

PCR tradizionale e Real-Time

nel rilevamento di *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis:
metodiche a confronto



Nozioni generali di biologia molecolare

La **biologia molecolare** ha il compito di studiare i meccanismi molecolari alla base della fisiologia di tutti gli esseri viventi.

In particolare, questa branca della biologia si concentra sulle interazioni tra le proteine e gli acidi nucleici (DNA e RNA) consentendone l'amplificazione (PCR), l'analisi e la rilevazione



PCR (polymerase chain reaction)

Tecnica inventata da Kary Mullis alla fine degli anni'80.

Lo scopo è produrre *in vitro* grandi quantità di una specifica sequenza di DNA, partendo da un filamento di DNA estremamente complesso.



Le FASI della PCR

1. DENATURAZIONE:

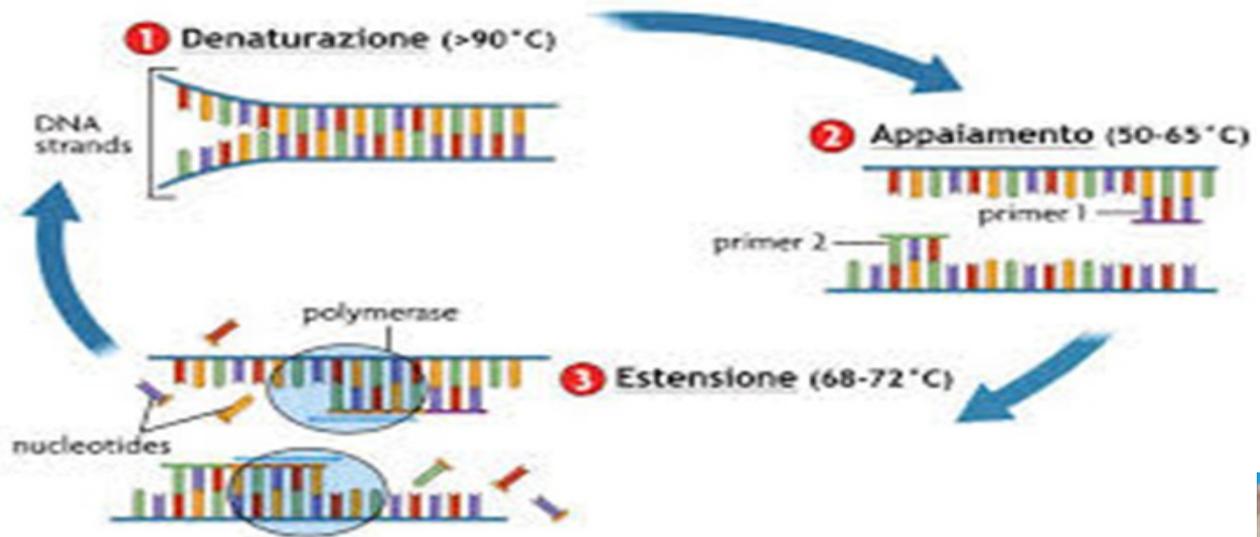
Il DNA viene denaturato mediante riscaldamento in provetta a ~ 92-95°C.

2. ANNEALING:

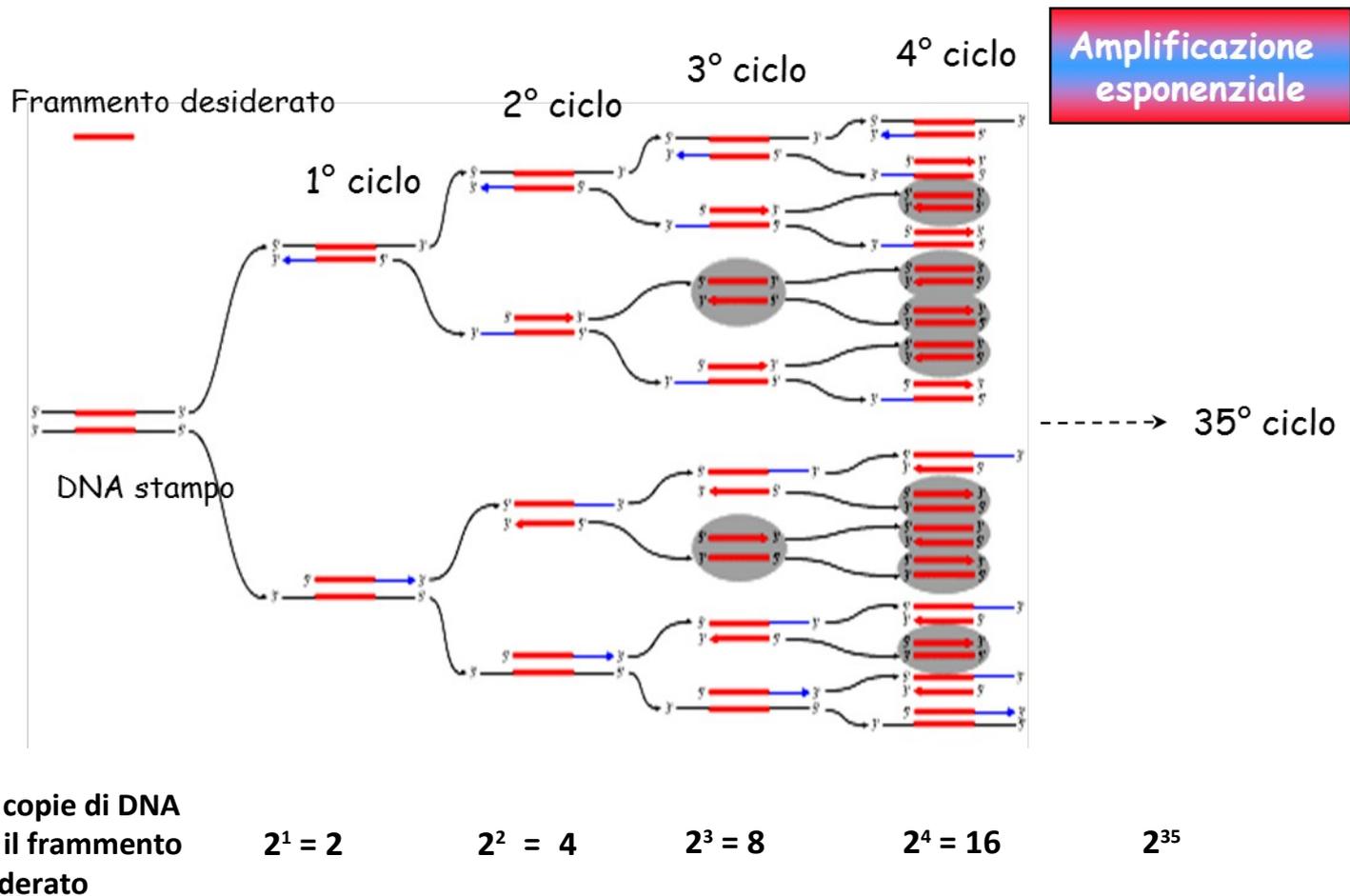
La miscela viene raffreddata (50-65°C) fino a raggiungere la temperatura che garantisce la specifica ibridazione dei primers alle regioni dello stampo ad essi complementari

3. ALLUNGAMENTO:

La temperatura della miscela viene portata a 68-72°C consentendo alla DNA polimerasi di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall'innesco oligonucleotidico



I primi 4 cicli della PCR in dettaglio



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

- Quantità dei primers;
- dNTP;
- $MgCl_2$;
- Attività della Taq polimerasi;
- Reannealing dei filamenti.

Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

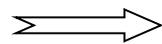


COMPONENTI di una REAZIONE di PCR

Stampo \Rightarrow DNA a doppio filamento

**Deossiribonucleotidi
Trifosfati (dNTPs)** \Rightarrow Miscela equimolare di dATP,
dTTP, dGTP, dCTP

Lo ione Mg^{2+}



Influenza la performance della Taq
Polimerasi.

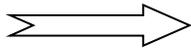
Il DNA templato, agenti alchilanti (EDTA o
citrato), dNTPs e proteine ne influenzano
la concentrazione libera.

Basse quantità non attivano la Taq
Polimerasi;

Eccesso riduce la «fedeltà» dell'enzima
ed aumenta prodotti aspecifici.



Primers



Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio.

Devono avere una lunghezza di almeno 16 nucleotidi (preferibile 20-24).

Devono contenere il 40-60 % di C+G; concentrazioni troppo elevate possono portare alla formazione di ripiegamenti.

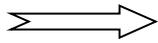
La T ° di annealing dipende dal primer con la temperatura più bassa (melting temperature – T_m).

Utilizzati alla concentrazione 1 μM (sufficienti per 30 cicli);

Alte concentrazioni possono portare ad amplificazioni di sequenze indesiderate, al contrario, concentrazioni basse portano ad un'inefficienza della PCR stessa.



Enzima



Tradizionalmente viene usata la Taq polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* .

l'enzima possiede un'attività esonucleasica 5'--> 3', mentre non mostra alcuna attività esonucleasica 3'--> 5'. Questo fatto contribuisce a rendere la PCR un metodo non particolarmente sensibile, in quanto l'accuratezza della Taq-Pol è di circa 1 errore ogni 10⁴ nucleotidi aggiunti.

Caratteristiche importanti di queste polimerasi sono: la termostabilità, la processività (affinità per lo stampo che determina il numero di basi incorporate prima della dissociazione), la fedeltà di incorporazione.



Campi d'utilizzo

- Diagnosi malattie virali e batteriche;
- Identificazione malattie ereditarie;
- Studi d'evoluzione e filogenesi;
- Clonaggio di un gene;
- Genotipizzazione di specifiche mutazioni e polimorfismi.



PCR End Point

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

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



Fasi PCR End-Point

1. Estrazione del campione e preparazione della miscela di reazione;
2. Amplificazione (termociclatore);



3. Preparazione gel d'agarosio ed elettroforesi

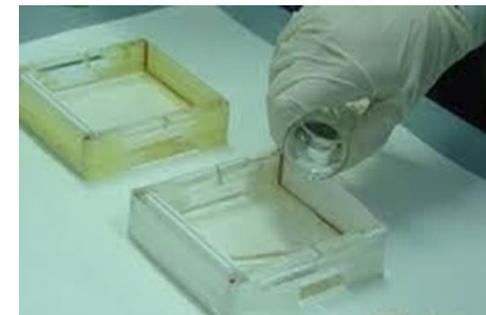
Pesare la quantità desiderata di agarosio ed aggiungere un volume adatto di tampone in base alla concentrazione del gel che si vuole ottenere;

Sciogliere l'agarosio tramite riscaldamento;

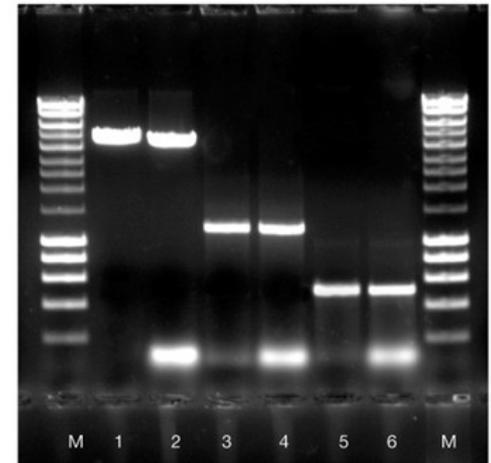
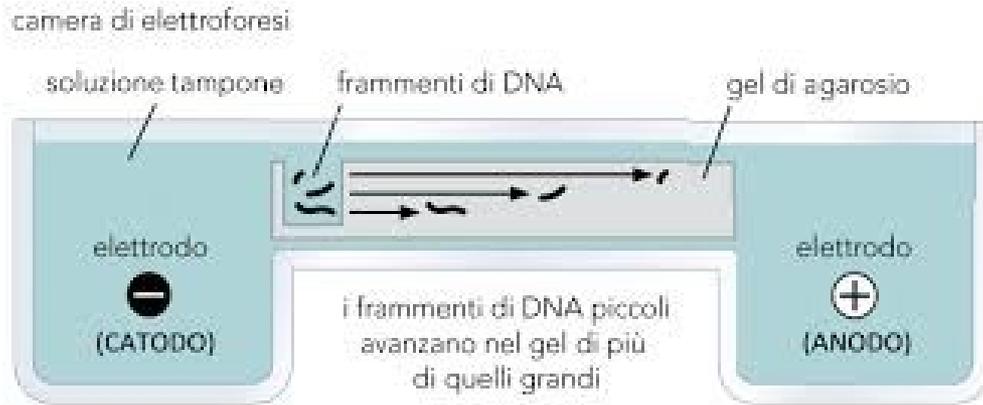
aggiungere l'intercalante (bromuro d'etidio, Gel Red) e versare nell'apposito apparato per la corsa elettroforetica. (l'intercalante ha la funzione di rendere visibile il DNA assorbendo nel campo degli UV ed emettendo nel visibile);

Caricare i campioni ai quali è stato aggiunto un colorante (loading buffer), nei pozzetti del gel d'agarosio (il loading buffer aumenta la densità dell'acido nucleico favorendone la deposizione nel pozzetto e permette di monitorare il tracciato durante la corsa elettroforetica);

Aggiungere alla corsa il Ladder (costituito da frammenti di DNA aventi dimensioni note e consente di determinare la dimensione del DNA campione);



- avviare la corsa elettroforetica fornendo energia elettrica (se il voltaggio è troppo elevato le bande si corrono troppo velocemente lasciando una scia, mentre quando è troppo basso viene ridotta la mobilità, provocando l'allargamento della banda in seguito a diffusione);



- Avvenuta la corsa, illuminare il gel con raggi UV per rendere visibile il DNA.



La PCR end-point non è un metodo quantitativo ma qualitativo.

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

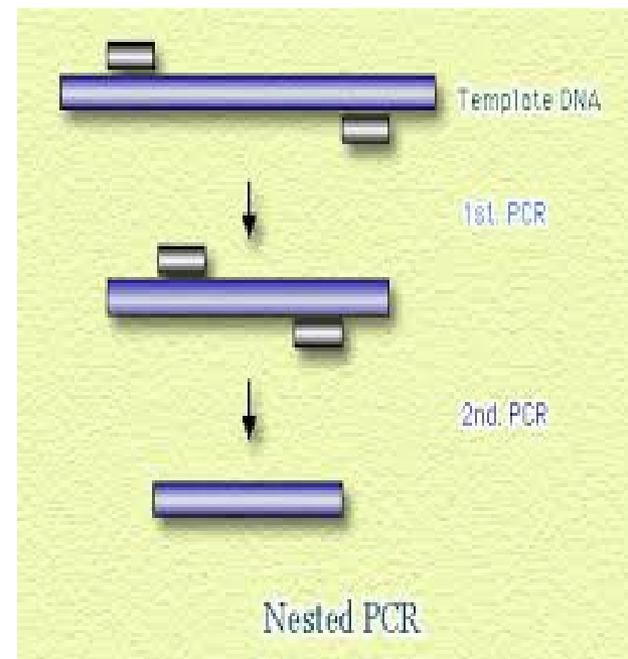


Nested PCR

Una variante della tecnica di PCR end-point.

Prevede due distinte e successive reazioni di amplificazione:

- Nella prima amplificazione si utilizzano primers più esterni al frammento di DNA da amplificare
- Nella seconda amplificazione si utilizzano primers che amplificano un frammento interno a quello amplificato nella reazione precedente.
- Se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.



Multiplex PCR

Consiste nell'utilizzo di diverse coppie di primers nella stessa reazione di amplificazione.

Pertanto risulterà possibile amplificare più frammenti di DNA nella stessa reazione di amplificazione.

Tale tecnica consente di amplificare nella stessa reazione più frammenti di geni caratteristici per una specie, oppure più frammenti specifici appartenenti a specie diverse.



PCR Real Time

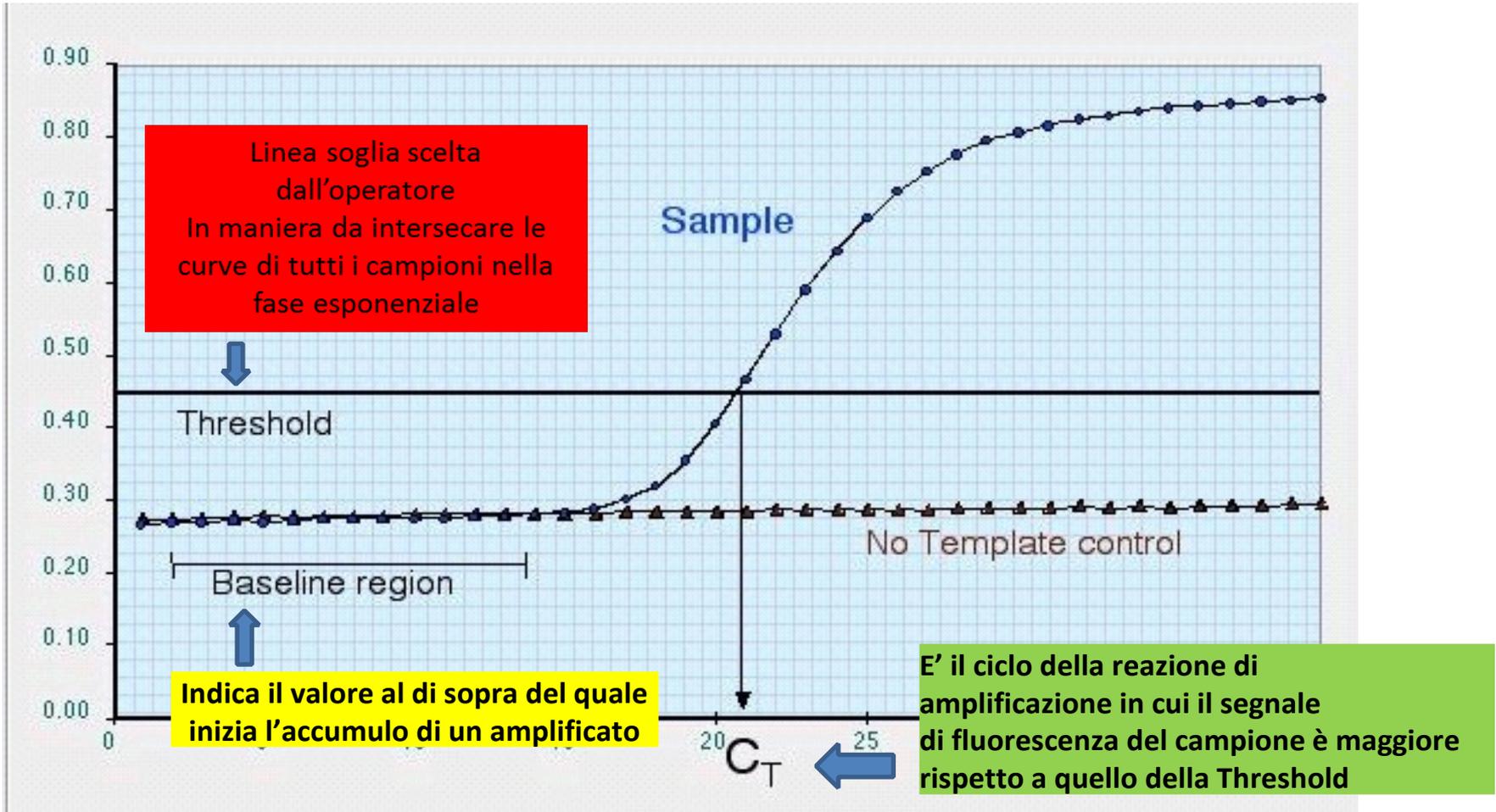
Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati e quantitativi.

impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR.

La misurazione della fluorescenza dà in tempo reale la quantità dello specifico prodotto di PCR



PCR Real Time



PCR Real Time

- **Maggiore** è il numero delle “molecole stampo” presenti all’inizio della reazione e **minore** sarà il numero di cicli necessari per raggiungere un determinato valore minimo di ammontare di prodotto (Cycle threshold (Ct) - ciclo soglia).
- 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.



Quantificazione

ASSOLUTA: i campioni sono quantificati in modo assoluto

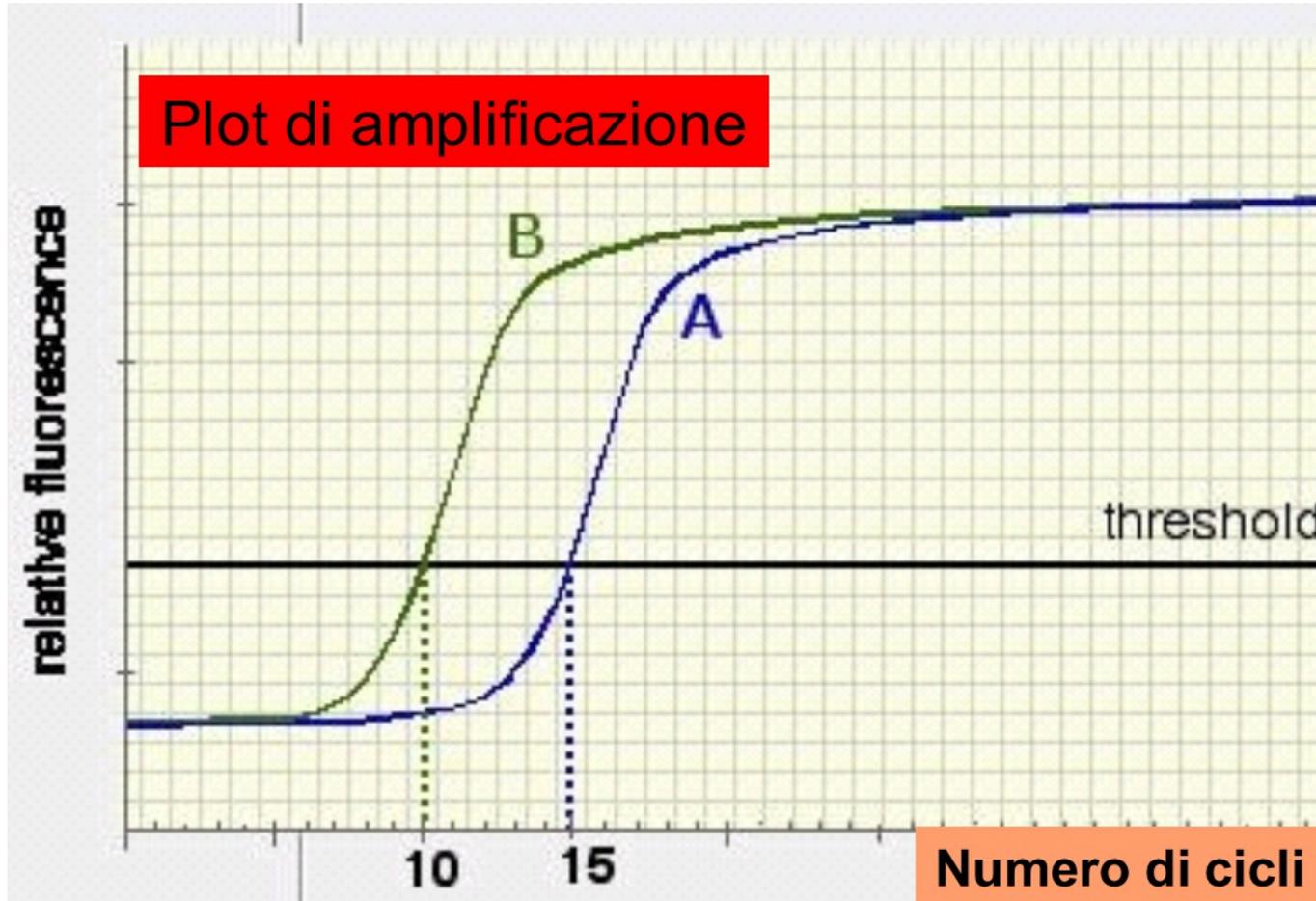
- Necessita di standard di cui si conosce la concentrazione assoluta (utilizzo di una curva standard);
- Per tutti gli unknowns devono essere saggate identiche quantità di campioni.

RELATIVA: la quantificazione viene effettuata paragonando i C_T

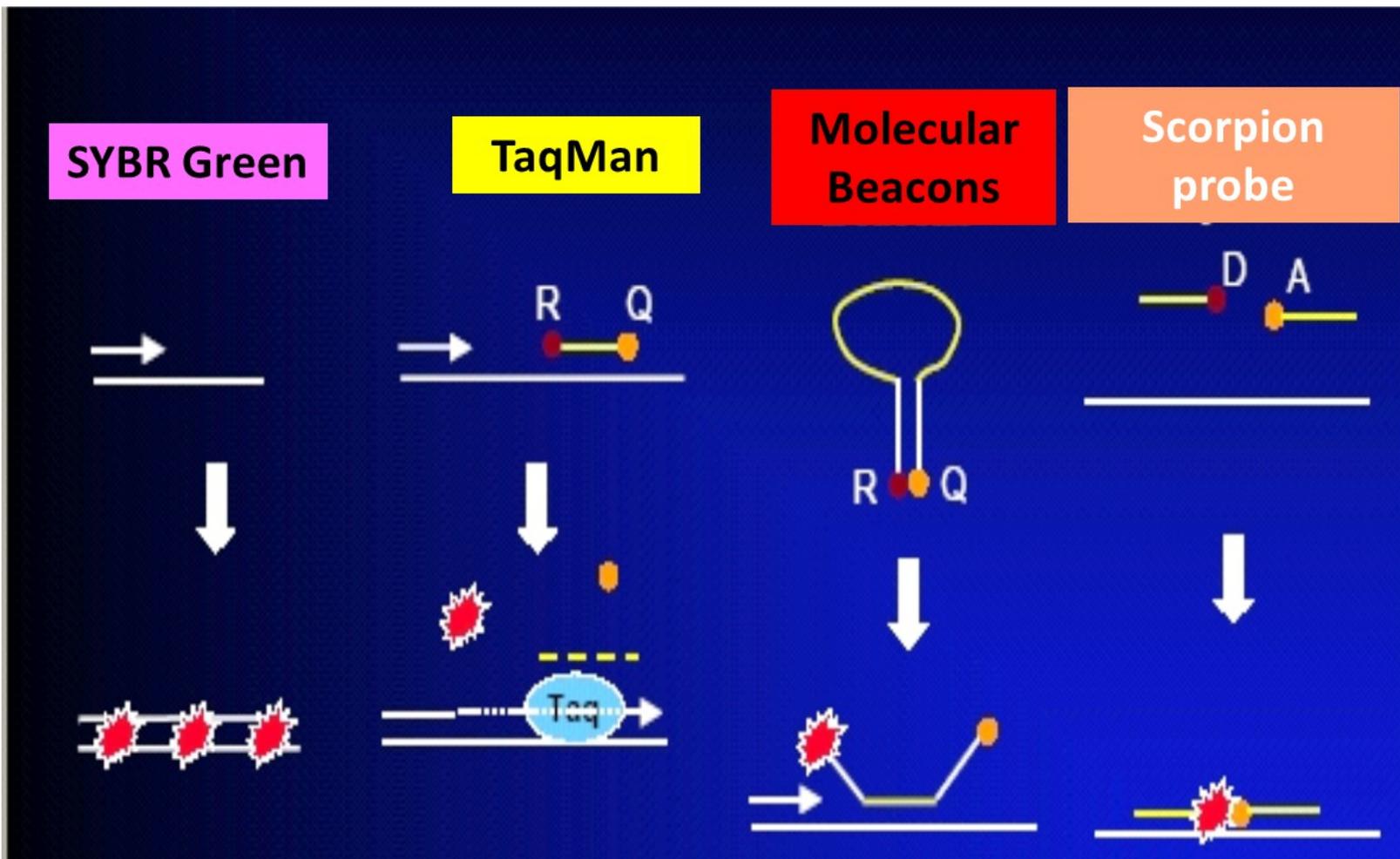
- Necessita di controlli endogeni (non si utilizza una curva standard);
- Gli unknowns vengono “quantificati” paragonando il loro ΔC_T con quello del controllo endogeno.



Quantitativa relativa



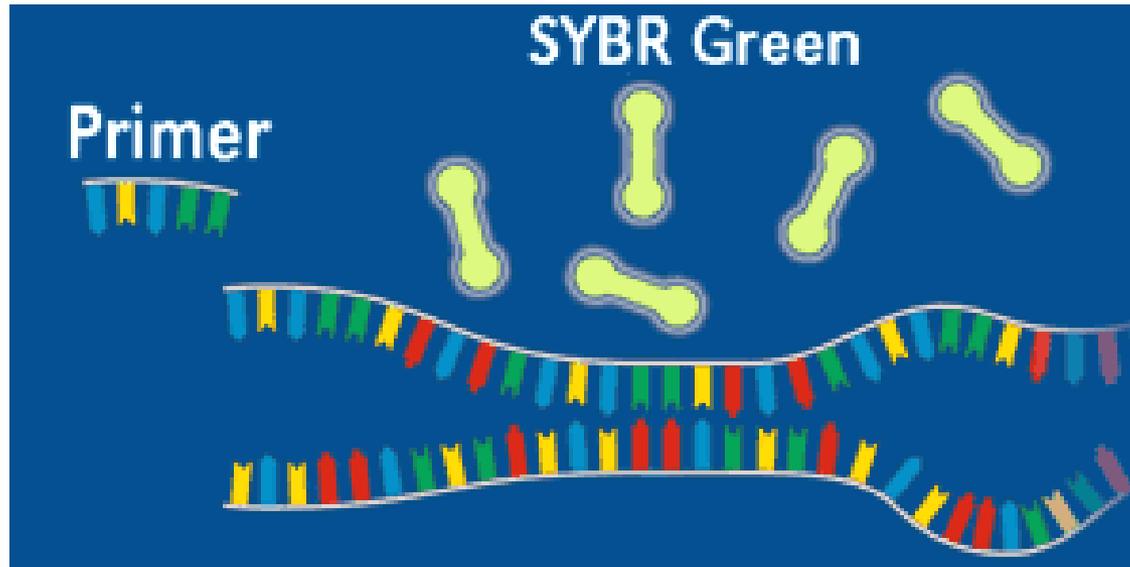
Metodi di rilevamento della fluorescenza



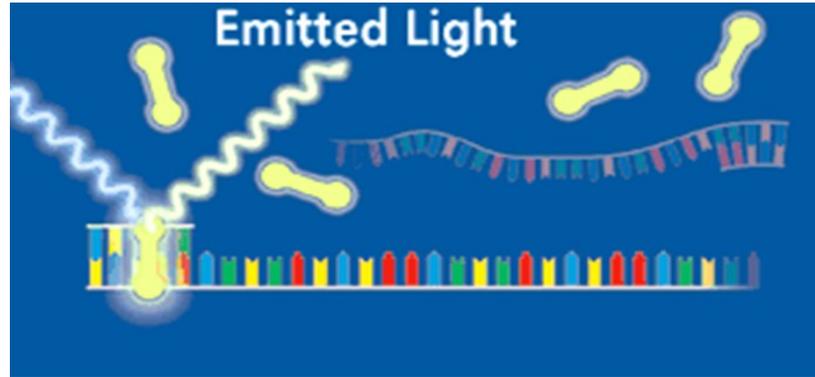
SYBR Green

Molecola fluorescente che durante la reazione di PCR Real time si intercala all'interno del doppio filamento di DNA originatosi ad ogni ciclo di amplificazione

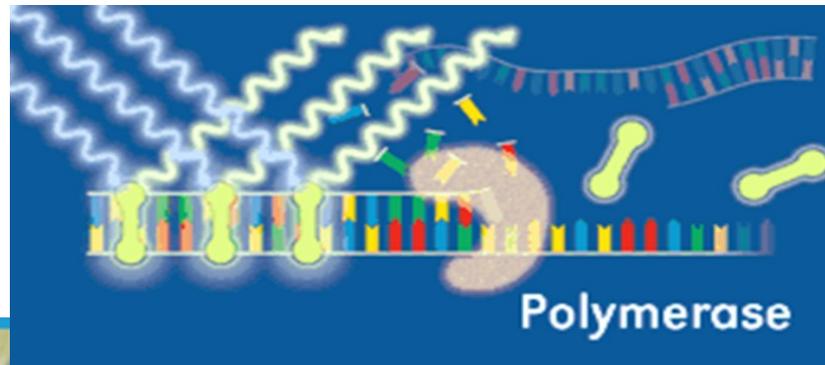
- All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente



- Dopo l'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica



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



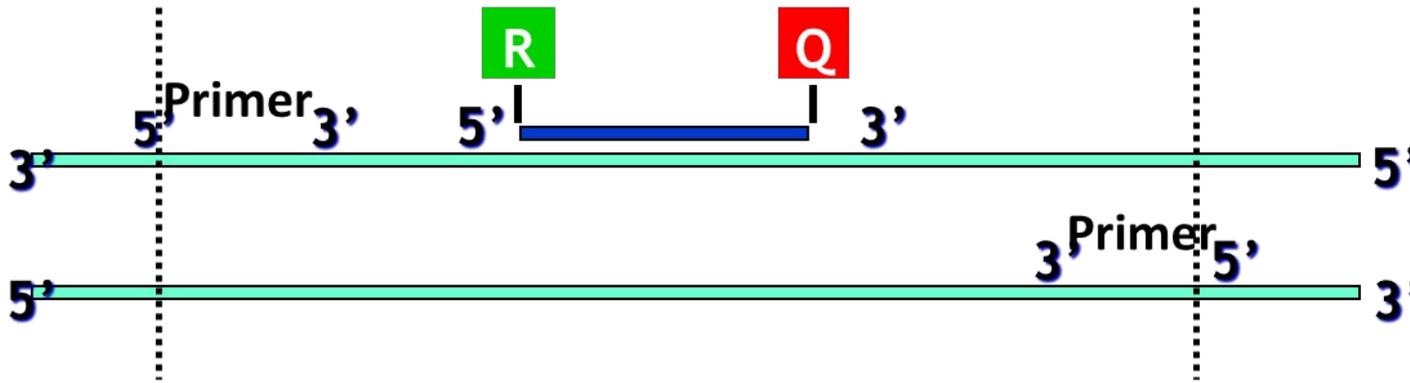
SYBR Green

- **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



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

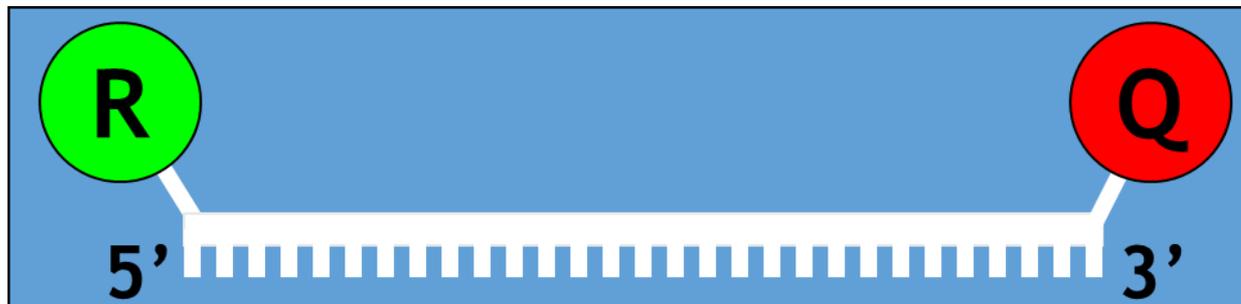
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



TaqMan

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

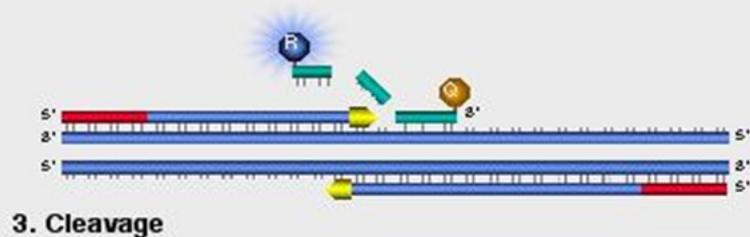
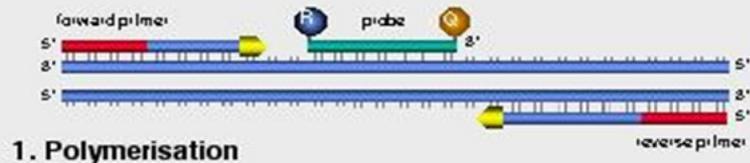
3' QUENCHER (Q): fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter;



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



Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan[®] chemistry)



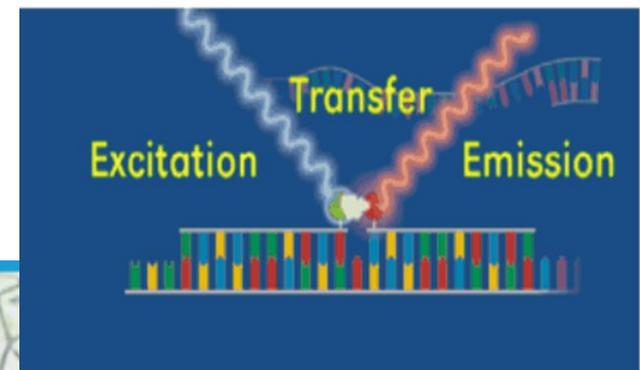
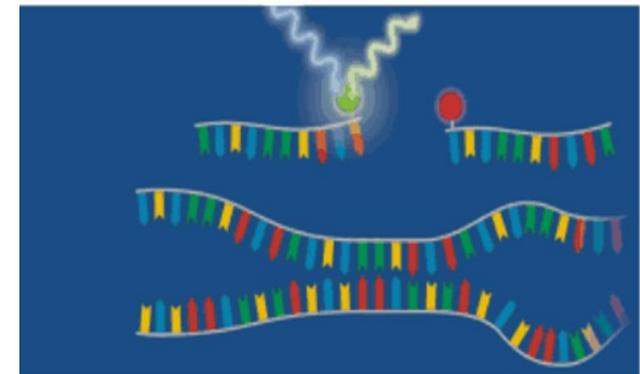
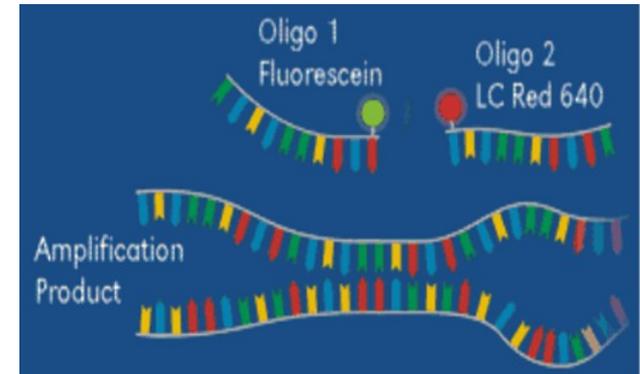
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer)

- Simili alle sonde TaqMan perché si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate, ci sono però due sonde ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore)
- Quando le sonde non sono legate alle sequenze target il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato
- Durante lo step di annealing PCR, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato

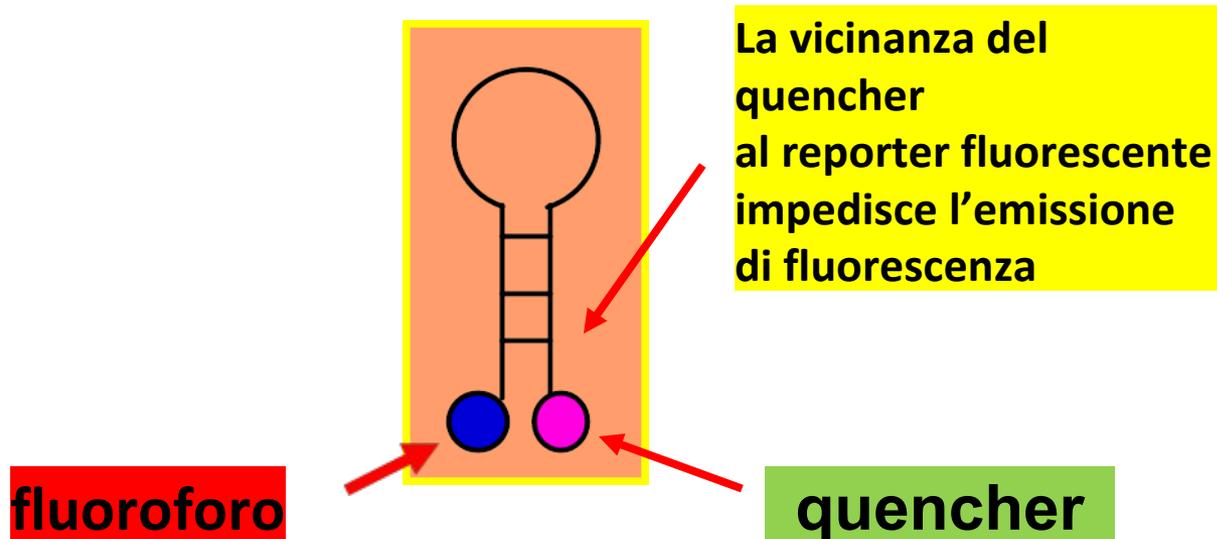


Molecular Beacons

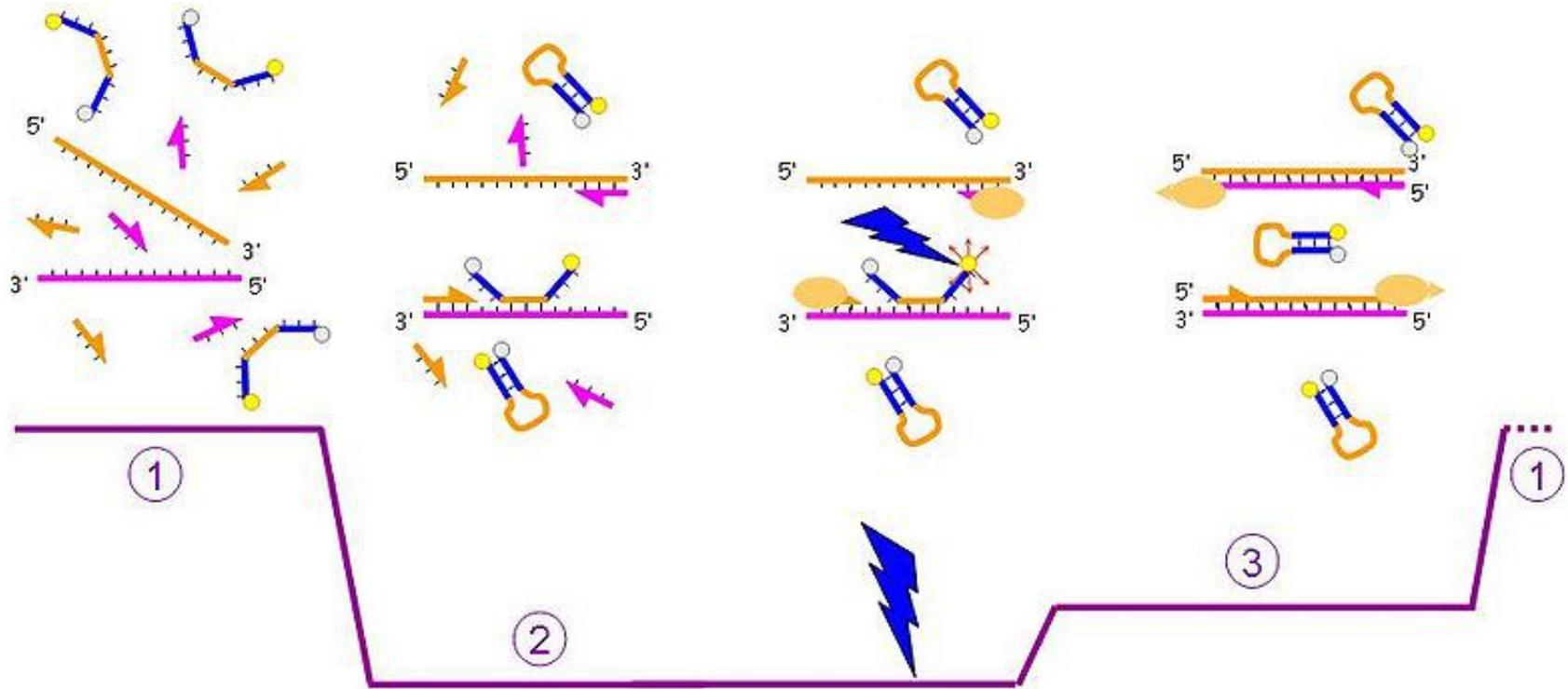
Le sonde "molecular beacons" contengono un fluoroforo e un quencher non fluorescente alle estremità opposte di un oligonucleotide

sono disegnate in modo da essere complementari tra loro formando una struttura stem-loop.

Il loop è complementare ad una sequenza all'interno del prodotto amplificato.

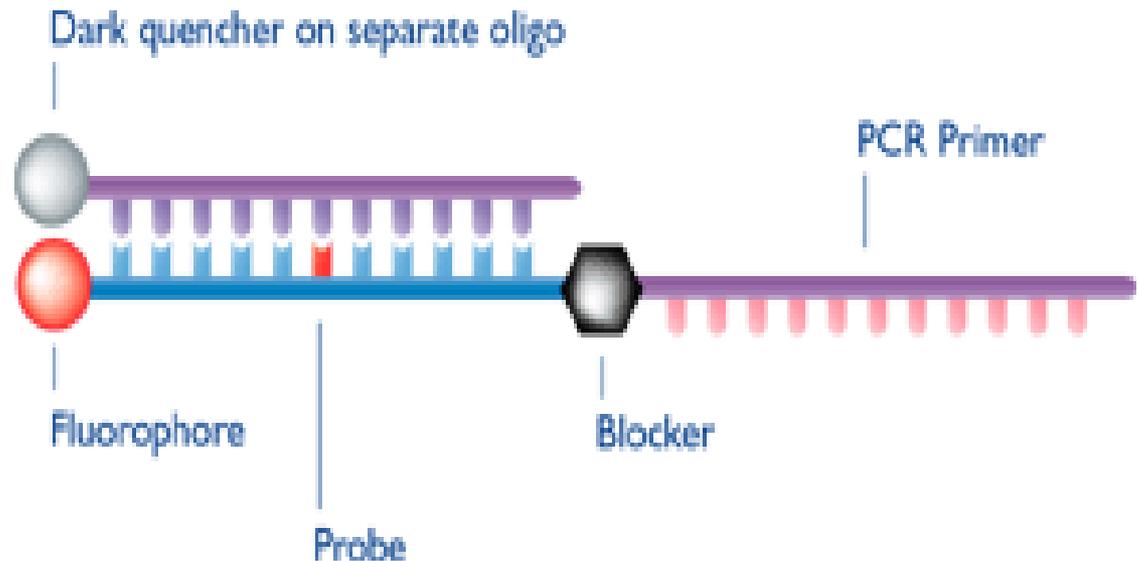


Molecular Beacons



Scorpions

- La progettazione delle scorpion probes è simile a quella delle molecular probes, con la differenza che al 3' terminale del probe vi è una sequenza, PCR primer, che è specifica per l'estensione del target
- Questa sequenza è legata al 5' terminale di un primer per mezzo di un "blocker"



Scorpions

• Step 1

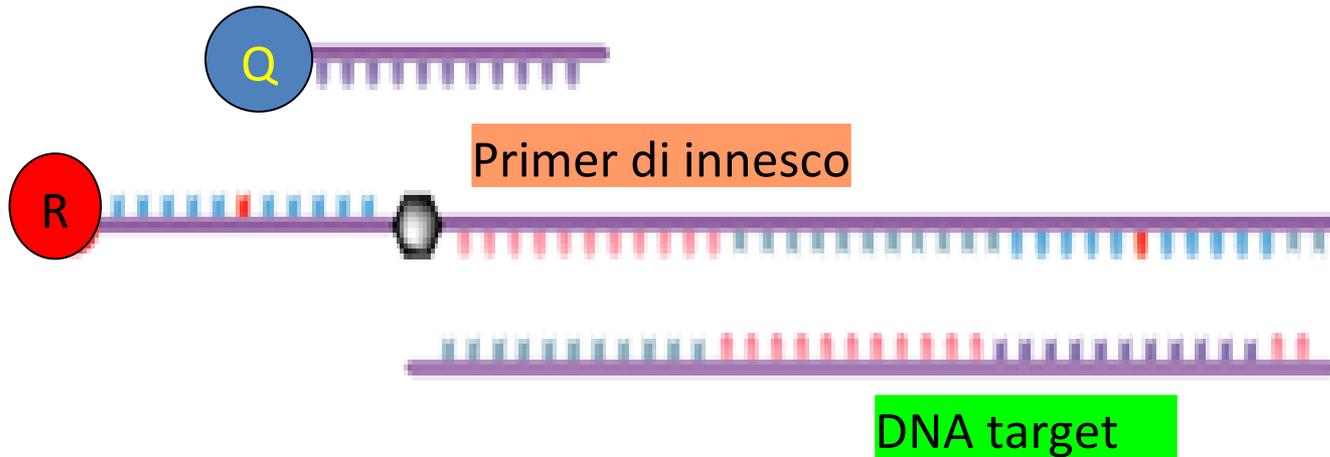
Dopo un'iniziale denaturazione lo Scorpions primer si ibridizza sulla sequenza target del filamento di DNA



Scorpions

•Step 2

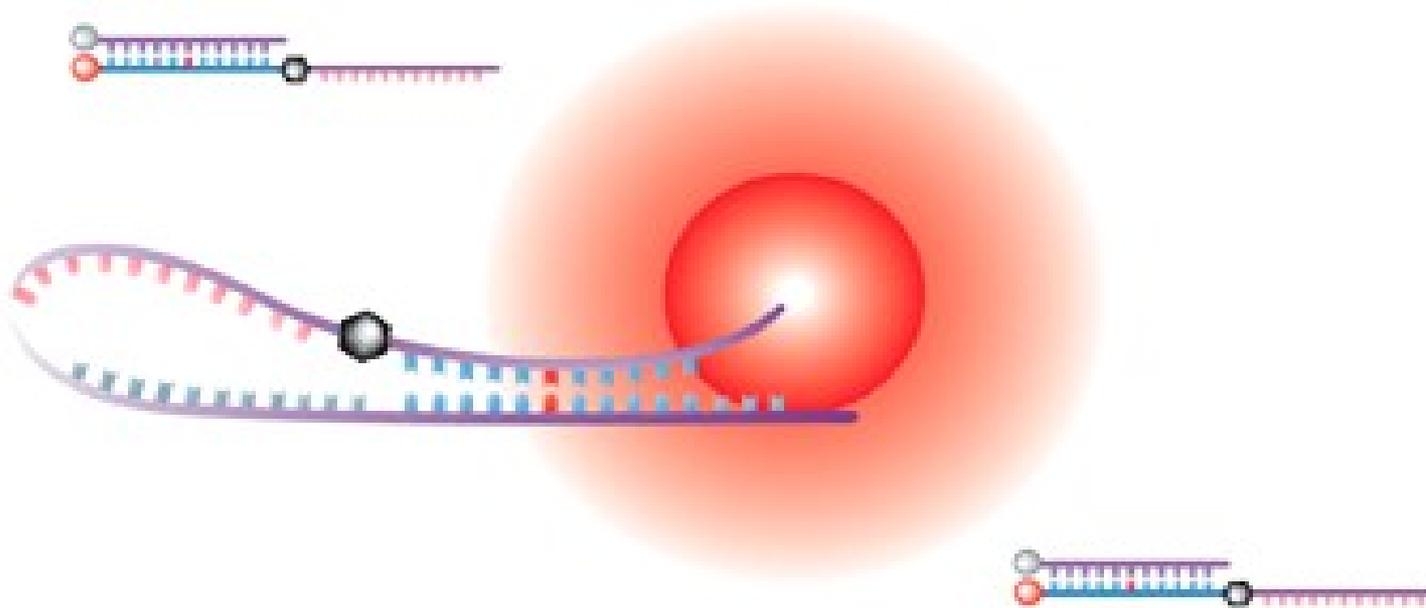
Durante il processo di denaturazione si verifica l'allontanamento del quencher dal reporter e del primer di innesco dal DNA target



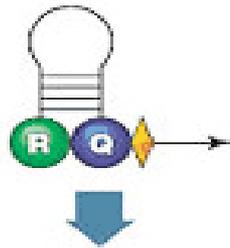
Scorpions

•Step 3

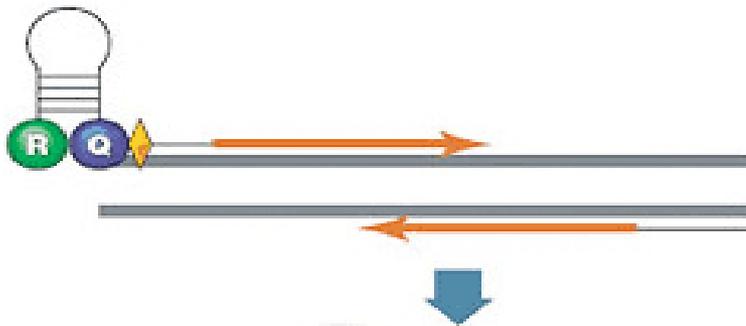
Raffredandosi lo Scorpion esteso subisce un riarrangiamento interno ed emette fluorescenza in maniera target specifica. Un primer non esteso viene quenziato



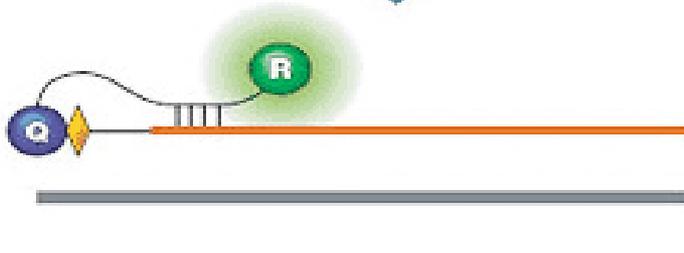
Scorpions



The Scorpions primer acts as a probe.
The intact primer forms a hairpin so that the quenched reporter does not fluoresce



During annealing, the hairpin primer binds to the template, and is then extended



During subsequent denaturation, the reporter separates from the quencher, and the loop sequence binds to the internal target sequence. The reporter on the extended Scorpions primer fluoresces

-  Reporter
-  Quencher
-  PCR blocker



REAL-TIME PCR: VANTAGGI

- La misurazione del prodotto della PCR tradizionale avviene quando la reazione ha ormai raggiunto il plateau; la PCR real-time compie l'analisi durante la fase di amplificazione esponenziale.
- No-post PCR processing.
- Sensibilità elevata.
- Richiede limitate quantità di campione di partenza



REAL-TIME PCR: SVANTAGGI

- I reagenti necessari sono piuttosto costosi.
- Il processo richiede un accurato setting.
- I dati devono essere correttamente validati per avere valenza scientifica.



PCR DIGITALE

Metodica recente che permette la quantificazione altamente sensibile degli acidi nucleici senza l'utilizzo di curve standard

Principio: singole molecole del di DNA possono essere amplificate singolarmente, ognuna in una partizione separata



Campione estratto normalmente e si prepara una master mix con sonde fluorescenti TaqMan come una classica Real Time

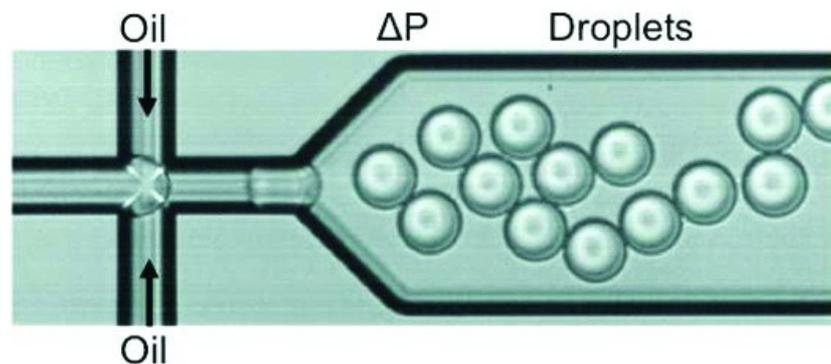


Miscela di reazione è caricata in un particolare termociclature in cui grazie all'azione di un olio la soluzione è ripartita in micro goccioline



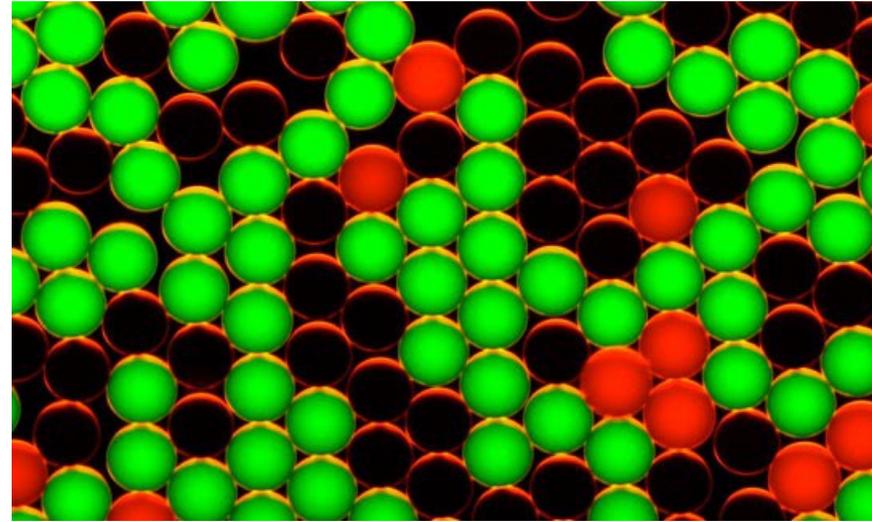
**20000
goccioline**

Sample →

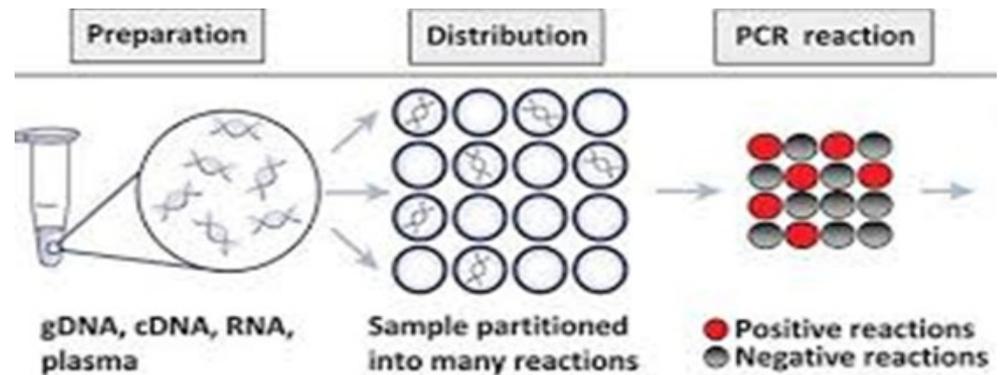


Una volta partizionato il campione all'interno di ogni gocciolina avviene un'amplificazione e quindi avremo migliaia di PCR individuali

I filamenti stampo sono distribuiti random



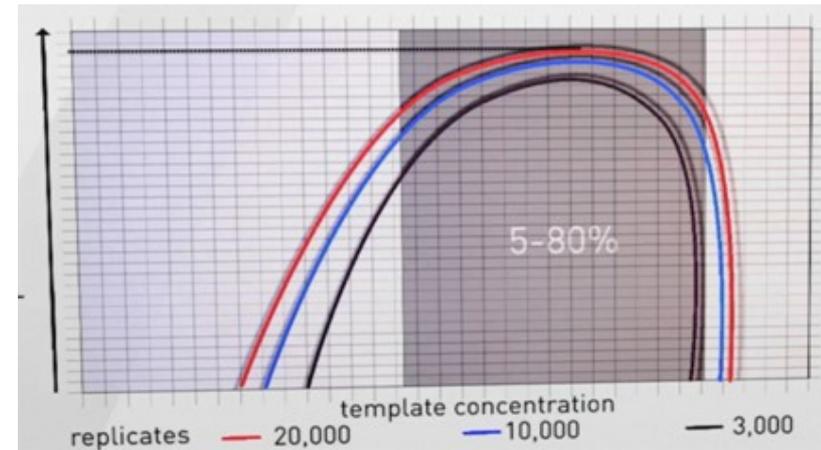
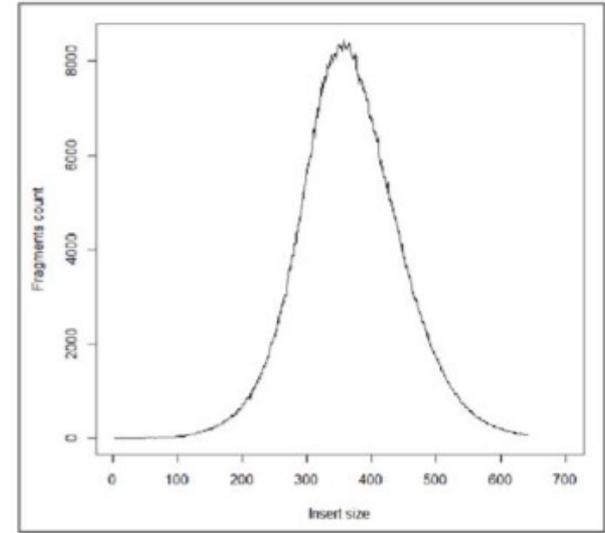
Al termine dell'amplificazione avremo particelle in cui è presente in nostro target fluorescente, altre in cui è presente in doppia copia ed altre in cui è assente



QUANTIFICAZIONE

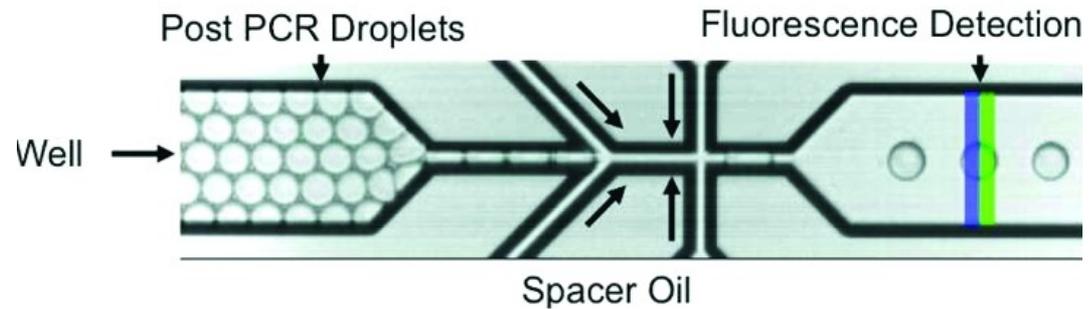
Le particelle che presentano il filamento stampo ricercato sono catalogate dallo strumento come positive e quelle senza sono catalogate negative

Il software esegue un rapporto tra positivi e negativi, non basandosi sul numero dei cicli, ma su un modello di distribuzione statistica (Poisson), risalendo al numero di molecole presenti nel campione iniziale



La lettura della fluorescenza può avvenire con 2 metodi differenti:

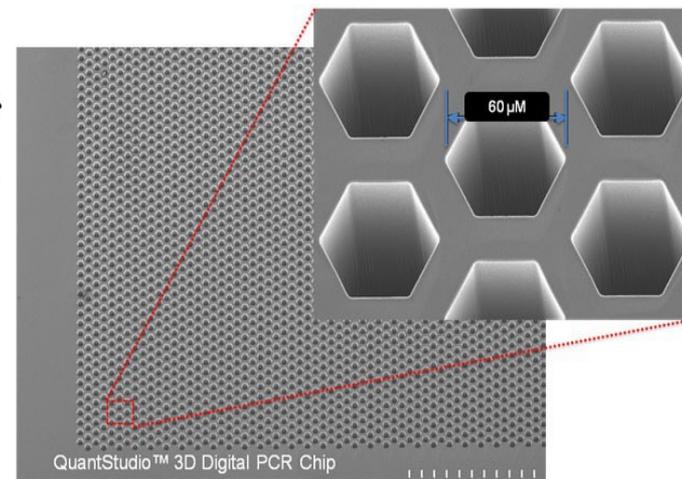
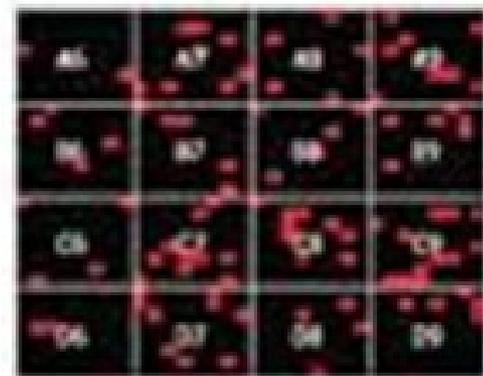
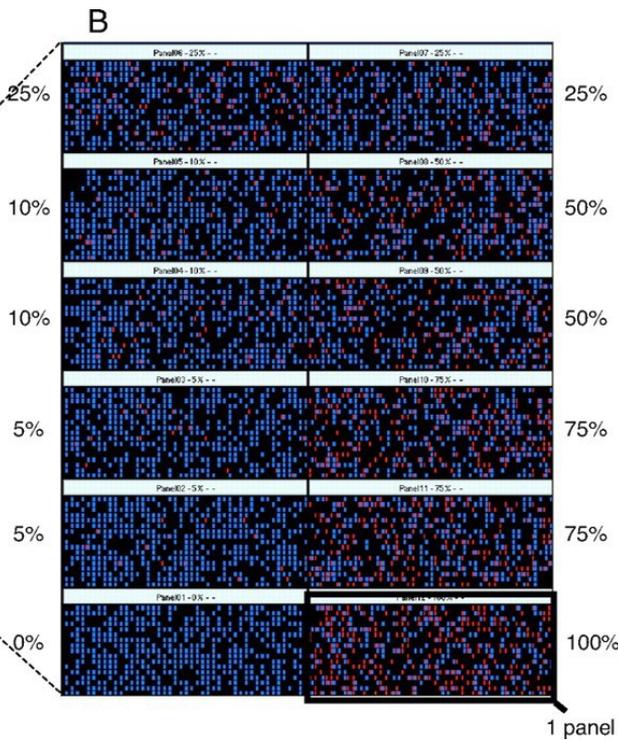
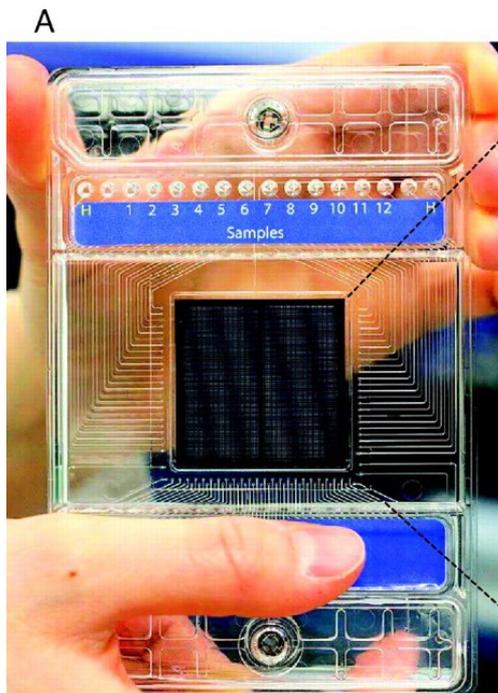
- Lettura di ogni singola partizione attraverso raggio laser



- Il campione partizzato viene distribuito su una piastra-chip contenente migliaia di pozzetti

Fluorescenza emessa letta contemporaneamente in tutti i pozzetti dallo strumento





Vantaggi:

- Elevatissima specificità;
- Elevatissima sensibilità (limite rilevamento 1 molecola / 1.000.000);
- Elevata tolleranza agli inibitori;
- Ottima resa con miscele complesse.

Svantaggi:

- Costi elevati

Campi d'utilizzo:

- Ricerca sequenza rare;
- Espressione genica;
- Mutazioni puntiformi;
- Ricerca DNA di patogeni;
- OGM;
- Supporto per Next Generation Sequencing.

