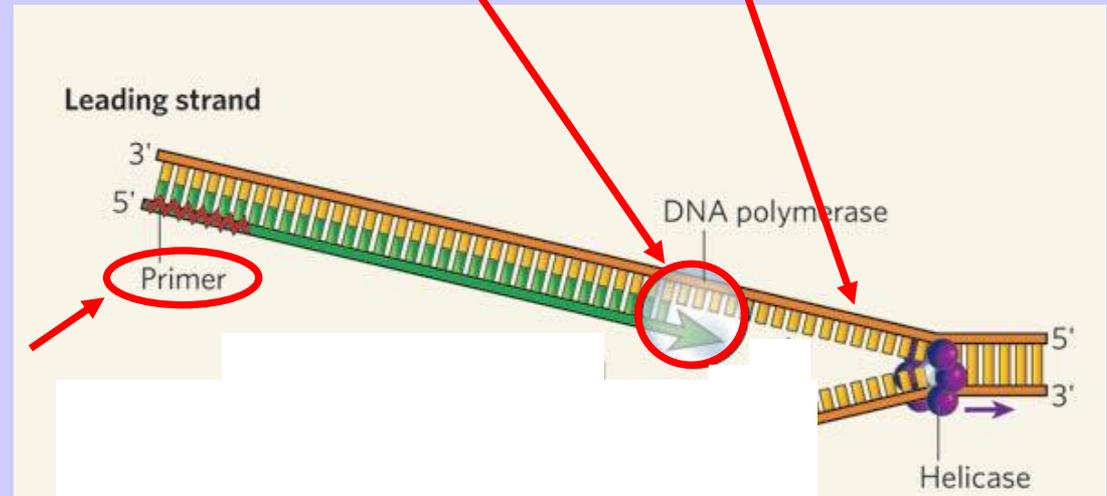


PCR – origine

TAQ polymerase



E' una DNA polimerasi DNA-dipendente in direzione 5'→3'



a differenza delle altre DNA polimerasi,
**rimane attiva anche ad alta temperatura
senza denaturarsi e perdere funzionalità**

PCR – metodo

La reazione a catena della PCR è stata messa a punto da Kary Mullis (1944-2019) nel 1983

The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction

A surprisingly simple method for making unlimited copies of DNA fragments was conceived under unlikely circumstances—during a moonlit drive through the mountains of California

by Kary B. Mullis

Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it. Through an improbable combination of coincidences, misadventures and lucky mistakes, such a revelation came to me one Friday night in April, 1983, as I gripped the steering wheel of my car and snaked along a moonlit mountain road into northern California's redwood country. That was how I stumbled across a process that could make unlimited numbers of copies of genes, a process now known as the polymerase chain reaction (PCR). Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute; it requires no more than a test tube, a few simple reagents and a source of heat. The DNA sample that one wishes to copy can be pure, or it can be a minute part of an extremely complex mixture of biological materials. The DNA may come from a hospital

tissue specimen, from a single human hair, from a drop of dried blood at the scene of a crime, from the tissues of a mummified brain or from a 40,000-year-old woolly mammoth tusk.

In the seven years since that time, applications for the PCR have spread throughout the biological sciences more than 1,000 reports of its use have been published. Given the simplicity of the PCR, the fact that it was discovered by more than 20 years after all the elements for its implementation were available strikes many observers as uncanny.

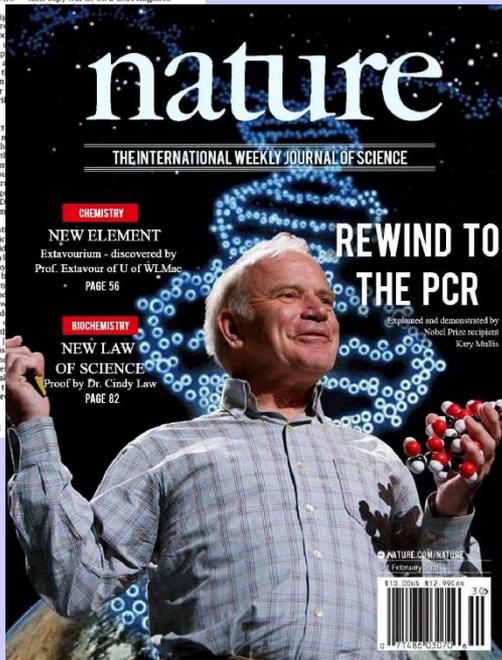
The polymerase chain reaction makes life much easier for molecular biologists; it gives them as much of a particular DNA as they want. Casual discussions of DNA molecules sometimes make them seem like easily obtained objects. The trouble is that in practice it is difficult to get a well-defined molecule of natural DNA from any organism except extremely simple viruses.

The difficulty resides in the nature of the molecule. DNA is a delicate chain made of four deoxyribonucleic acid bases: adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T). The sequence of these bases encodes the genetic information. Rarely does one find a single strand of DNA; usually pairs of strands of complementary sequences form a double helix. In the G-C bond, the A's in one strand bind with the T's in the other and the G's bind with the C's in the opposite strand. In 1966, I became the director of molecular biology at SRI, Inc. Today I still work in La Jolla, Calif., as a private consultant on polymerase-chain-reaction technology and nucleic-acid chemistry.

KARY B. MULLIS describes himself as "a generalist with a chemical proclivity." In addition to the polymerase chain reaction, he is also known for having invented a plastic that changes color rapidly when exposed to ultraviolet light. While working as a biochemistry graduate student at the University of California, Berkeley, he published a paper in *Nature* entitled "The Cosmological Significance of Time Reversal." Mullis received his Ph.D. in biochemistry in 1972. After working as a postdoctoral fellow at the University of Boston Medical School and the University of California, San Francisco, Mullis joined the Genentech Corporation, where he discovered the polymerase chain reaction. In 1986 he became the director of molecular biology at SRI, Inc. Today Mullis still works in La Jolla, Calif., as a private consultant on polymerase-chain-reaction technology and nucleic-acid chemistry.

56 SCIENTIFIC AMERICAN April 1990

© 1990 SCIENTIFIC AMERICAN, INC.



The Nobel Prize in Chemistry 1993

Kary B. Mullis
Michael Smith

Share this



The Nobel Prize in Chemistry 1993



Photo from the Nobel Foundation archive.

Kary B. Mullis

Prize share: 1/2



Photo from the Nobel Foundation archive.

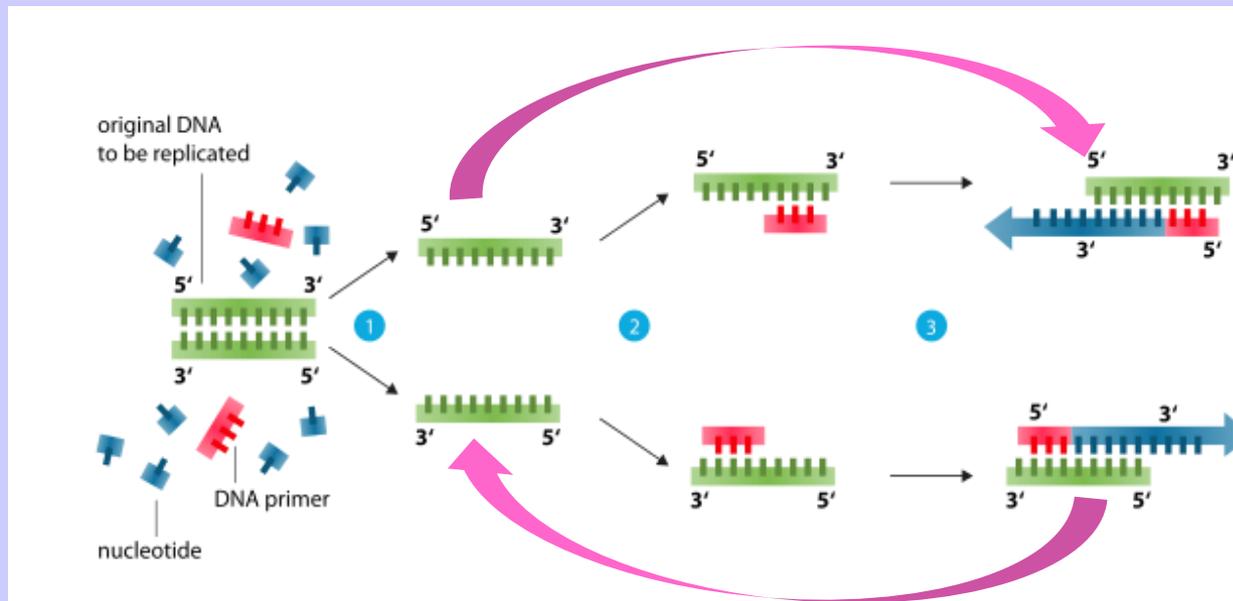
Michael Smith

Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Chemistry 1993 was awarded "for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry" jointly with one half to Kary B. Mullis "for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method" and with one half to Michael Smith "for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies."

Il risultato della reazione di PCR

Da **un originale** viene prodotto un gran numero di **copie**



Varianti del metodo PCR

RT PCR

Nested PCR

qPCR (Real Time)

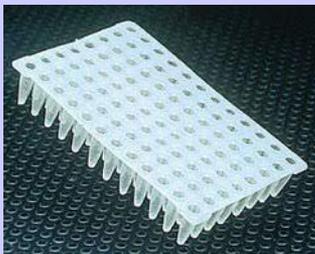
PCR Multiplex

... ed altre ancora



Campi di impiego

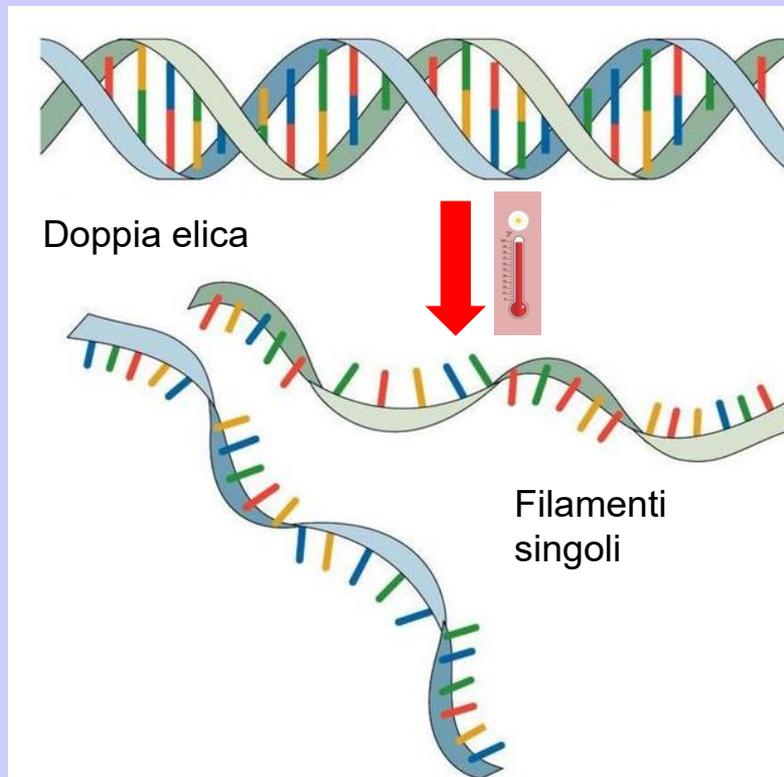
- Ricerca
- Diagnostica (screening per patogeni)
- Genetica forense
- Settore alimentare (OGM, allergeni, etc etc)
- Monitoraggi ambientali
- ...solo per nominarne alcuni



I passaggi della PCR

1. DENATURAZIONE del DNA STAMPO

Parametri intrinseci



I passaggi della PCR

2. APPAIAMENTO dei PRIMERS (annealing)

PARAMETRI CHE
INFLUISCONO SU
QUESTO
PROCESSO



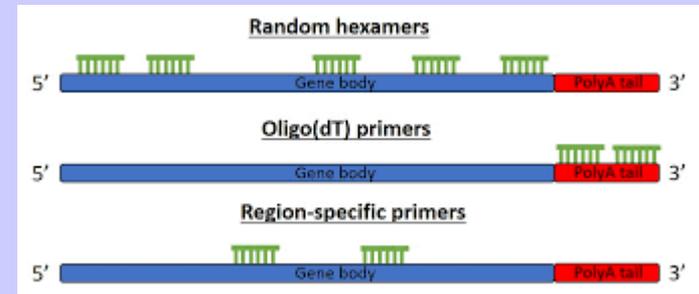
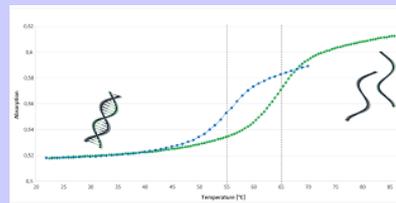
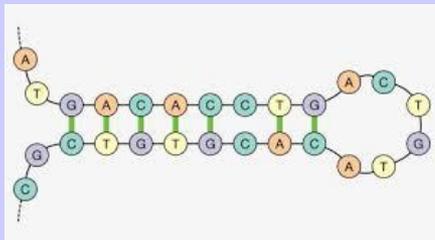
Il design della reazione di PCR

Criteri di scelta dei primers

La coppia di primers *forward* e *reverse*

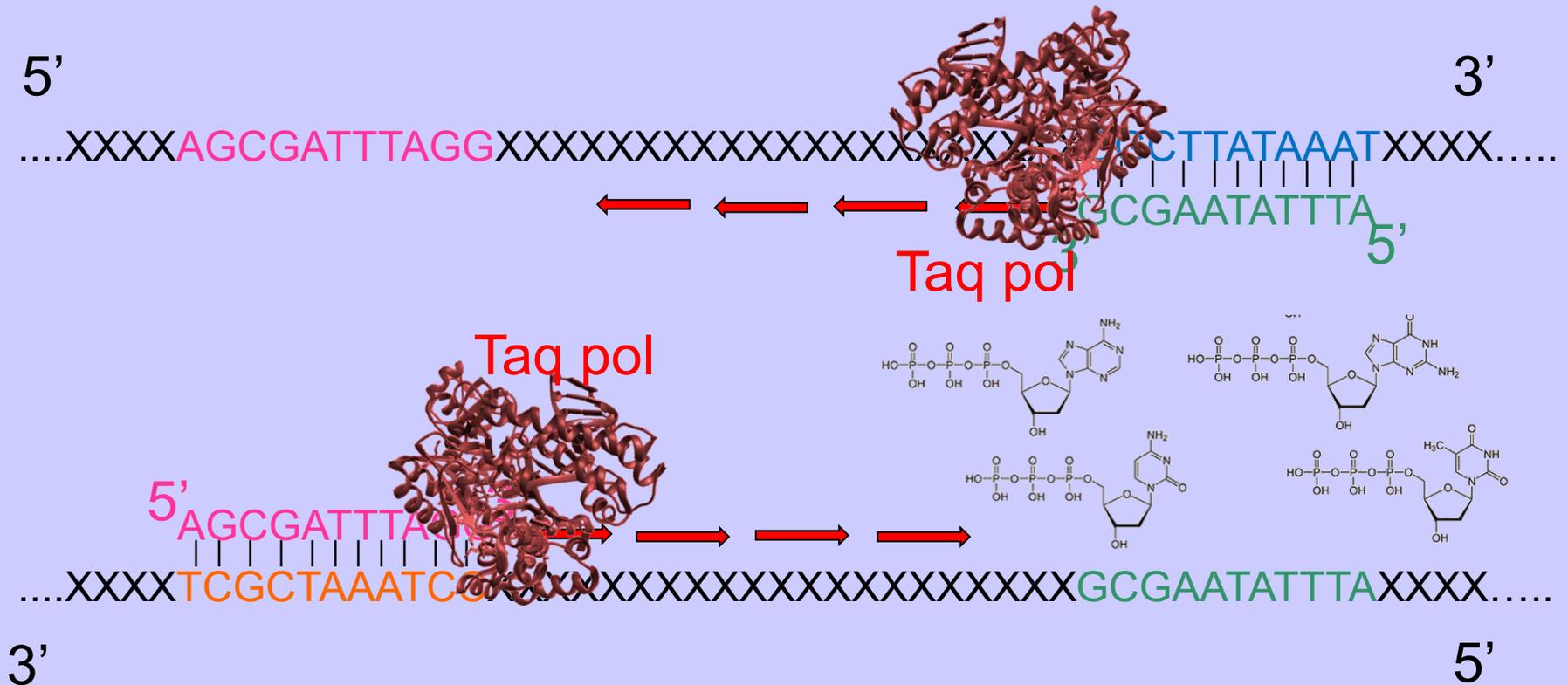
Fattori da tenere in considerazione:

- la regione da amplificare (i primers delimitano la regione)
- lunghezza e tipo di sequenza (specificità)
- composizione della sequenza (stabilità)
- temperatura di *melting* (50% denaturazione, compatibilità dei primers)
- possibilità di formazione di strutture secondarie (forcine, dimeri)



I passaggi della PCR

3. ALLUNGAMENTO



[Mg⁺⁺] concentrazione standard finale è 1,5 mM , ma spesso viene determinata sperimentalmente; è necessaria per la PCR, in quanto influenza l'attività dell'enzima

Le fasi della PCR

Fase iniziale **denaturazione iniziale 94°C; 2'**

STEP 1: denaturazione 94°C; 1'÷3'

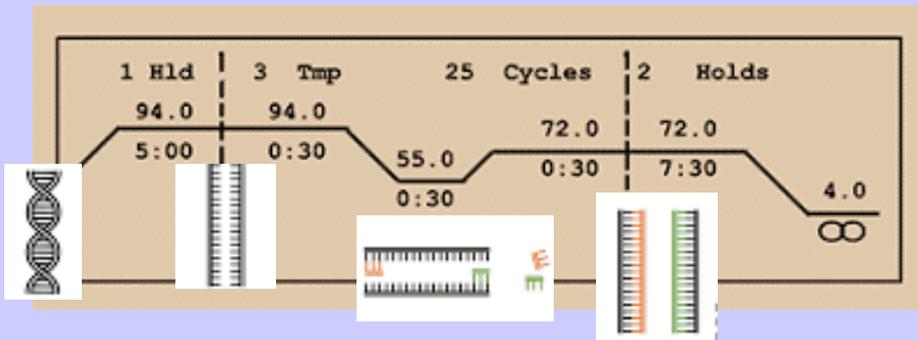
STEP 2: annealing 40°÷60°C; 1'÷3'

STEP 3: allungamento 72°C; 1'



ciclo

Fase finale **allungamento finale 72°C; 3'**



Il nostro esempio:

I cicli vengono ripetuti dalle 30 alle 40 volte

1)- 94°C; 2'

2)- 94°C; 1'

3)- 60°C; 1'

4)- 72°C; 2'

5)- 40 X

6)- 72°C; 10'

7)- 4°C ∞

Il design dell'esperimento di PCR

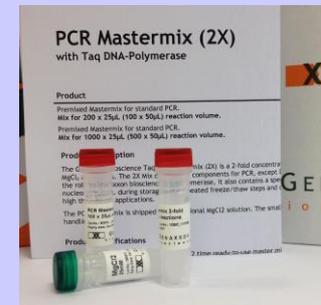
Il set up sperimentale

Quando si allestiscono tante reazioni, viene fatta un'unica miscela contenente **tutti o quasi tutti i componenti necessari (MASTER MIX)**, la quale viene poi suddivisa in tante parti quante sono le reazioni (aliquote dello stesso volume)

Allestimento delle reazioni:

- **buffer di reazione (Mg⁺⁺)**
- **Mix dei 4 deossinucleotidi trifosfato**
- **Taq polimerasi**

MASTER MIX



Ogni reazione viene caratterizzata da:

Primers 5' e 3' (FW & RE)

Stampo DNA

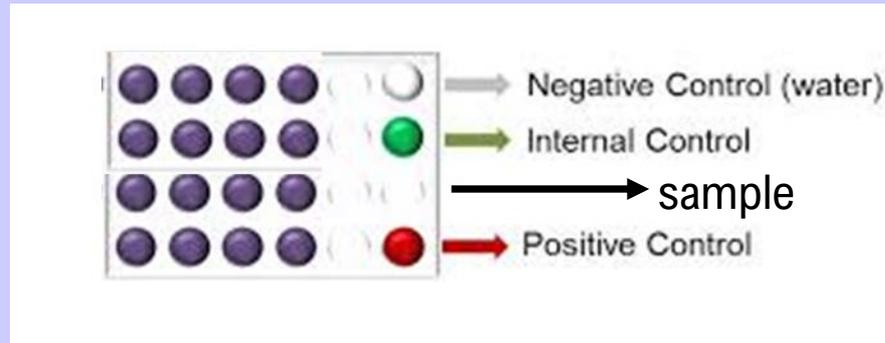
Volume di reazione: dipende dallo scopo dell'amplificazione dal blocco del termociclature e dalle provette dal tipo di pcr
di solito compreso fra 20 e 200 μ L



Il design dell'esperimento di PCR

Il *set up* sperimentale

Come tutti i metodi molto sensibili necessita di **controlli**



Controllo negativo: in genere, **assenza dello stampo**, con lo scopo di evitare la comparsa di falsi positivi

Controllo/i positivi: si utilizzano **stampi già verificati** che hanno la sequenza del prodotto desiderato, con lo scopo di verificare il corretto allestimento delle reazioni e il funzionamento del sistema (dell'enzima in particolare)

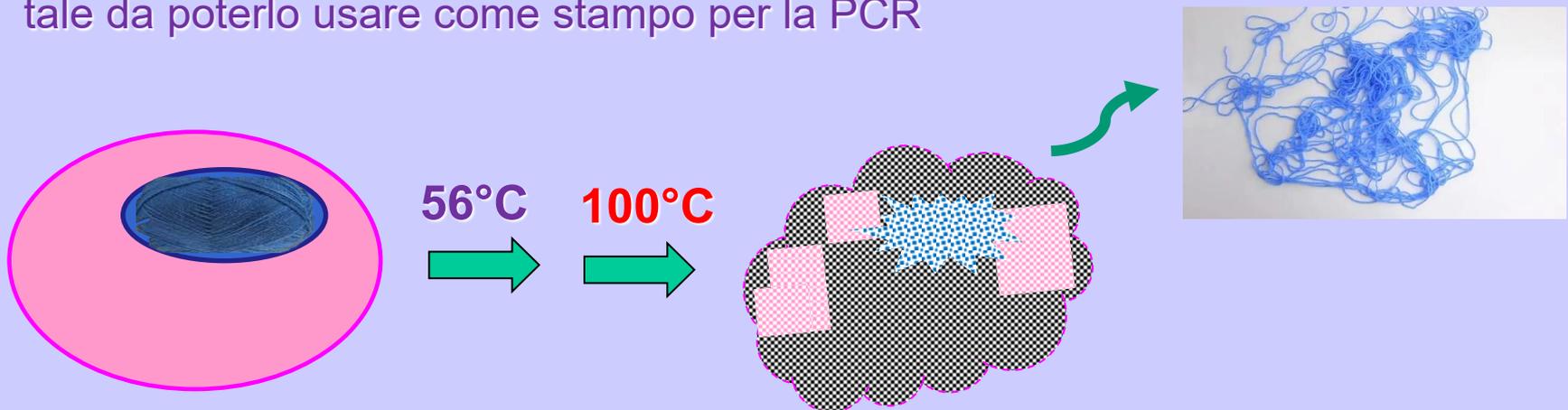
Il controllo interno è un controllo positivo con uno stampo non correlato ai campioni per verificare l'attività dell'enzima

DNA per PCR (STAMPO)

DNA genomico estratto da cellule della mucosa buccale

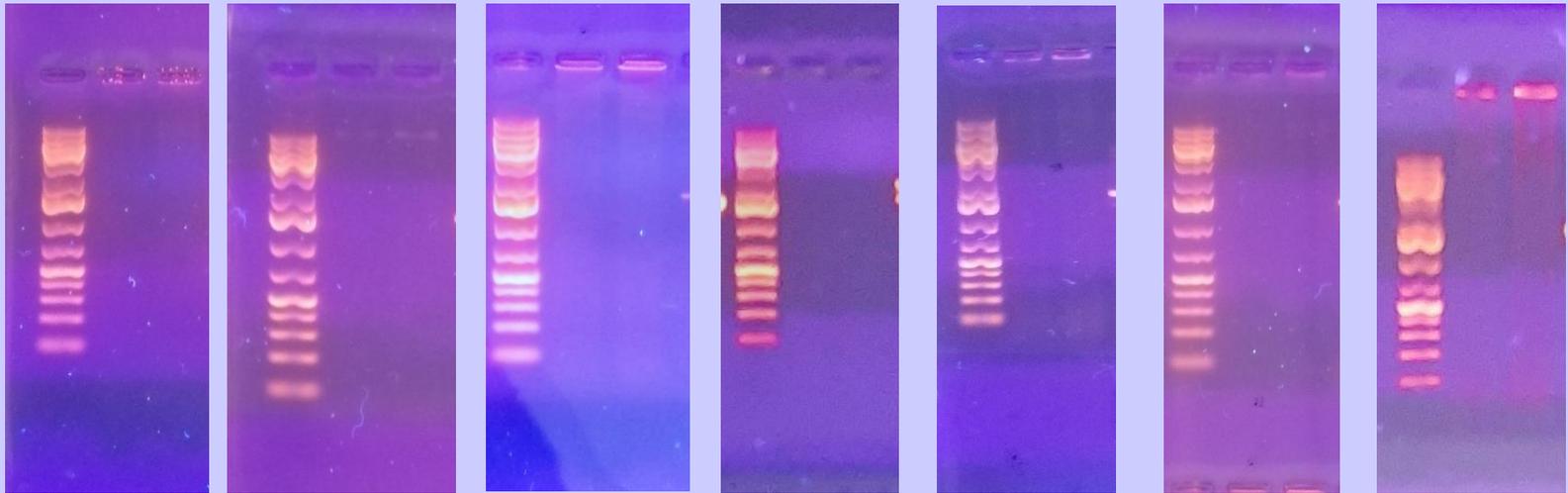
Le cellule vengono semplicemente lisate in modo da far fuoriuscire il DNA genomico evitandone più possibile la frammentazione
Si pre-riscalda il campione a 56°C per inattivare le DNAsi in presenza della MATRICE chelante gli ioni bivalenti, sempre per prevenire l'attività delle endonucleasi metallo-dipendenti affinché il DNA NON venga degradato (lo stampo deve rimanere integro!)

I campioni vengono poi portati a 100°C per rompere le membrane cellulari per il rilascio del DNA genomico nel soprannatante in quantità tale da poterlo usare come stampo per la PCR



I campioni vengono conservati a 5°C piuttosto che congelati, sempre per minimizzare la frammentazione del DNA

L'esempio dell'amplificazione di una regione del genoma umano - il punto di partenza



DNA genomico estratto dalle cellule della bocca

L'esempio dell'amplificazione di una regione del genoma umano contenente le sequenze Alu

Si è visto che in parti non codificanti del genoma quali gli introni possono essere presenti delle sequenze a carattere ripetitivo la cui origine e funzione non è tuttora chiara

Queste sequenze sono chiamate Alu

AluI (*Arthrobacter luteus*) target site: -AG! CT-

Possono essere presenti o meno in lunghezza variabile nel genoma a seconda dell'individuo, pertanto sono molto utili per valutare il grado di relazione tra gli individui

L'esempio dell'amplificazione di una regione del genoma umano contenente le sequenze Alu

DNA genomico estratto

AGCGATTTAGG

GCGAATATTTA

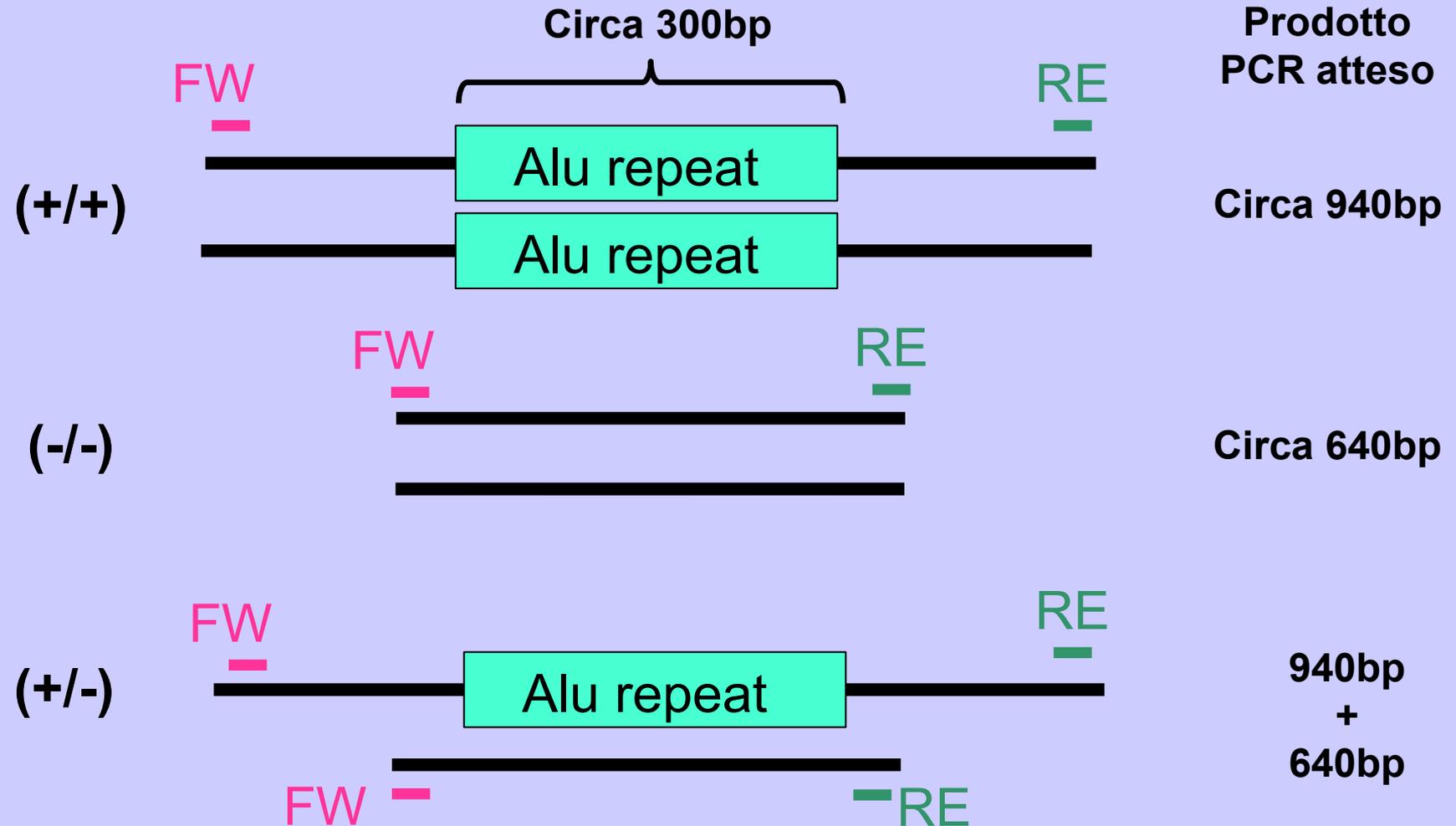


Sono state allestite 4 reazioni di controllo:

- ✓ senza DNA
- ✓ +/+
- ✓ +/-
- ✓ -/-



Nell'esperienza di laboratorio la coppia di primers addizionata alla master mix è specifica per una regione del cromosoma 16 che può contenere o meno una regione ripetitiva di circa 300bp che non è correlata né a patologie, né con la parentela tra gli individui





In questo caso, oltre ai duplex +/+ e -/- si possono formare dei duplex con forcine che daranno luogo a bande che migrano oltre le 1000bp

