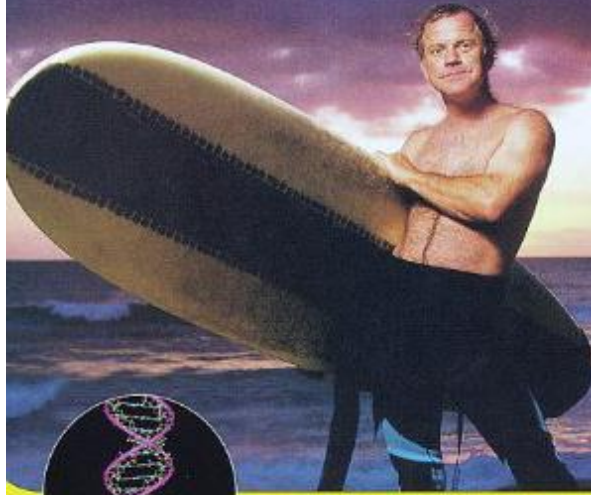




*La PCR e le sue applicazioni*

*La PCR di base  
L' RT-PCR*

# Dancing Naked in the Mind Field



WINNER OF THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY  
**KARY MULLIS**

\*Kary Mullis, perhaps the weirdest human ever to win the Nobel Prize in Chemistry, [has written] a chatty, rambling, funny, iconoclastic tour through the wonderland

Sometimes in the morning,  
when it's a good surf,  
I go out there, and I don't  
feel like it's a bad world.



Kary Mullis

## Polymerase Chain Reaction e sue applicazioni

La polymerase chain reaction o PCR è una tecnica relativamente recente che ha rivoluzionato la Biologia molecolare. Ideata da Kary Mullis intorno ai primi anni '80, è stata perfezionata e automatizzata al punto da sostituire molte tecniche di clonaggio tradizionali.

Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.

# PCR Base

La tecnica della PCR si basa sull'amplificazione di specifici frammenti compresi tra le estremità 5' di due primers definiti dallo sperimentatore, attraverso la **ripetizione di n cicli**, ciascuno dei quali include **uno step di denaturazione, uno di appaiamento ed uno di estensione**.

Caratteristiche di questa tecnica sono:  
**sensibilità, specificità e versatilità.**

**L'amplificazione della sequenza bersaglio è pari a circa  $2^{n-2}$ . In pratica dopo 30 cicli di PCR la nostra sequenza bersaglio si sarà amplificata circa  $2^{28}$  volte, producendo più di 250 milioni di molecole.**

## **Sensibilità Specificità Versatilità**

L' amplificazione esponenziale delle sequenze bersaglio conferisce alla PCR un' altissima **sensibilità** anche **a partire da preparazioni non purificate**

La scelta di primers (for & rev) altamente selettivi e di condizioni stringenti garantiscono **specificità**

L'elevata efficienza della Taq pol e l'ottimizzazione di protocolli/macchinari garantiscono un'elevata **versatilità** a questa tecnica

**Attualmente è possibile amplificare un gene unico da una cellula!**

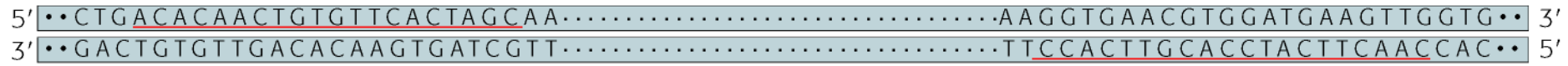
E' noto che nelle applicazioni forensi mediante PCR si riesce ad amplificare sequenze di DNA provenienti da reperti legali come capelli o tracce di sangue secco. Ancora più sorprendente è stata l' amplificazione di DNA da mummie egizie e, addirittura, quella di una pianta preistorica, a partire da un reperto fossile risalente al Miocene, 18 milioni di anni fa!

## **Elementi Necessari alla Reazione**

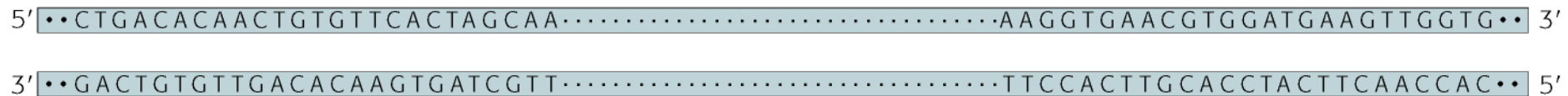
- 1. Due oligonucleotidi complementari a due regioni situate sui due filamenti opposti del DNA stampo ai lati della regione che si vuole amplificare**
- 2. DNA stampo contenente la regione da amplificare**
- 3. DNA Polimerasi termostabile**
- 4. I 4 deossiribonucleosidi trifosfati**

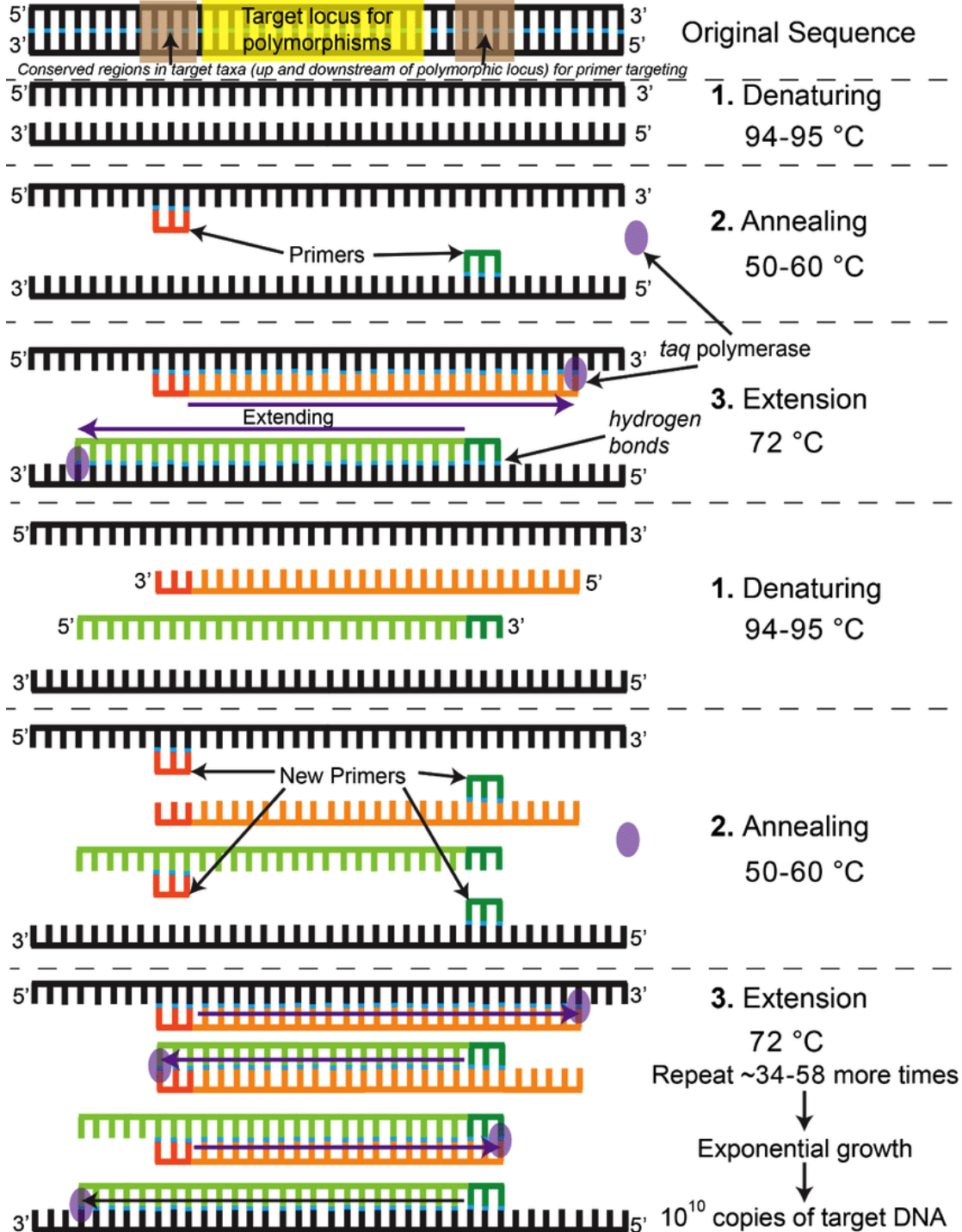
# Primer per la DNA polimerasi

(a)



(b)





Il risultato finale,  
per  $n$  cicli e  $X$   
molecole stampo  
iniziali, è pari a  
 $X^{n-2}$

## Denaturing stage

During this stage the cocktail containing the template DNA and all the other core ingredients is heated to 94-95°C.

The high temperature causes the **hydrogen bonds between the bases in two strands of template DNA to break and the two strands to separate.**

This results in two single strands of DNA, which will act as templates for the production of the new strands of DNA.

It is important that the temperature is maintained at this stage for long enough to ensure that the DNA strands have separated completely.

This usually takes between 15-30 seconds, **depending on.....???????**



## Annealing stage

During this stage the reaction is cooled to 50-65°C. This enables the primers to attach to a specific location on the single-stranded template DNA by way of hydrogen bonding (the exact temperature depends on the melting temperature of the primers you are using).

Primers are single strands of DNA or RNA sequence that are **around 20 to 30 bases in length**.

The primers are designed to be **complementary** in sequence to short sections of DNA on each end of the sequence to be copied.

Primers serve as the starting point for DNA synthesis. The polymerase enzyme can only add DNA bases to a double strand of DNA. Only once the primer has bound can the polymerase enzyme attach and start making the new complementary strand of DNA from the loose DNA bases.

The two separated strands of DNA are complementary and run in opposite directions (from the 5' end to the 3' end); as a result, there are two primers – a forward primer and a reverse primer.

**This step usually takes about 10-30 seconds.**

## Extending stage

During this final step, the heat is increased to 72°C to enable the new DNA to be made by a special Taq DNA polymerase enzyme which adds DNA bases.

Taq DNA polymerase is an enzyme taken from the heat-loving bacteria *Thermus aquaticus*, which normally lives in hot springs so can tolerate temperatures above 80°C.

The bacteria's DNA polymerase is very stable at high temperatures, which means it can withstand the temperatures needed to break the strands of DNA apart in the denaturing stage of PCR.

DNA polymerase from most other organisms would not be able to withstand these high temperatures, for example, human polymerase works ideally at 37°C (body temperature).

72°C is the optimum temperature for the Taq polymerase to build the complementary strand. It attaches to the primer and then adds DNA bases to the single strand in the 5' to 3' direction.

**The duration of this step depends on the length of DNA sequence being amplified but usually takes around one minute to copy 1,000 DNA bases (1Kb).**

# La Taq polimerasi

Le prime PCR, effettuate utilizzando la polimerasi Klenow, erano molto inefficienti perché, essendo termolabili, dovevano essere aggiunte ad ogni ciclo di amplificazione.....

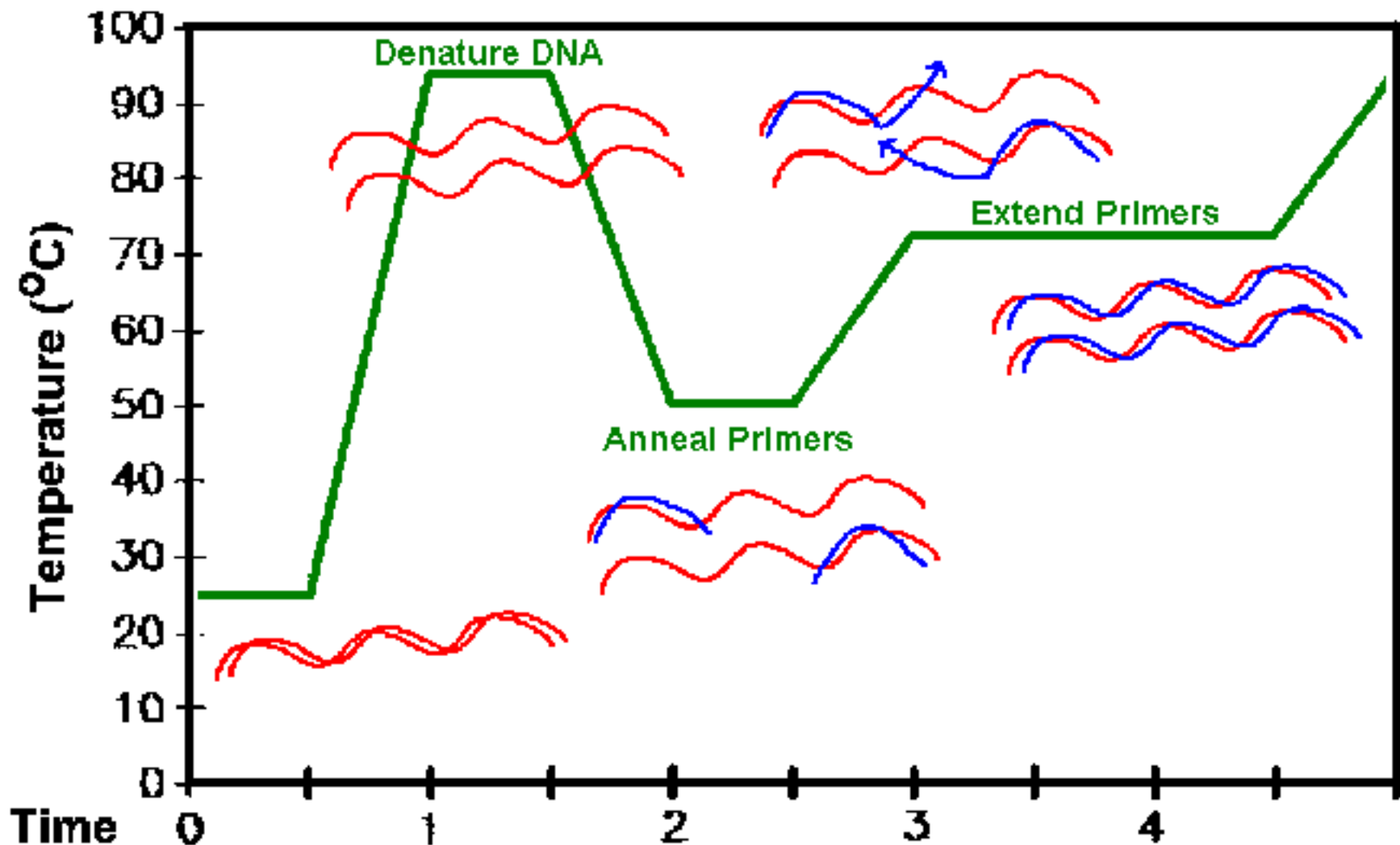
Un **significativo miglioramento (!!!)** della tecnica si deve all'uso di DNA pol termostabile isolata da *Thermus aquaticus*, batterio isolato nelle pozze termali. Questa polimerasi ha un optimum a 72° C e resiste alle alte temperature usate negli step di denaturazione permettendo l'automatizzazione dell'intera procedura, oltreché un deciso miglioramento della specificità della reazione. Esistono oggi numerose varianti della Taq polimerasi, come le polimerasi isolate da *Thermus flavus* (**Tfl polimerasi**), *Thermus thermophilus* (**Tth polimerasi**) e molte altre.

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** (solo le proofreading).



**N.B.**  
**Il processo di PCR NON**  
**puo' esser fatto manualmente con la Klenow**

# Polymerase chain reaction (PCR)

## PCR troubleshootings

La Taq pol è **priva di attività proofreading** ed incorpora, in media, una base sbagliata ogni 10000 sintetizzate ( $1.1 \times 10^{-4}$ ). Questa caratteristica non è rilevante nelle tecniche analitiche ma è un problema nei clonaggi.

Taq pol con attività proofreading ha tassi di errore più bassi, fino a  **$1,6 \times 10^{-6}$** .

**Polimerasi “hot start”** basate su forme inattive della polimerasi, che vengono attivate dalle alte temperature.

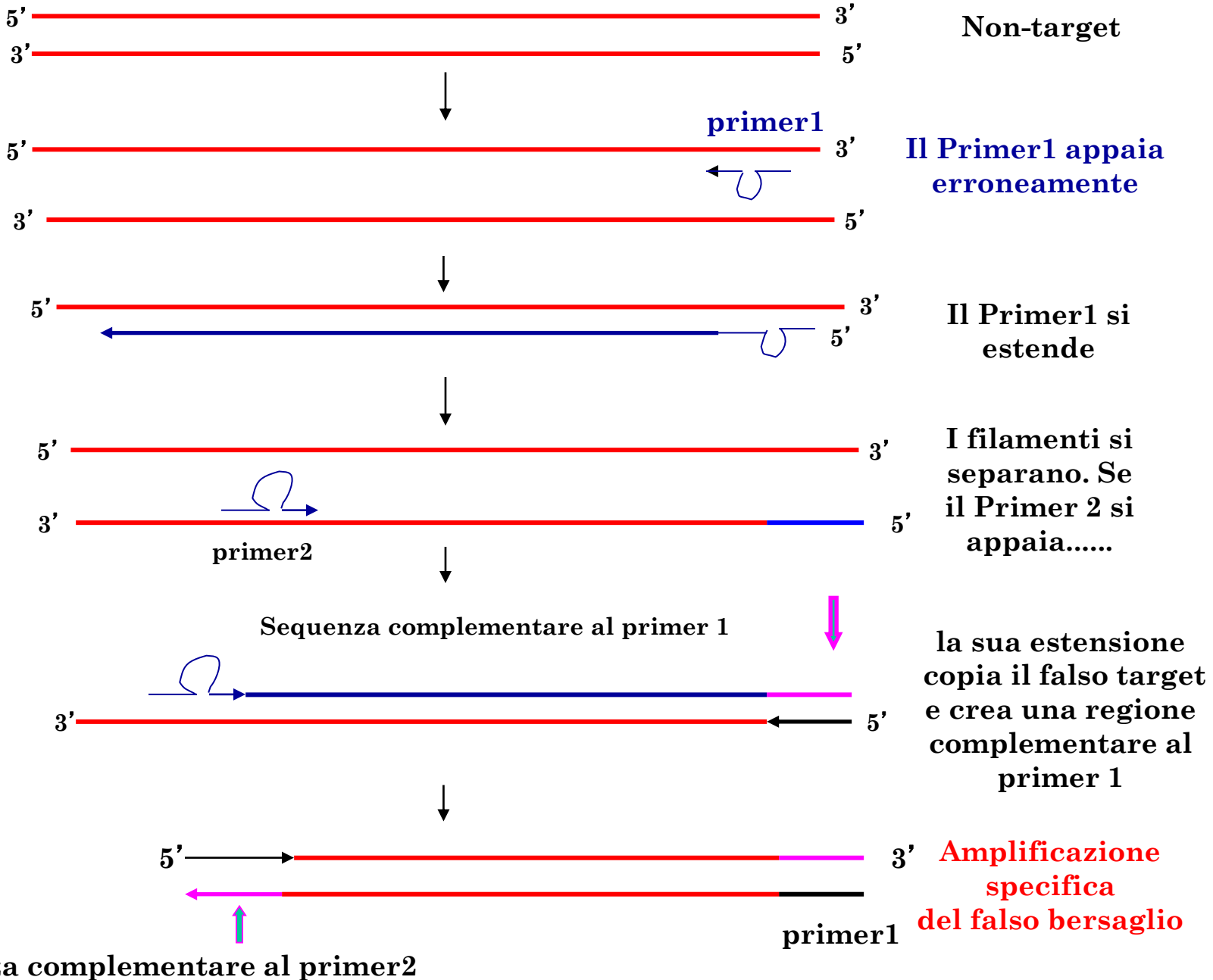
- Polimerasi inattive perchè inglobate in palline di cera, che all'innalzarsi della temperatura fondono, liberando ed attivando l'enzima.
- Complesso polimerasi/anticorpo anti-polimerasi che viene disattivato ad alte temperatura liberando l'attività enzimatica.
- AmpliTaq Gold™, una polimerasi modificata chimicamente che rimane inattiva fino a quando la temperatura non viene portata a 95° C per 5'.

- **Contaminazioni**

L'estrema sensibilità della PCR le permette di amplificare piccolissime quantità di DNA che possono contaminare le provette, i puntali, le soluzioni e gli enzimi con cui si effettuano queste reazioni. Persino l'ambiente del laboratorio può essere una sorgente di contaminazioni sotto forma di micro-particelle pulviscolari o di aerosol.

- **Riconoscimento errato** da parte dei primers di sequenze simili ma non identiche al gene target.

Questo rischio è particolarmente alto nei **genomi complessi** e/o a **temperature poco stringenti**, in cui i primers possono appaiare in regioni non omologhe. Se entrambi i primers appaiano su uno pseudo-target, questo può essere selettivamente amplificato.

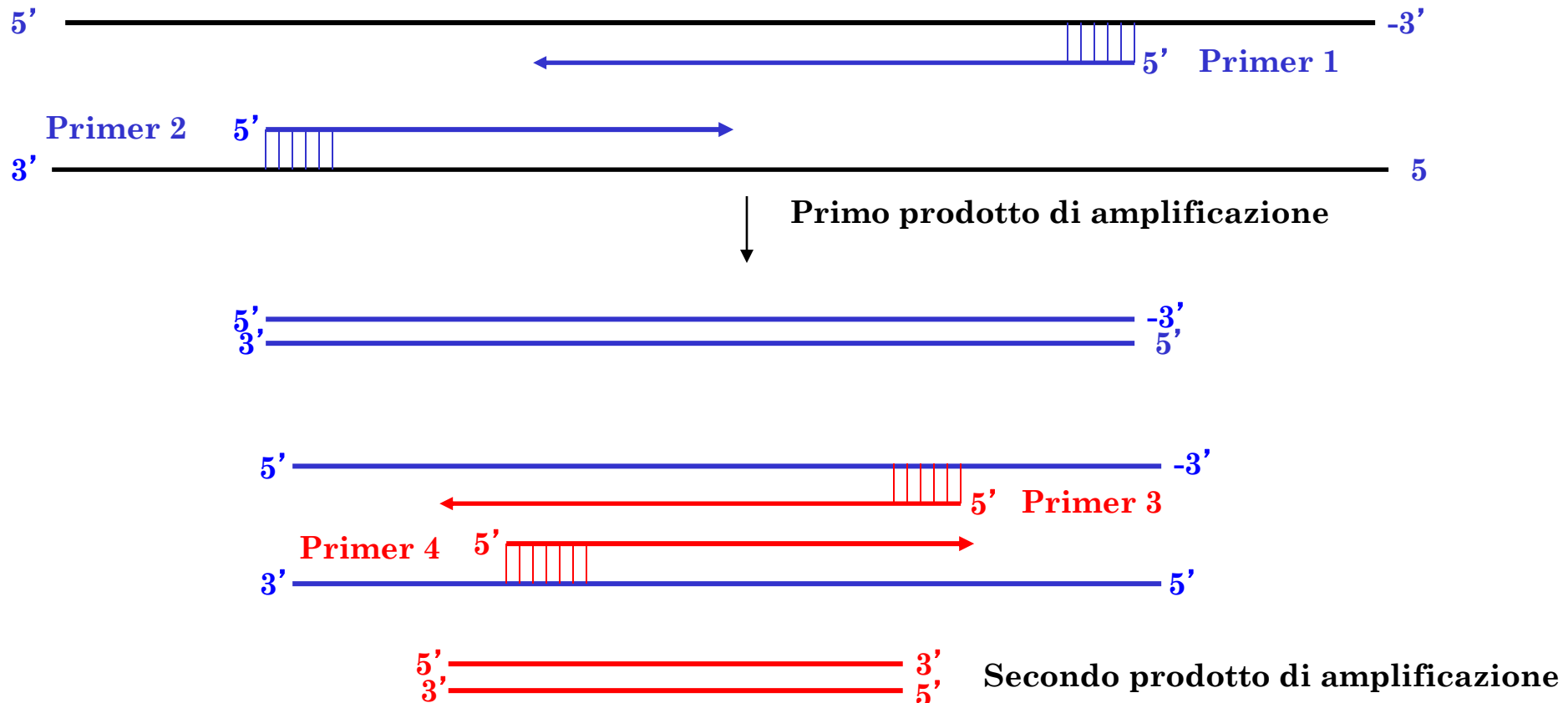


Sequenza complementare al primer2



# Nested PCR

La nested PCR è una variante della tecnica di PCR in cui il DNA stampo è rappresentato dal prodotto amplificato, con una coppia di primers complementari a due regioni interne all'amplicone. Se il prodotto di amplificazione è aspecifico la nested PCR verrà negativa.



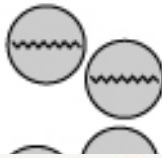
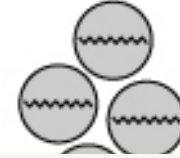
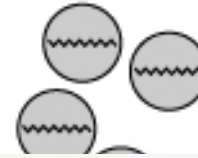
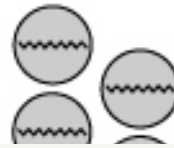
# Multiplex PCR

Strain A

Strain B

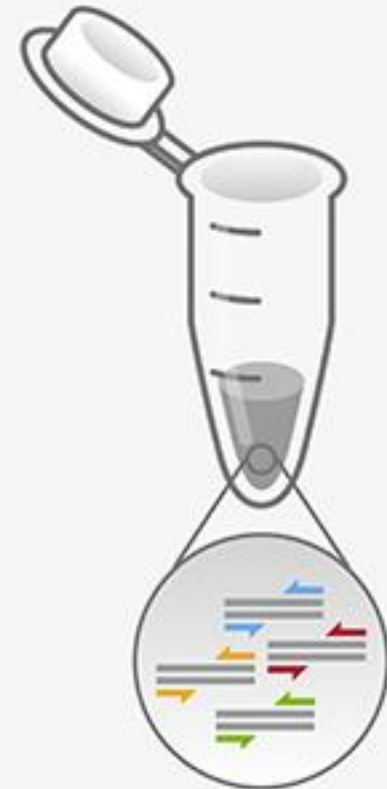
Strain C

Strain D



Singleplex reactions

Multiplex reaction



275	—	—	275
232	—	—	202
181	—	—	141
109	—	—	

# Clonaggio di prodotti di PCR

La PCR è utilizzata anche per clonare geni.

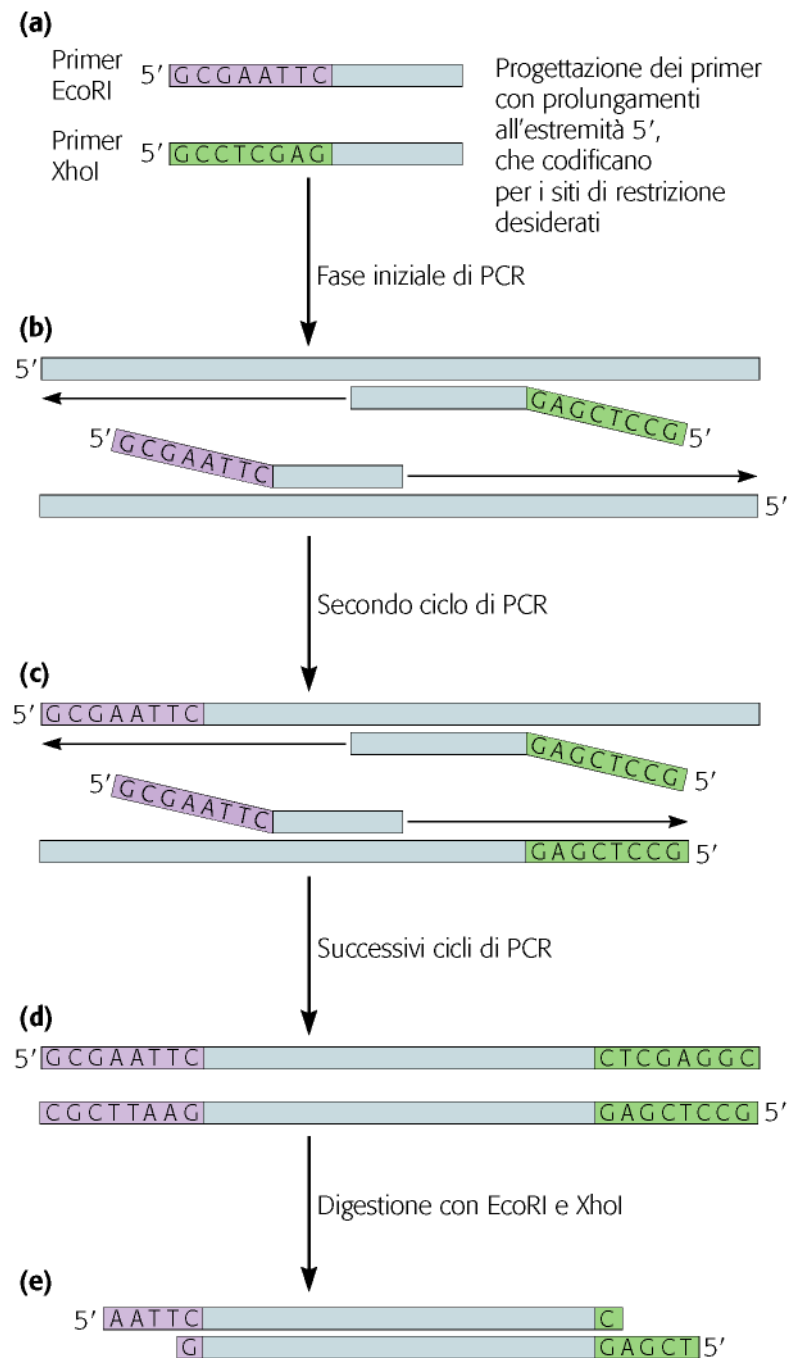
Quando si usano polimerasi con attività proofreading, i prodotti di amplificazione prodotti avranno estremità piatte e potranno essere normalmente clonati.

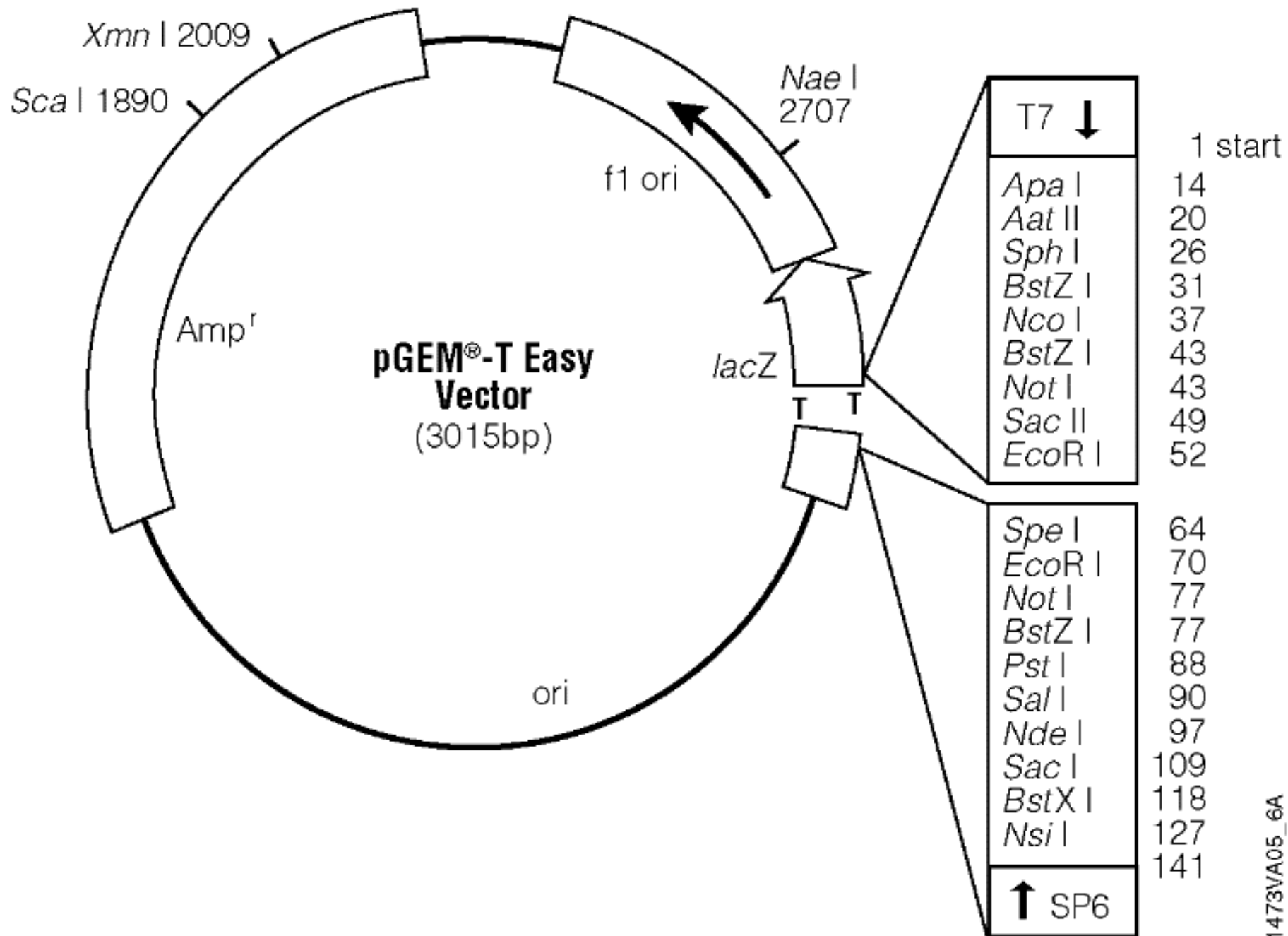
Quando invece si usano polimerasi non proofreading come la Taq polimerasi, i prodotti di amplificazione prodotti, a causa della modesta attività di tipo terminal transferasica propria delle polimerasi termostabili di questo tipo, avranno incorporato un singolo residuo di adenosina sporgente all'estremità 3' e non potranno essere clonate.

Per aggirare l'ostacolo sono possibili diverse strategie:

- Incorporare siti di restrizione nei primers
- Clonare il prodotto di PCR in un vettore T/A

In questo caso la temperatura di appaiamento dei primer inizialmente sarà calcolata solo sulla porzione gene-specifica, e sarà gradualmente innalzata alla temperatura di appaiamento dell'intero primer, sito di restrizione compreso





## **(alcune) applicazioni della PCR**

**Nelle tecniche di ingegneria genetica**

**Nella diagnostica molecolare**

**Nell'evoluzione molecolare**

**Nelle analisi di laboratorio**

**Nelle scienze ambientali**

**In ambito forense**

**etc. etc....**

## Applicazioni diagnostiche e forensi

La PCR ha rivoluzionato il campo della **diagnostica molecolare**, fornendo nuovi e potenti strumenti per effettuare diagnosi precoci di alterazioni genetiche anche a livello di singolo nucleotide

L'estrema sensibilità e la possibilità di funzionare a partire da campioni non trattati si è rivelata fondamentale nella **diagnosi prenatale** di malattie genetiche, **nell'analisi precoce di marker tumorali** e nei **follow up** clinici conseguenti ad asportazioni chirurgiche di tumori.

Anche in campo **forense e medico legale** la PCR si è imposta come strumento essenziale sul quale si basano analisi di paternità e perizie medico-legali ormai utilizzate comunemente a scopo probatorio nei tribunali di tutto il mondo.

## Diagnosi di infezioni batteriche e virali mediante PCR

Le diagnosi di infezioni batteriche o virali mediante PCR rappresentano oggi un'alternativa molto più sensibile e più rapida, rispetto alle tecniche diagnostiche tradizionali effettuate mediante isolamento dei ceppi patogeni in coltura e loro riconoscimento morfologico e con tecniche immunologiche.

L'uso della PCR Multiplex, inoltre, permette di diagnosticare contemporaneamente la presenza di più patogeni come rosolia, toxoplasmosi, citomegalovirus, parvovirus B-19, papilloma virus, HIV, HCV, Herpes virus, Epstein Barr virus

### Diagnosi della Tuberculosis

Il Mycobacterium tuberculosis è presente in numero ridottissimo nei tessuti colpiti (difficile diagnosi istologica). Per la diagnosi con PCR si estrae il DNA da una lesione e lo si amplifica con primers specifici per un gene altamente conservato in tutte le specie di Mycobacterium. Con questo approccio è possibile rilevare 10 bacilli su  $10^6$  cellule ospiti.



## Diagnosi di malattie geniche e genetiche

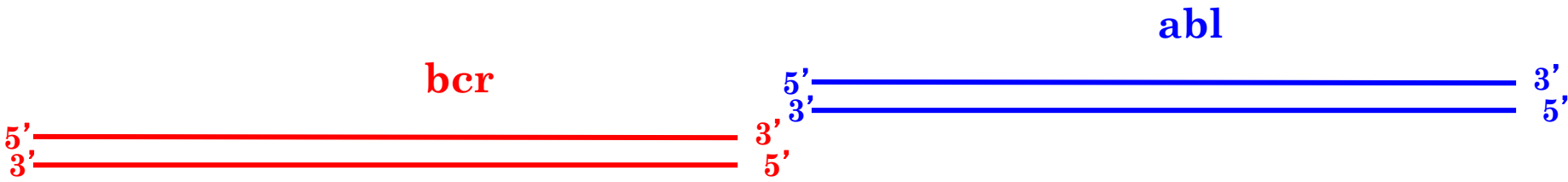
La PCR permette di diagnosticare la presenza di numerose malattie dovute a **mutazioni geniche in cellule autosomiche**, che non verranno trasmesse alla progenie (tipicamente nel caso di vari tipi di tumori) oppure dovute a **mutazioni geniche ereditarie**, sia di tipo monogenico che multigenico.

La conoscenza della base molecolare di alcuni tumori, per esempio

Leucemia mieloide cronica	bcr-abl t(9;22)
Linfoma follicolare non-Hodgkin	bcl-2
Linfoma di Burkitt	C-myc
Leucemia linfoide acuta M3	pml-RaR $\delta$ t(15;17)
Linfoma non Hodgkin	gene del recettore delle cellule T

ne permette la diagnosi molecolare per PCR.

## Cellula normale



Traslocazione  
tra i cromosomi  
9 e 22

## Cellula trasformata



Amplificazione  
per PCR



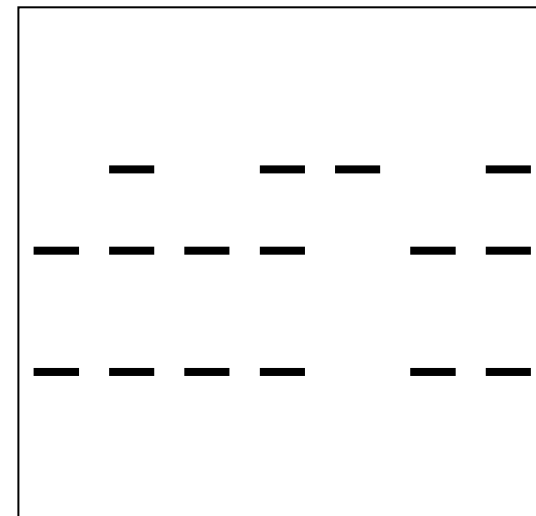
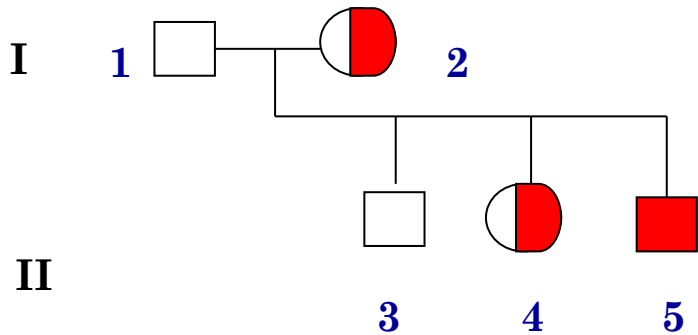
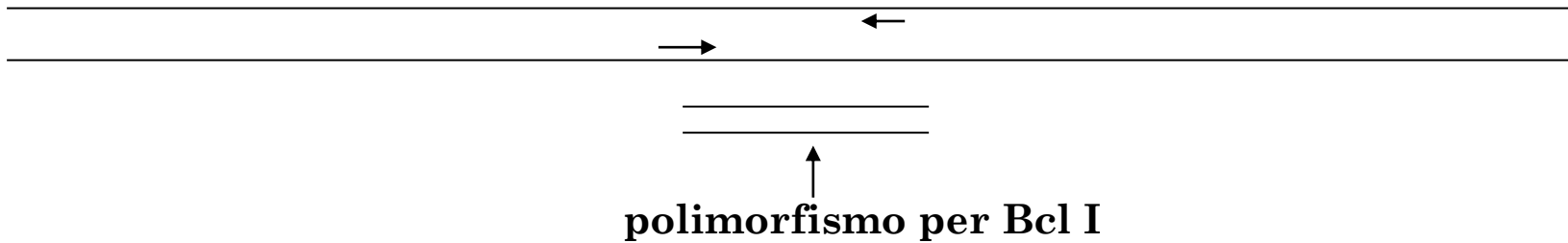
L' amplificazione di una banda specifica da una coppia di primers **bcr/abl** consente di diagnosticare una forma di leucemia mieloide cronica dovuta a traslocazione tra cromosomi

# Diagnosi prenatale di emofilia

A seguito di una mutazione puntiforme è perso il sito *BclI* quindi l'enzima di restrizione non riconosce la sequenza target e non effettua taglio endonucleolitico (**RFLP**). Quindi, si amplifica un frammento che contiene il sito della mutazione, si digerisce l'amplicone e si effettua la diagnosi:

2 frammenti (99 e 43 bp): **WT**; frammento integro (142 bp): **emofilia**.

Gene del fattore VIII



presenza del sito *BclI*

1 2 1 2 3 ctrl  
I II

## **Utilizzo dell' RT-PCR nello studio dell' espressione genica**

**Per ottenere informazioni qualitative e quantitative sui livelli d' espressione genica, la RT-PCR è impiegata al posto del Northern blotting per la maggiore facilità d' uso e per la maggior sensibilità**

**A causa della grande sensibilità della PCR i risultati quantitativi sono poco o affatto attendibili. Sono state messe a punto alcune tecniche per ovviare a questi inconvenienti. Tra queste:**

- La PCR semi-quantitativa**
  - La PCR competitiva**
  - La Real-Time PCR**

# 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Durante l'isolamento di un cDNA per RT-PCR, capita spesso di non riuscire ad isolare l'estremità 5' di un gene a causa della sotto-rappresentazione delle estremità, specialmente di quella al 5'. Si può quindi amplificare, per PCR, le estremità al 5' o al 3', utilizzando un **primer gene-specifico (GSP)** e un **primer universale**, mediante aggiunta di una coda al 3' tramite terminal transferasi e amplificazione di uno specifico frammento, esteso al 5'

