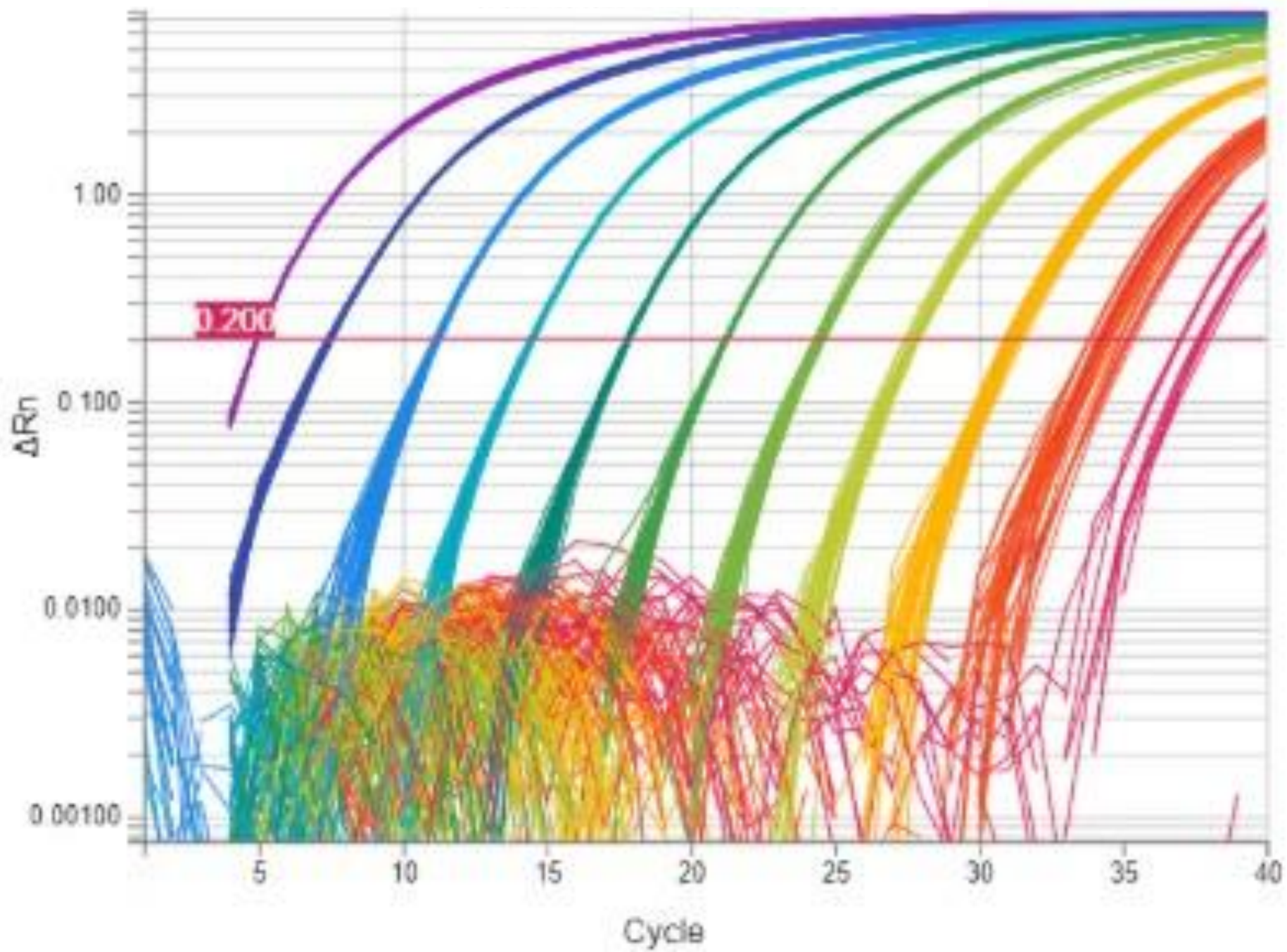


Amplificazione in Real time

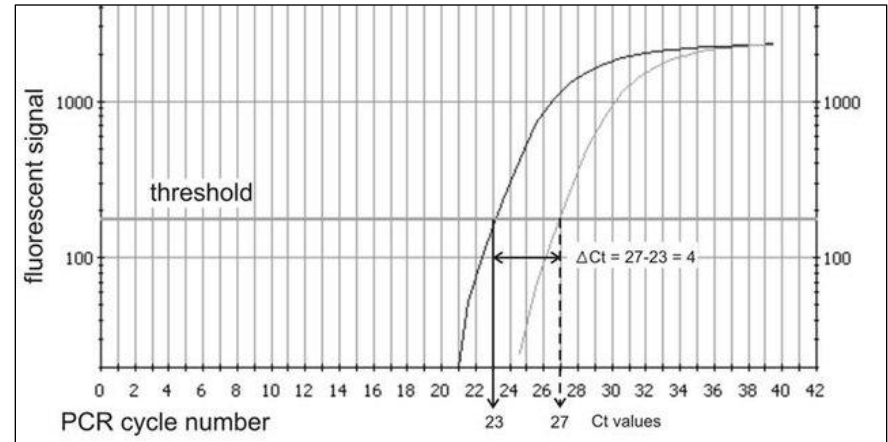


PCR semiquantitativa

Una delle cause dell'inattendibilità della RT-PCR, a livello quantitativo è la difficoltà di stimare esattamente l'intensità di segnale di prodotti di amplificazione che vanno a saturazione.

La saturazione della reazione di PCR dipende , tra l'altro, dalla:

- Inattivazione della *Taq* polimerasi
- Deplezione dei NTP
- Deplezione dei primers
- Inibizione da parte del pirofosfato
- Auto appaiamento di DNA amplificati



La PCR semiquantitativa risolve in parte questo problema. Poiché è noto che i primi cicli di amplificazione seguono un andamento ragionevolmente esponenziale, nella PCR semiquantitativa si esegue una reazione di pochi cicli, e poi si risolvono i prodotti di amplificazione su gel di agarosio e di visualizzare il risultato mediante Southern blotting e ibridazione con una sonda radioattiva.

qPCR o Real time PCR

La PCR in tempo reale è un'implementazione della PCR che permette di avere informazioni quantitative più precise sulle concentrazioni relative di DNA o cDNA amplificati (e dei corrispondenti mRNA).

La quantificazione può essere assoluta o relativa.

Nel caso della **quantificazione assoluta** si fa ricorso alla costruzione di una curva di calibrazione standard di RNA a concentrazione nota, da cui si può estrapolare la concentrazione ignota e quindi il numero di copie iniziali del nostro campione.

La **quantificazione relativa** compara, con vari metodi, le concentrazioni relative di due campioni normalizzati ad un gene di riferimento.

qPCR o Real time PCR

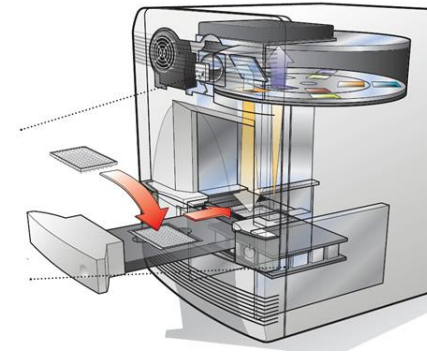
L'accuratezza della qPCR deriva dalla sua capacità di monitorare i prodotti di reazione in tempo reale, che gli permette di ottenere informazioni sulla fase logaritmica della reazione di PCR

Infatti, a differenza della PCR classica che ha bisogno di un post-trattamento, tipicamente un gel di agarosio con bromuro di etidio, per visualizzare i risultati dopo un certo numero di cicli alla fine della reazione, la PCR in tempo reale è in grado di identificare, “al suo primo apparire”, un prodotto di PCR, monitorando di continuo l'andamento della reazione, senza dover interrompere la reazione per poterla visualizzare su gel.

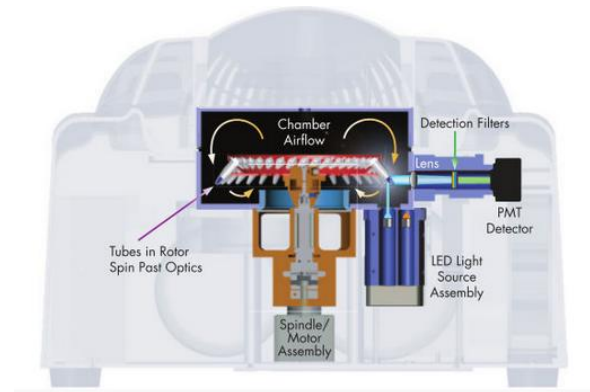
La real time PCR risolve questo problema utilizzando precursori fluorescenti, come il bromuro di etidio o **il SYBR Green**, che vengono incorporati nel prodotto in formazione o che si intercalano nella doppia elica, man mano che si forma. In ogni caso sarà possibile monitorare in tempo reale la formazione del prodotto di amplificazione seguendone l'assorbimento con un sistema spettrofotometrico, in un sistema automatizzato

qPCR/real time PCR

Lettore a piastre

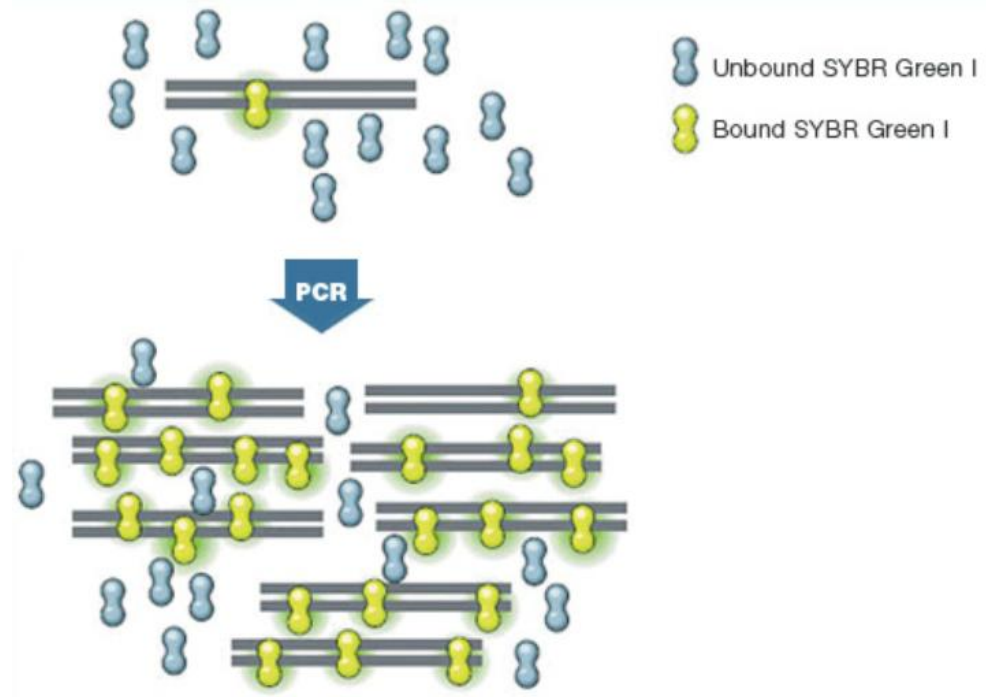
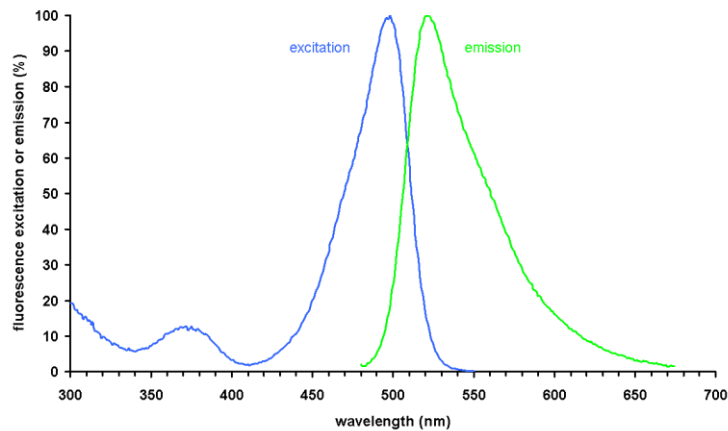
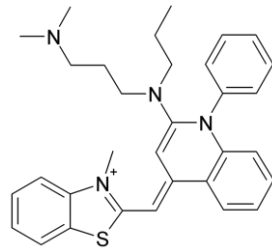


Rotor gene



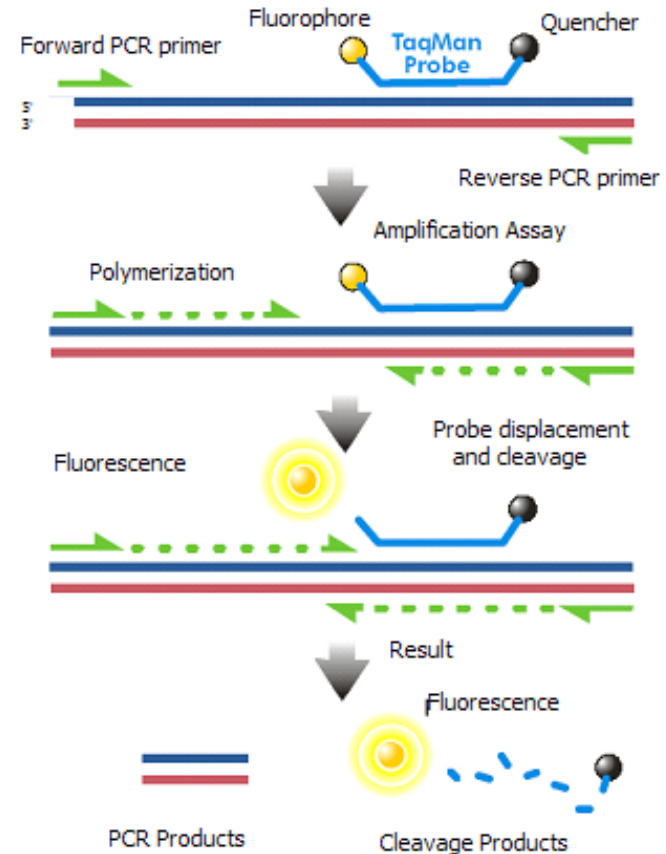
Metodi di rilevamento di un segnale da qPCR: il Sybr-green

Il Sybr-green è una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento in modo aspecifico

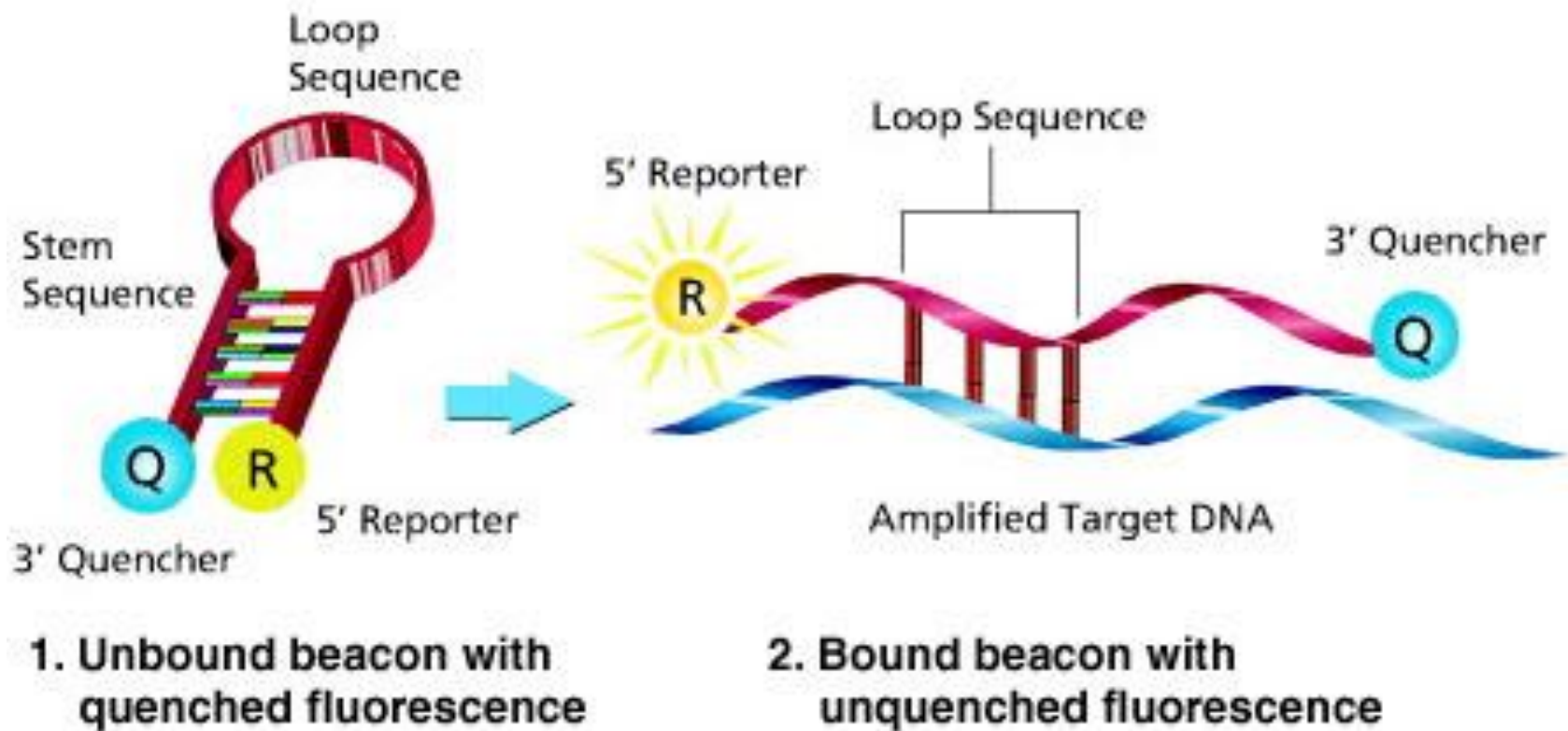


Metodi di rilevamento di un segnale da qPCR: il metodo Taq-man

TaqMan è il nome di una serie di sonde utilizzate per aumentare la specificità della qPCR. Il metodo si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide marcato con un *fluoroforo* a una estremità e un *quencher* all'altra estremità. Grazie all'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi, dopo la fase di *annealing* della PCR, l'enzima scinde il fluoroforo dal resto della molecola durante l'ibridazione. Pertanto, ad ogni ciclo, dopo irradiazione del campione viene emessa una fluorescenza in quantità proporzionale al DNA target che è così quantificabile. Quando invece il fluoroforo si trova vicino al quencher quest'ultimo ne smorza l'emissione di fluorescenza tramite trasferimento di energia per risonanza.

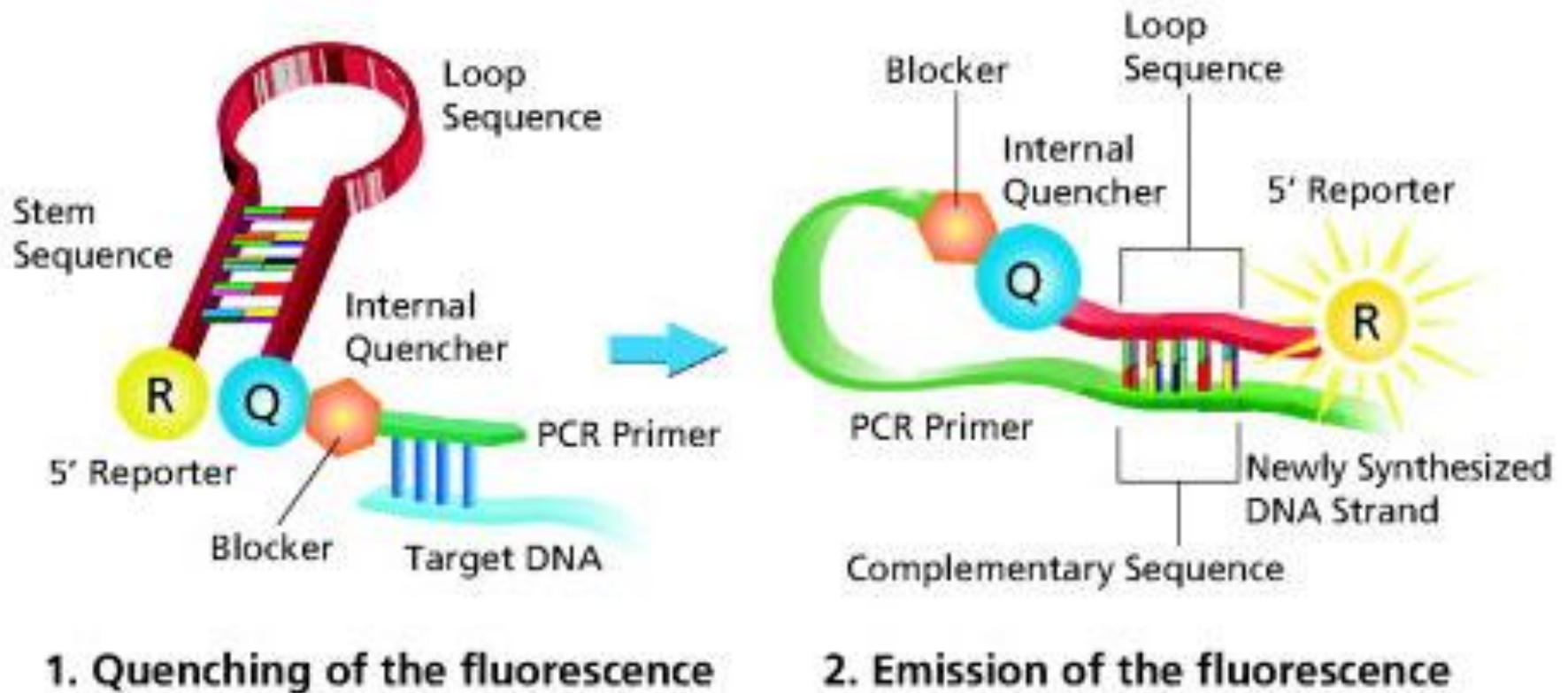


Metodi di rilevamento di un segnale da qPCR: il metodo Molecular Beacon



Le sonde Molecular Beacon sono sonde a stem-loop dove fluoroforo è spento dal quencher, ma emette fluorescenza solo quando la sonda ibrida al bersaglio

Metodi di rilevamento di un segnale da qPCR: il metodo Molecular Scorpion



Le sonde **Molecular Scorpion** integrano primer e sonda in una singola molecola bifunzionale, offrendo una cinetica di reazione più veloce e una maggiore specificità, ideale per la discriminazione allelica e la rilevazione di SNP (polimorfismi a singolo nucleotide)

Loading:

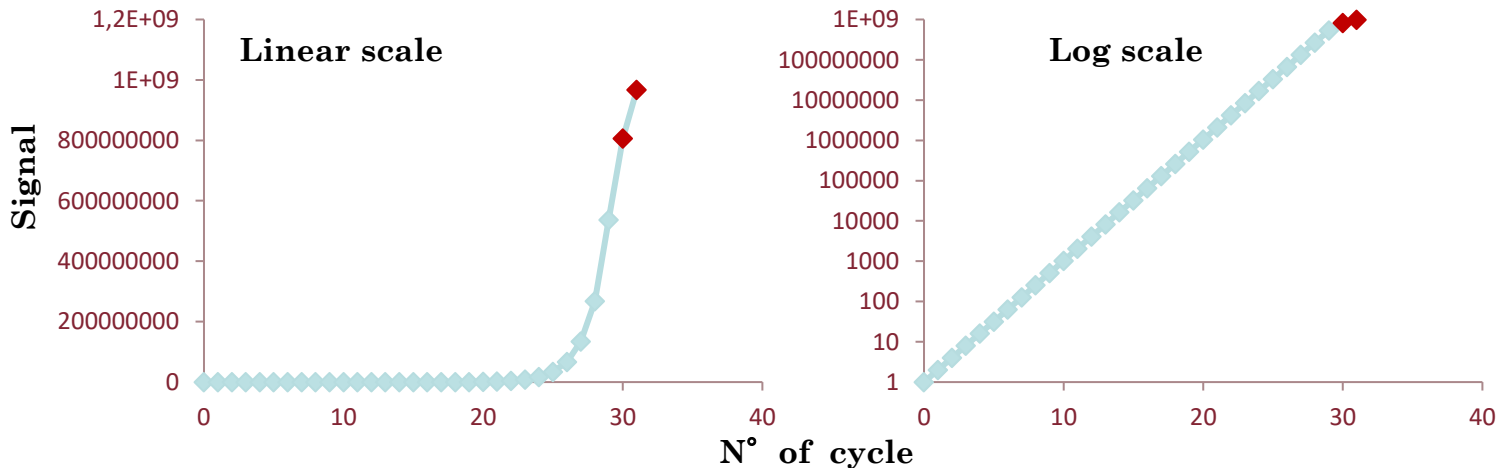
I

Significato della qPCR o RT-qPCR

Esistono due modi di visualizzare i risultati di una qRT-PCR/real time PCR su un grafico:

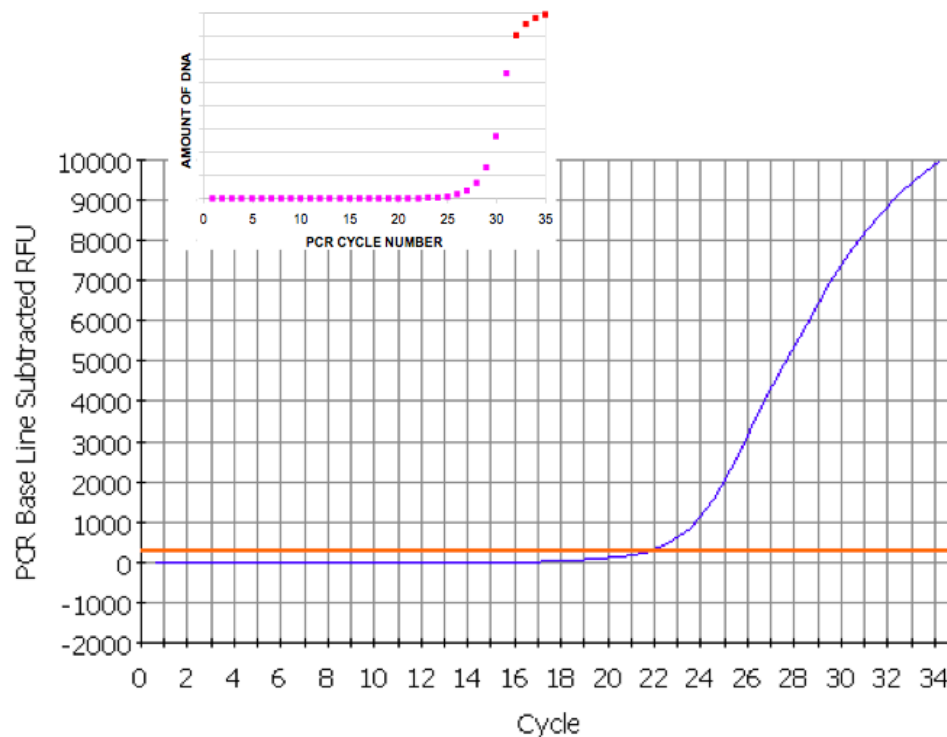
- ✓ **Scala lineare**
- ✓ **Scala Log**

Dato l'andamento esponenziale della reazione, è impossibile visualizzare dettagli dell'amplificazione durante i primi cicli su una scala lineare; si passa dunque alla visualizzazione in scala logaritmica



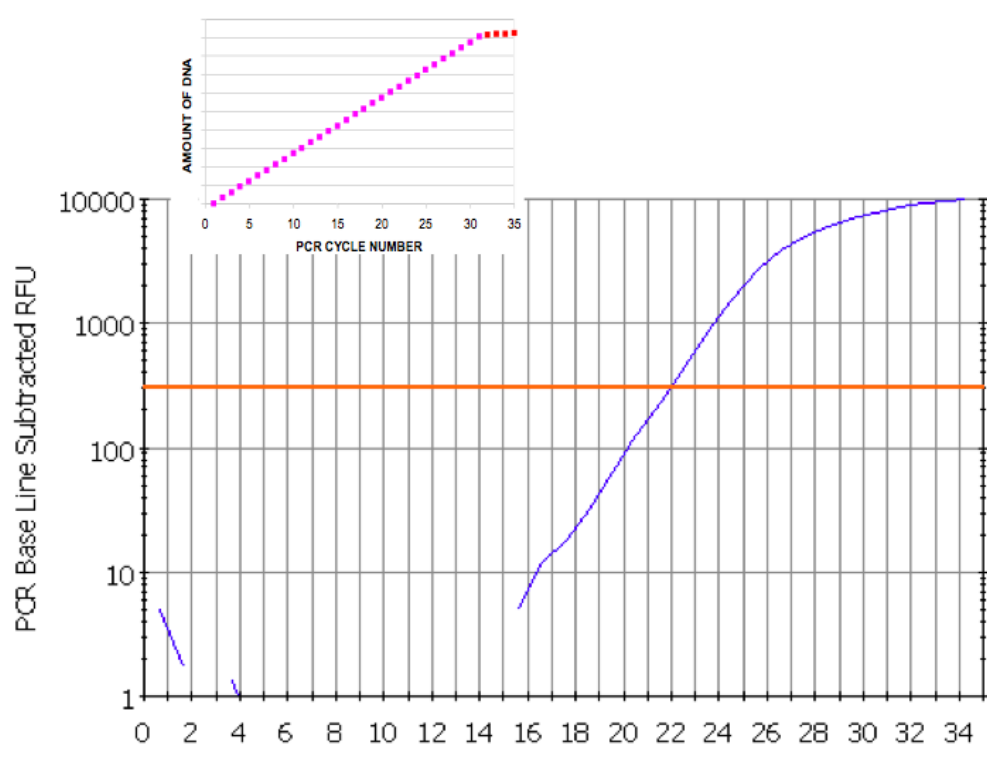
Significato della qPCR o RT-qPCR

La qPCR o la RT-qPCR invece di misurare l'accumulo dei prodotti di reazione dopo n cicli, misura i cicli necessari per raggiungere una soglia arbitraria di fluorescenza detta **Ct** (**concentration threshold**). Naturalmente il valore di Ct, in questo caso 22, dovrà cadere nella regione esponenziale della curva



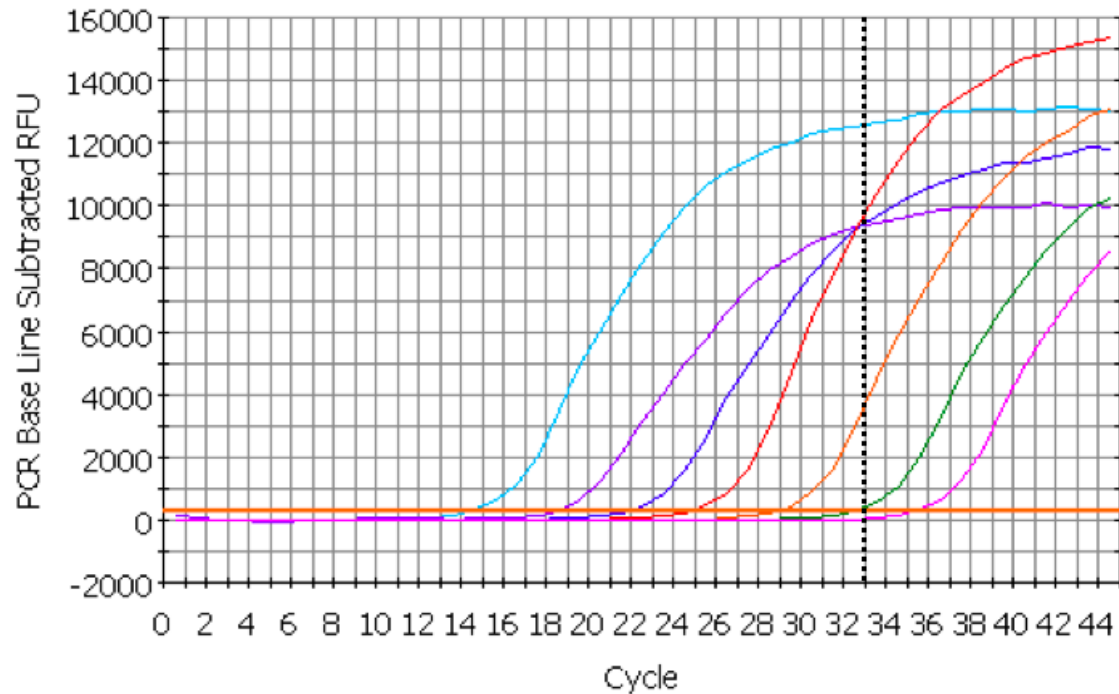
Significato della qPCR o RT-qPCR

Trasformando il grafico in scala logaritmica, appare più evidente come il valore di Ct va a cadere nella parte esponenziale della curva logaritmica, assicurando elevata accuratezza a questo tipo di analisi



Significato della qPCR o RT-qPCR

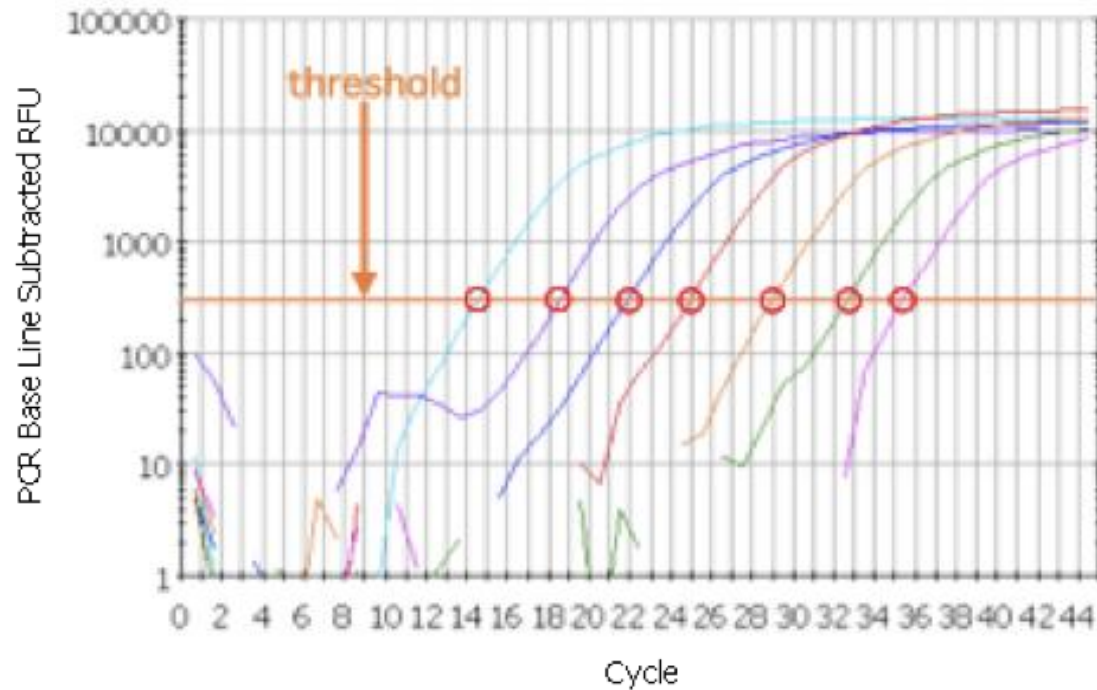
Un'importante proprietà della qPCR o dell' RT-qPCR è che i valori di Ct sono inversamente proporzionali alle concentrazioni iniziali del DNA target, come si può verificare facendo diluizioni seriali di un campione e osservando come, man mano che le diluizioni crescono, ci vogliono più cicli per raggiungere la soglia di concentrazione (Ct)



Nella figura un esempio di diluizioni seriali (10 volte)

Significato della qPCR o RT-qPCR

Passando in scala logaritmica, come al solito è più evidente la correlazione tra i Ct e le diluizioni (notare che a Ct più elevati la correlazione è perduta)



Nella figura un esempio di diluizioni seriali (10 volte)

Trattazione matematico-quantitativa della qPCR o della RT-qPCR

Per l'equazione generale della PCR avremo alla concentrazione di threshold (Ct)

$$N_f = N_i (1+\eta)^{ct}$$

Dove N_f è il numero di copie finali, N_i il numero di copie iniziali, η l'efficienza di amplificazione

Le concentrazioni di a e b al punto di threshold saranno:

$$N_{fa} = N_{ia} (1+\eta_a)^{cta}$$

$$N_{fb} = N_{ib} (1+\eta_b)^{ctb}$$

e poichè, per definizione, $N_{fa} = N_{fb}$ abbiamo: $N_{ia} (1+\eta_a)^{cta} = N_{ib} (1+\eta_b)^{ctb}$

$$\frac{N_{ia}}{N_{ib}} = \frac{(1+\eta_b)^{ctb}}{(1+\eta_a)^{cta}} \quad \text{equivalente a:} \quad \text{Log } N_{ia} - \text{Log } N_{ib} = \text{Log } (1+\eta_b)^{ctb} - \text{Log } (1+\eta_a)^{cta}$$

Assumendo $\eta_a = \eta_b$; $1+\eta = E$ avremo:

$$\text{Log } N_{ia} - \text{Log } N_{ib} = \text{Log } (E)^{(ctb - cta)}$$

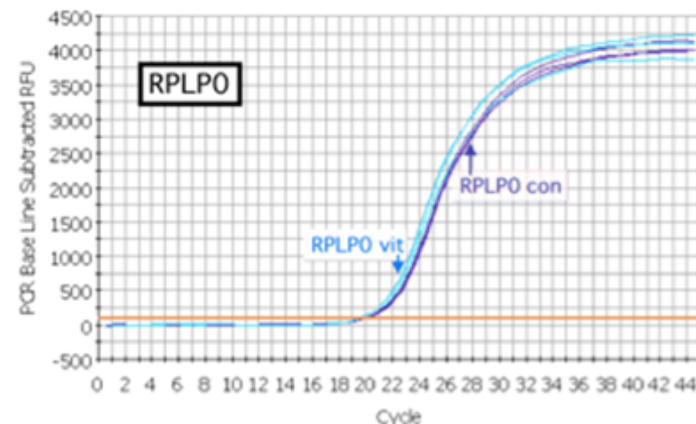
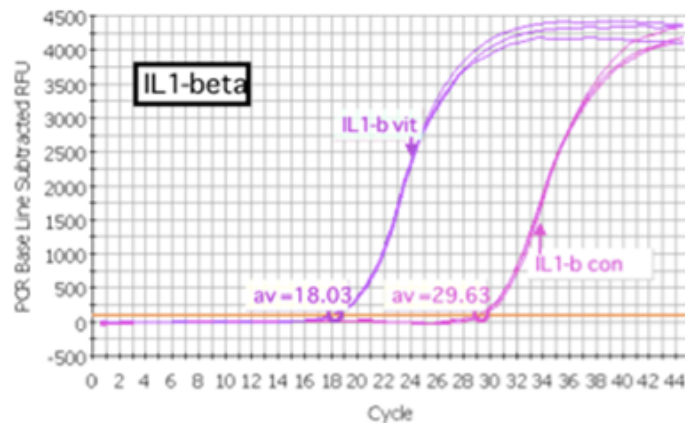
$$ct_b - ct_a = \Delta ct$$

Trattazione matematico-quantitativa della RT-qPCR

Se vogliamo conoscere per esempio, la variazione di espressione del gene interleuchina β in seguito a un certo trattamento, ci calcoliamo la Δct del campione in esame;

$ct_2 - ct_1 = 29.63 - 18.03 = 11.60$. Senza considerare l'efficienza di amplificazione il trattamento ha indotto il nostro gene:

$$\Delta ct = 2^{ct_2 - ct_1} = 2^{29.63 - 18.03} = 2^{11.60} = 3104 \text{ volte}$$



Dobbiamo però considerare l'espressione del gene housekeeping di controllo per correggere $ct_2 - ct_1 = 19.93 - 19.80 = 0.13$

Il $\Delta \Delta ct$ è quindi uguale a: $\Delta \Delta ct = 2^{\Delta ct_{target} - \Delta ct_{controllo}} = 2^{11.60 - 0.13} = 2^{11.47} = 2836 \text{ volte}$