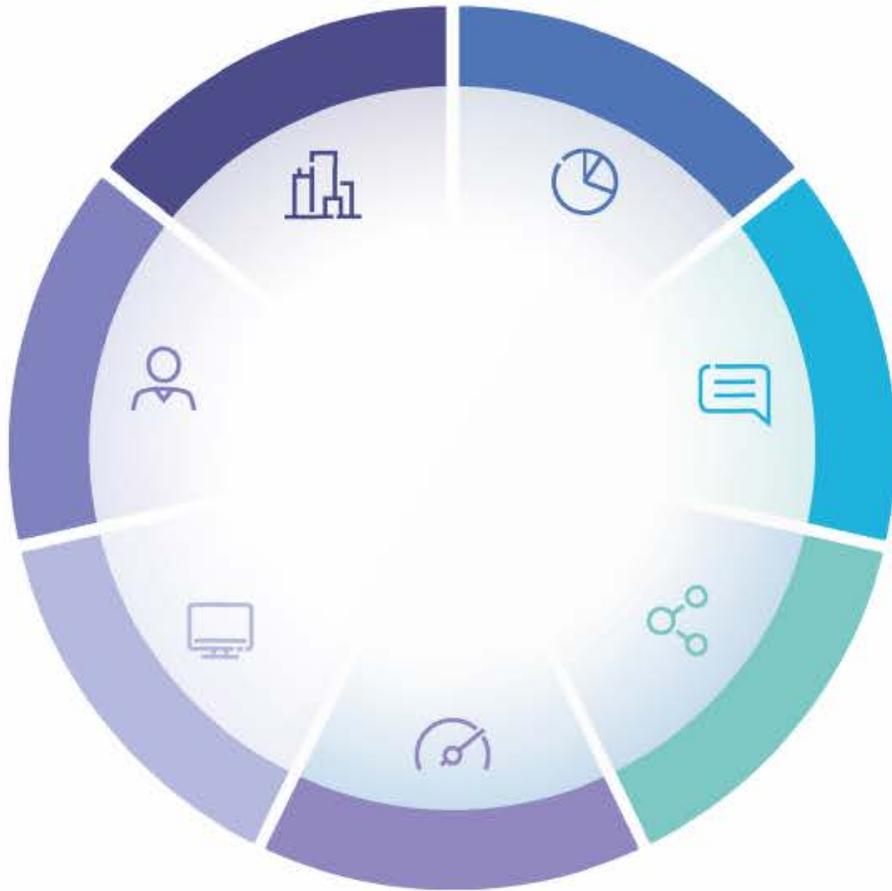


La PCR, tecnologia dai mille volti

Presentazione a cura di Assunta Croce, PhD



Indice

1. COME FUNZIONA LA PCR?
2. GLI ATTORI DEL PROCESSO
3. LE VARIANTI DELLA PCR E LE LORO APPLICAZIONI

Un po' di storia...

Il primo a studiare il processo di sintesi in vitro di un frammento di DNA fu Har Gobind Khorana insieme al suo team di ricerca nel 1971

jmb

Journal of Molecular Biology

Volume 56, Issue 2, 14 March 1971, Pages 341-361



Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases ☆ ☆☆

K. Kleppe ‡, E. Ohtsuka ¶, R. Kleppe ‡, I. Molineux ¶, H.G. Khorana ¶

Institute for Enzyme Research of the University of Wisconsin Madison, Wisc. 53706, U.S.A.

Received 20 July 1970, Available online 20 October 2004.



Un po' di storia...

- Nel 1983 Kary Mullis della Cetus inventa la PCR
- Nel 1985 Saiki, ricercatore della Cetus, pubblica su Science un articolo in cui si descrive l'amplificazione del gene della B-globina umana tramite la PCR

SHARE

ARTICLES



Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia

RK Saiki, S Scharf, F Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, N Arnheim

+ See all authors and affiliations

Science 20 Dec 1985;
Vol. 230, Issue 4732, pp. 1350-1354
DOI: 10.1126/science.2999980

Article

Info & Metrics

eLetters

 PDF

Una scoperta da Nobel

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

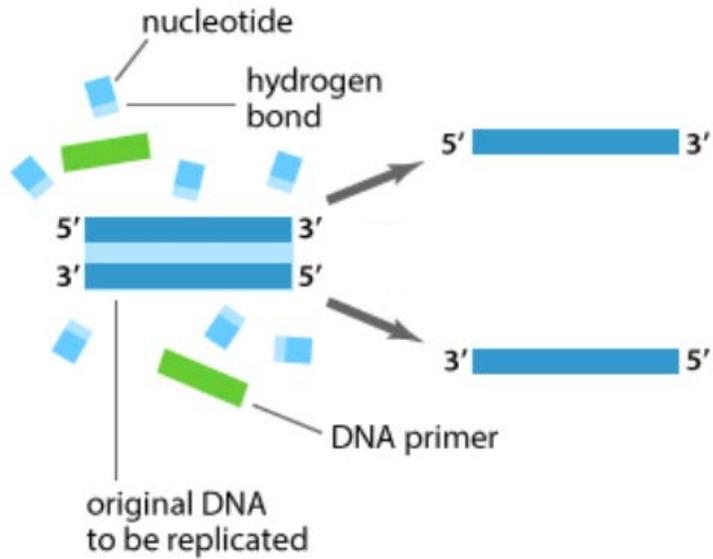
The Nobel Prize in Chemistry 1993 was awarded "for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry" jointly with one half to Kary B. Mullis "for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method" and with one half to Michael Smith "for his fundamental contributions to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

Fotocopiatrice molecolare

- Permette di amplificare specifiche porzioni di DNA in poco tempo e a basso costo
- Reazione a catena di polimerizzazione del DNA (**Polymerase Chain Reaction**), processo in vitro che mima il processo biologico
- 5 componenti essenziali: **DNA** da copiare, **primers**, **DNA polimerasi**, **dNTPs** , **tampone di reazione**
- 5 step: **inizializzazione** , **denaturazione**, **annealing**, **polimerizzazione** e **terminazione**



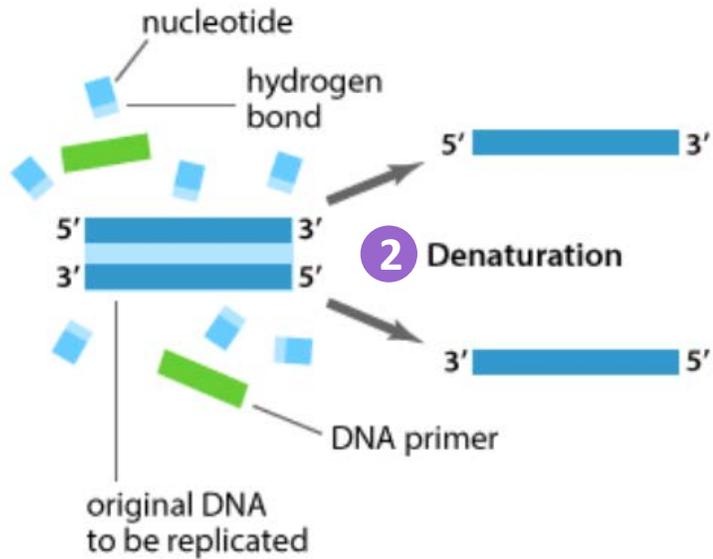
Step 1: Initialization



- Alta temperatura 94-96°C per qualche minuto (4-6 min)
- Denaturazione del DNA
- Attivazione della Taq DNA polimerasi

Modified from Applied Biological Material

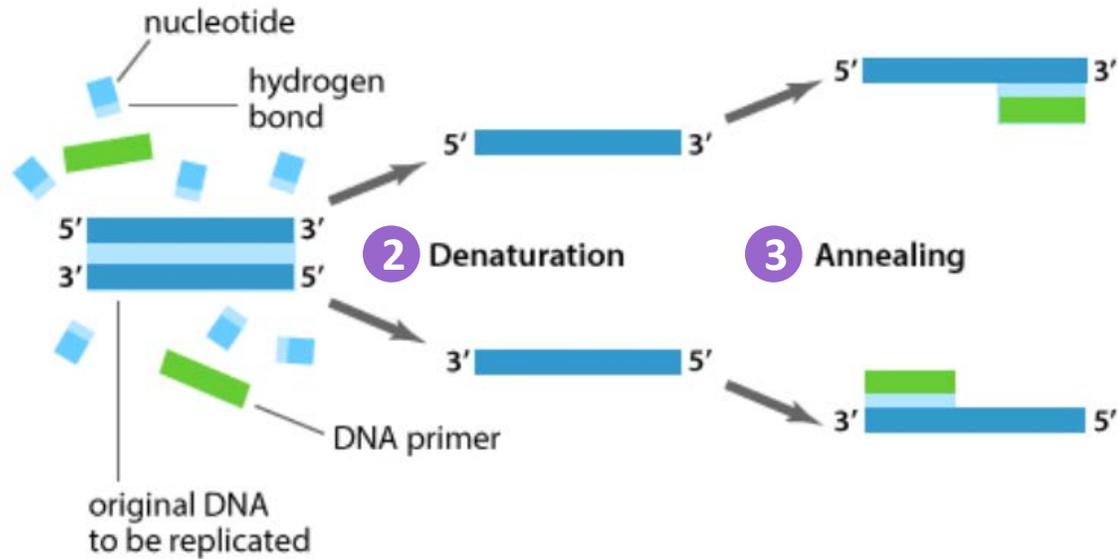
Step 2: Denaturazione



- È il primo degli step ripetuti
- Alta temperatura 94-98°C per 20-30 secondi
- Il DNA si apre

Modified from Applied Biological Material

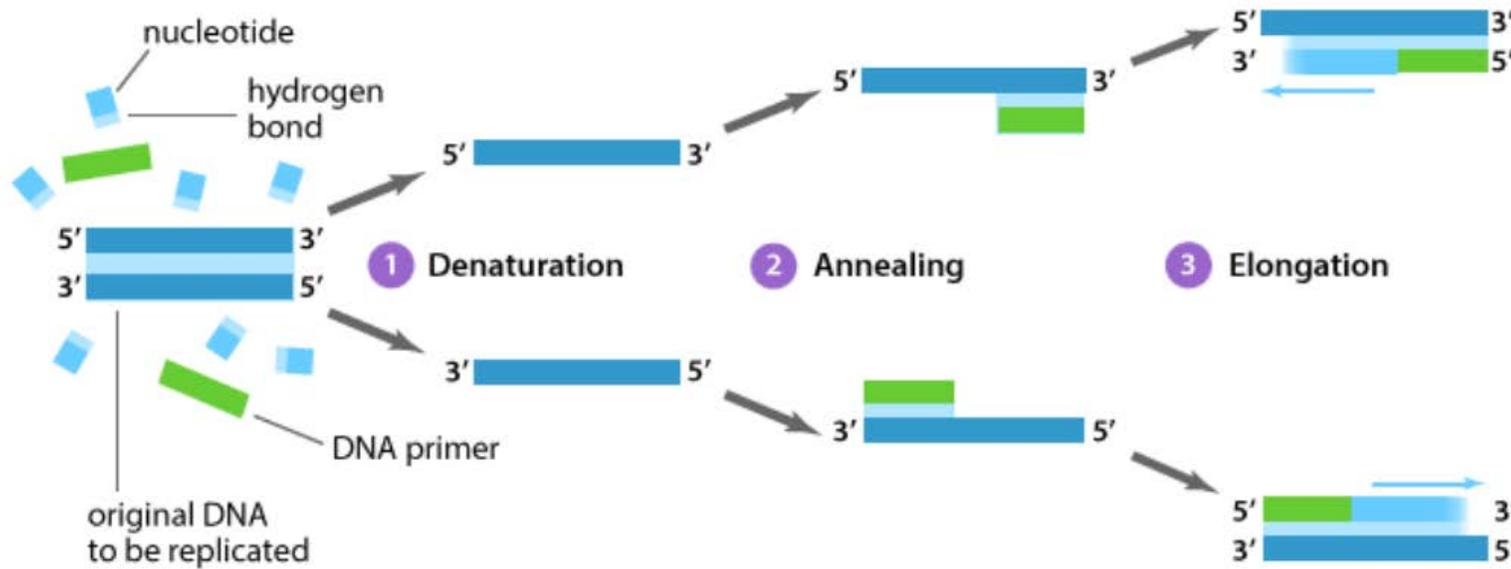
Step 3: Annealing



- È il secondo degli step ripetuti
- Temperatura tra 50-65°C per 20-30 secondi
- Appaiamento primer

Modified from Applied Biological Material

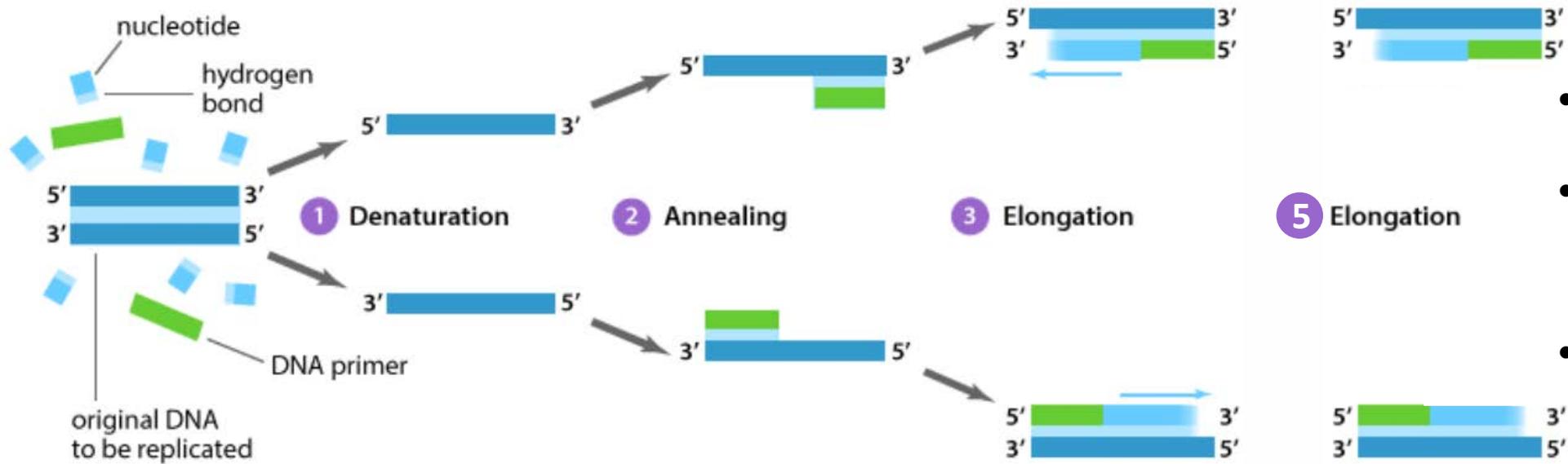
Step 4: Polimerizzazione



- È il terzo degli step ripetuti
- 72-78°C per 20-30 secondi
- Sintesi di nuove molecole di DNA

Modified from Applied Biological Material

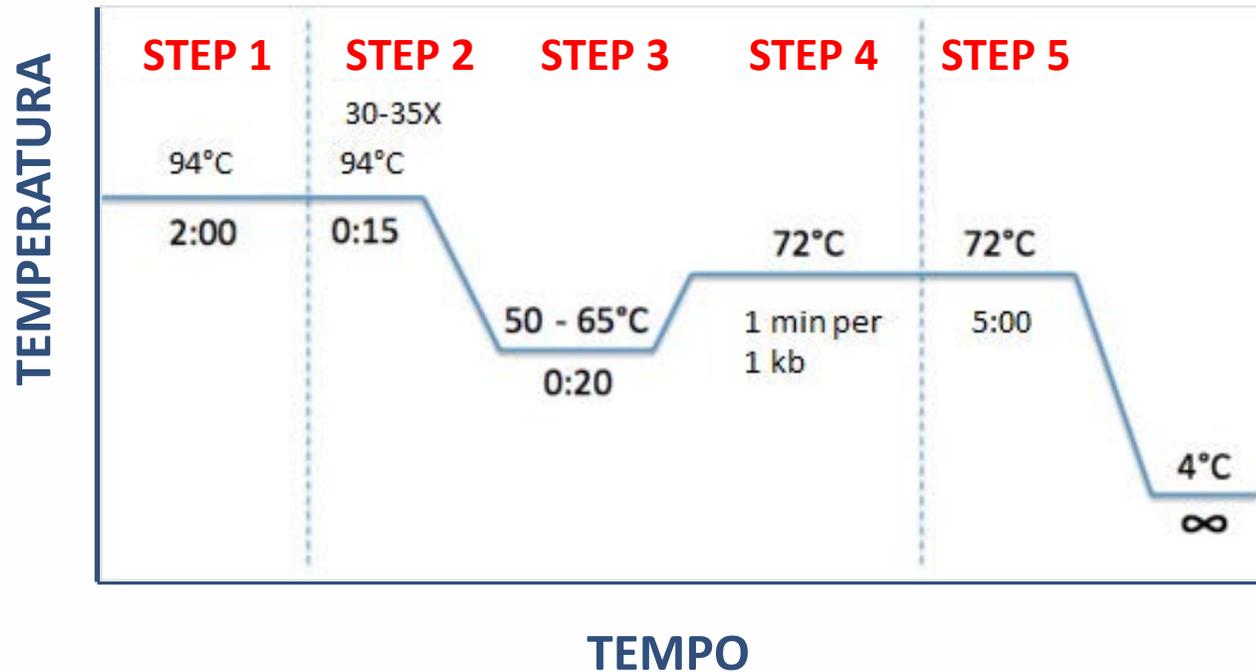
Step 5: Elongation finale



- È l'ultimo step
- 72 - 78°C per 10 minuti
- Completamento copiatura ssDNA

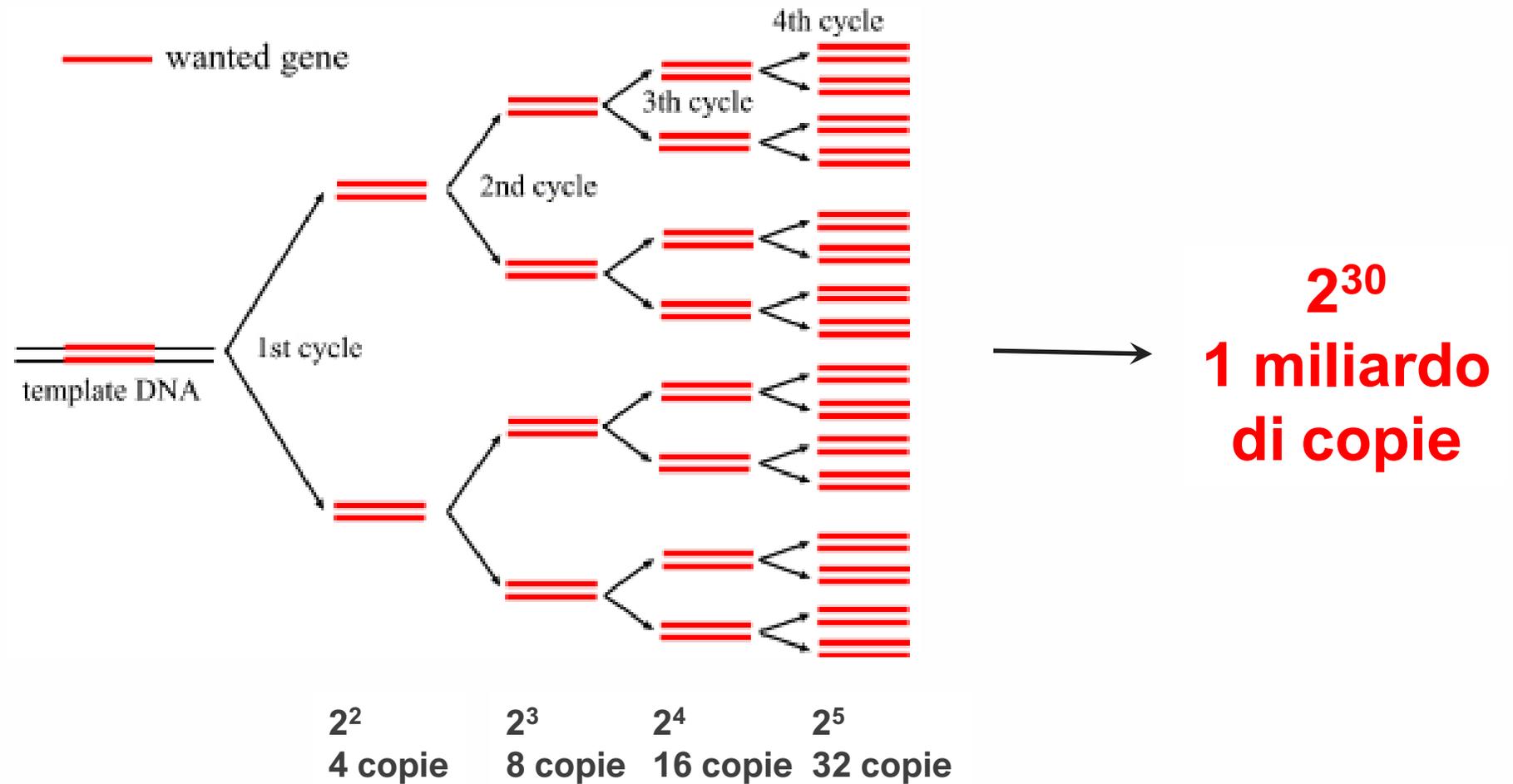
Modified from Applied Biological Material

La PCR in grafico



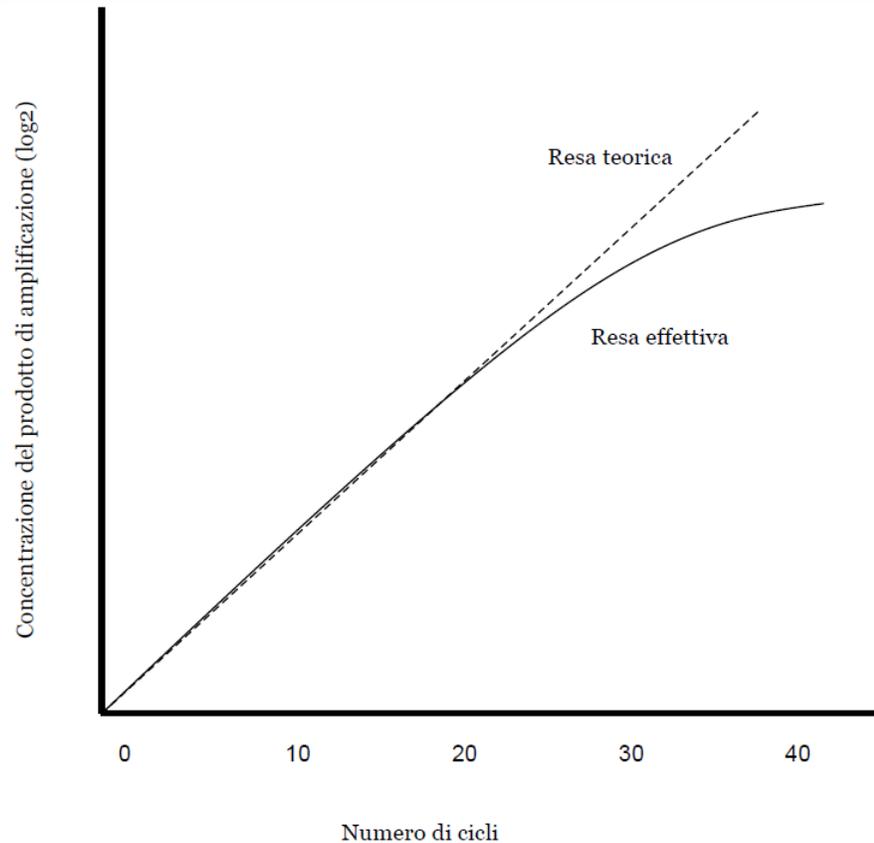
Modified from Butler, 2005

Un processo esponenziale



Credit: Andy Vierstraete

Effetto «plateau»



- La resa teorica non è uguale alla resa effettiva (**effetto plateau**)
- Dipende dalla degradazione dei reagenti (dNTPs e DNA pol) e dal pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto)

Credit: Scialpi e Mengoni, 2008

Gli attori del processo

La miscela di reazione



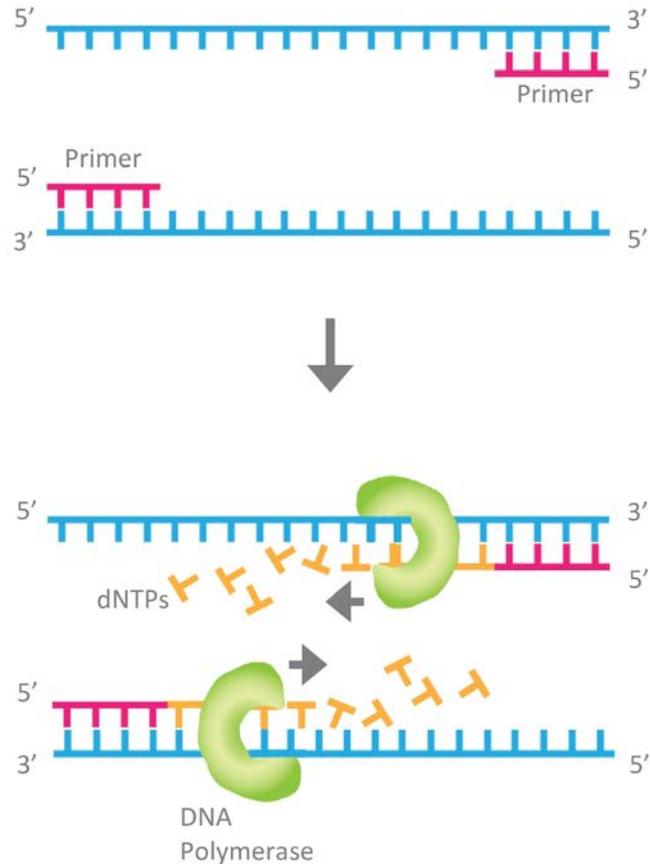
- Il DNA da copiare
- Due Primer (Forward e Reverse)
- dNTPs
- Tampone di reazione
- DNA polimerasi

Il DNA da copiare



- DNA genomico
- DNA plasmidico
- Singola cellula (es. colonia batterica)

Primer Forward e Reverse



- Oligonucleotidi a **singolo filamento**
- Da 17 a 25 nt di lunghezza
- Forniscono il 3' libero e fanno **da innesco** per la DNA polimerasi
- Eventualmente modificati ai terminali (linker, adattatori, siti riconosciuti da enzimi di restrizione)

Modified from Goldbio.com

Come si disegna un primer?

- I primer devono essere **specifici** (la specificità dipende dalla **sequenza**, dalla **lunghezza** e dalla **T_m**)
- Verificare la presenza di **strutture intra-molecolari** (come ad es. hairpin e self-dimer)
- Verificare la presenza di **annealing inter-molecolari** (cross-dimer)
- Contenuto in **GC di circa il 50%**, meglio se l'ultimo nucleotide al 3' sia una C o G (stabilità)
- Simile **Temperatura di melting** (T_m) tra i due primer o comunque differenza non superiore a 5°C

La temperatura di melting

- **Temperatura di melting (T_m)**: è il valore di temperatura a cui il 50% dei primer è legato al DNA
- La T_m si calcola con questa formula empirica:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

F ggctcgaaactatcaaaaATG

$$T_m = 8*4 + 13*2 = 58^\circ\text{C}$$

R CTGAgtgatctatctacattt

$$T_m = 7*4 + 14*2 = 56^\circ\text{C}$$

Calcolatori di T_m online

NEW ENGLAND
BioLabs Inc.

Tm Calculator v 1.12.0 FEEDBACK

Use the NEB Tm Calculator to estimate an appropriate annealing temperature when using NEB PCR products.

Instructions

- Select the product group of the polymerase or kit you plan to use.
- Select the polymerase or kit from the list of products.
- If needed, modify the recommended primer concentration.
- Enter primer sequences (with up to 3 ambiguous bases). Spaces allowed.

Note that an annealing temperature will only be displayed if both primer sequences are entered.

Product Group
Q5

Polymerase/Kit
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase

Primer Concentration (nM)
500 Reset concentration

Primer 1
GGCTCGAAACTATCAAAAATG

Primer 2
CTGAGTGATCTATCTACATT

Switch to batch mode Clear Use example input

Anneal at
56 °C

[Why is this so high?](#)

Primer 1
21 nt
38% GC
Tm: 59 °C

Primer 2
21 nt
33% GC
Tm: 55 °C

<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>

Tool per disegnare primer online

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Range: From To Clear

Forward primer: Reverse primer:

Or, upload FASTA file Nessun file selezionato

Primer Parameters

Use my own forward primer (5' → 3' on plus strand) Clear

Use my own reverse primer (5' → 3' on minus strand) Clear

PCR product size: Min Max

of primers to return:

Primer melting temperatures (T_m): Min Opt Max Max T_m difference

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span:

Exon junction match: Min 5' match Min 3' match Max 3' match

Intron inclusion: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min Max

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode:

Database:

Exclusion: Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Tool per disegnare primer online

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to

Primer-BLAST » JOB ID:4-k89nbDe2tcUetU5JTPZpww315xPMVJa

Primer-BLAST Results

Input PCR template: lcl|Query_1
 Range: 65 - 1088
 Specificity of primers: Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs

Primer 3 tooltip:
 Forward: 135..153 length 19 Tm 60.08 GC 57.89% Seq CCACATCCGGCTGAAACT
 Reverse: 1044..1068 length 25 Tm 57.13 GC 36.00% Seq AAGAAACAAGCTGGTATTATGGTAG
 PCR product length: 934

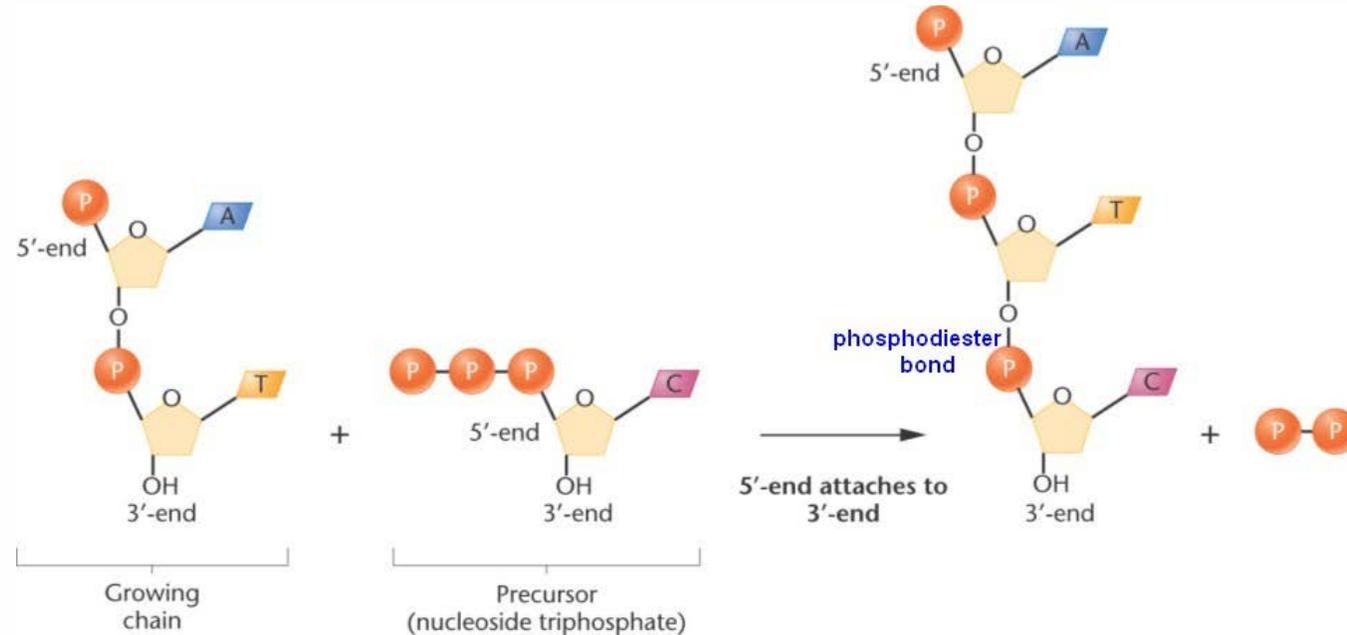
Detailed primer reports

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACATCCGGCTGAAACTA	Plus	20	135	154	59.83	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GAAGAAACAAGCTGGTATTATGGT	Minus	24	1069	1046	57.24	37.50	6.00	0.00
Product length	935								
Primer pair 2									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACAACAGCTCGATTGTGCC	Plus	20	168	187	59.41	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	AGAAACAAGCTGGTATTATGGTAGA	Minus	25	1067	1043	57.80	36.00	6.00	0.00
Product length	900								
Primer pair 3									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACATCCGGCTGAAACT	Plus	19	135	153	60.08	57.89	4.00	1.00
Reverse primer	AAGAAACAAGCTGGTATTATGGTAG	Minus	25	1068	1044	57.13	36.00	6.00	1.00
Product length	934								

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

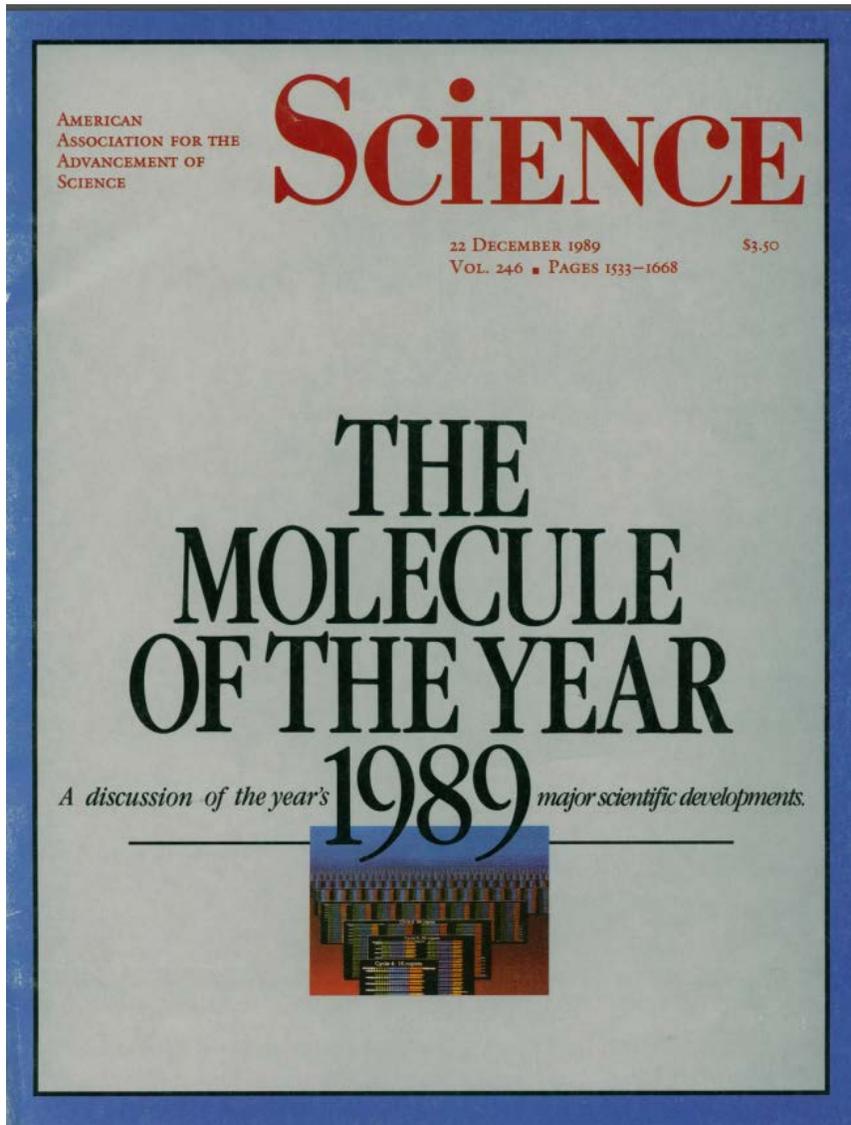
I nucleotidi trifosfato (dNTPs)

- Una **miscela bilanciata** di dATP, dCTP, dTTP e dGTP
- Utilizzati dalla DNA polimerasi per allungare i primer e copiare lo stampo
- Aggiunti in eccesso alla miscela di reazione (200 mM finale)



Tampone di reazione

- Fornisce alla DNA polimerasi le **condizioni chimiche** per catalizzare la reazione di polimerizzazione
- Contiene **sali** come Tris-HCl, KCl e Magnesio
- Ogni DNA polimerasi richiede **un tampone specifico**
- L'importanza del **Magnesio** (Mg^{2+}): **cofattore** della DNA polimerasi tra 0.5 e 3.5 mM (generalmente 1.5 mM)



La molecola dell'anno secondo *Science*

Due caratteristiche importanti

- **Fedeltà:** accuratezza con cui l'enzima copia lo stampo (dipende dall'**attività proofreading** o correzione di bozze).

§ frequenza di errore: 10^{-3}

§ frequenza di errore proofreading: 10^{-6}

§ frequenza introduzioni errori complessivamente: 10^{-9}

- **Processività:** il numero dei nucleotidi che l'enzima introduce prima di staccarsi dallo stampo (dipende anche dalla concentrazione di sali nel tampone)

Tanti tipi di DNA polimerasi

PRODUCT NAME (SUPPLIER)	POLYMERASE FIDELITY (Reported by supplier)	MAXIMUM AMPLICON LENGTH ⁵	EXTENSION TIME ⁵ (For simple templates ⁴)	EXTENSION TIME ⁶ (For complex templates ⁴)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	~280X <i>Taq</i> ¹	20 kb simple; 10 kb complex	10 s/kb	10 s/kb (< 1 kb) 20–30 s/kb (> 1 kb)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	39X <i>Taq</i> ¹	20 kb simple; 10 kb complex	15 s/kb	30 s/kb
Accuprime <i>Pfx</i> (Life)	26X <i>Taq</i> ²	12 kb ³	60 s/kb ³	
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS (Agilent)	20X <i>Taq</i> ²	19 kb ³	15 s/kb (< 10 kb ³) 30 s/kb (> 10 kb ³)	
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent)	19X <i>Taq</i> ²	17 kb simple; 6 kb complex	60 s/kb (< 10 kb) 120 s/kb (> 10 kb)	60 s/kb (< 6 kb) 120 s/kb (> 6 kb)
KOD DNA Polymerase (EMD)	12X <i>Taq</i> ¹	6 kb simple; 2 kb complex	10–20 s/kb	30–60 s/kb
Platinum <i>Taq</i> HiFi (Life)	6X <i>Taq</i> ²	20 kb ³	60 s/kb ³	

Credit: https://www.neb.com/~media/nebus/files/brochures/q5_trifold.pdf

Come si allestisce una reazione?

Component	50 μ l reaction	Final Concentration
10X Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	5 μ l	1X
10 mM dNTPs	1 μ l	200 μ M
10 μ M Forward Primer	1 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
10 μ M Reverse Primer	1 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
Template DNA	variable	<1,000 ng
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.25 μ l	1.25 units/50 μ l PCR
Nuclease-free water	to 50 μ l	

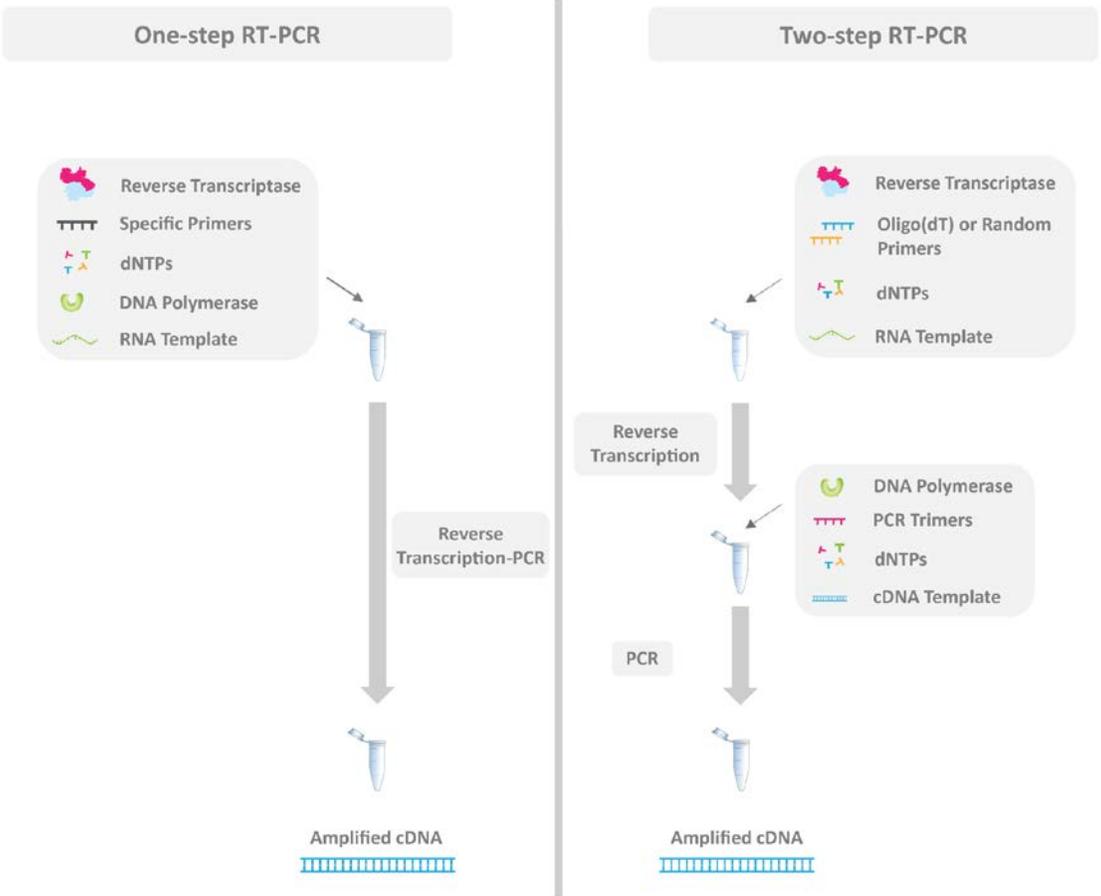
Modified from <https://international.neb.com>

Le varianti della PCR e le loro applicazioni

Reverse-transcriptase PCR

- **RT-PCR:** reverse transcriptase PCR
- Materiale di partenza: **RNA messaggero**
- Numero di cicli dipende da quanto è abbondante il trascritto (da 30 a 50 cicli)

Reverse-transcriptase PCR



Credit: www.goldbio.com

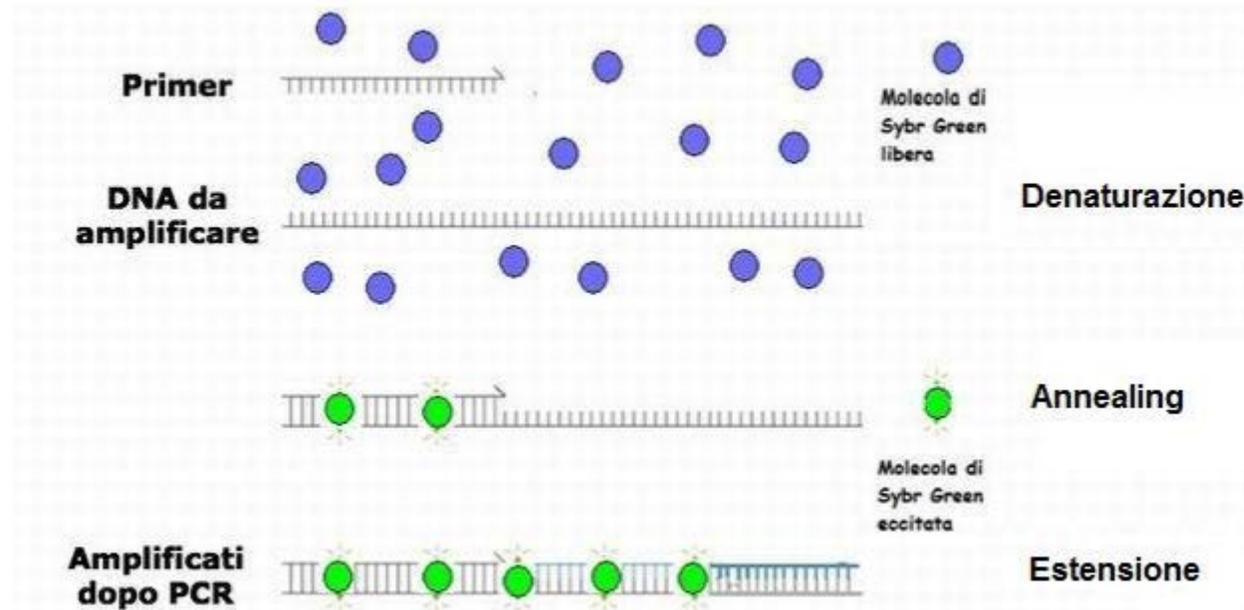
Applicazioni di RT-PCR

- Studiare il profilo di **espressione genica**
- Possibilità di **isolare cDNA** negli organismi eucariotici
- Studio e **analisi dei virus a RNA**

Real-time PCR (quantitative PCR)

- Permette di **quantificare la sintesi** del prodotto di PCR a ogni ciclo di amplificazione **in tempo reale**
- Segnale quantificato: **fluorescenza emessa da fluorocromi** che si legano al DNA in modo **aspecifico** (intercalanti) o **specifico** (sonde oligonucleotidiche)
- Materiale di partenza: **DNA o RNA messaggero** (RT q-PCR)

Fluorofori aspecifici



- Sybr Green, assorbe luce blu ed emette luce verde
- Segnale quantificato: **fluorescenza emessa da Sybr Green** che si intercala nel DNA a doppio filamento
- Segnale proporzionale al numero di copie di DNA prodotte

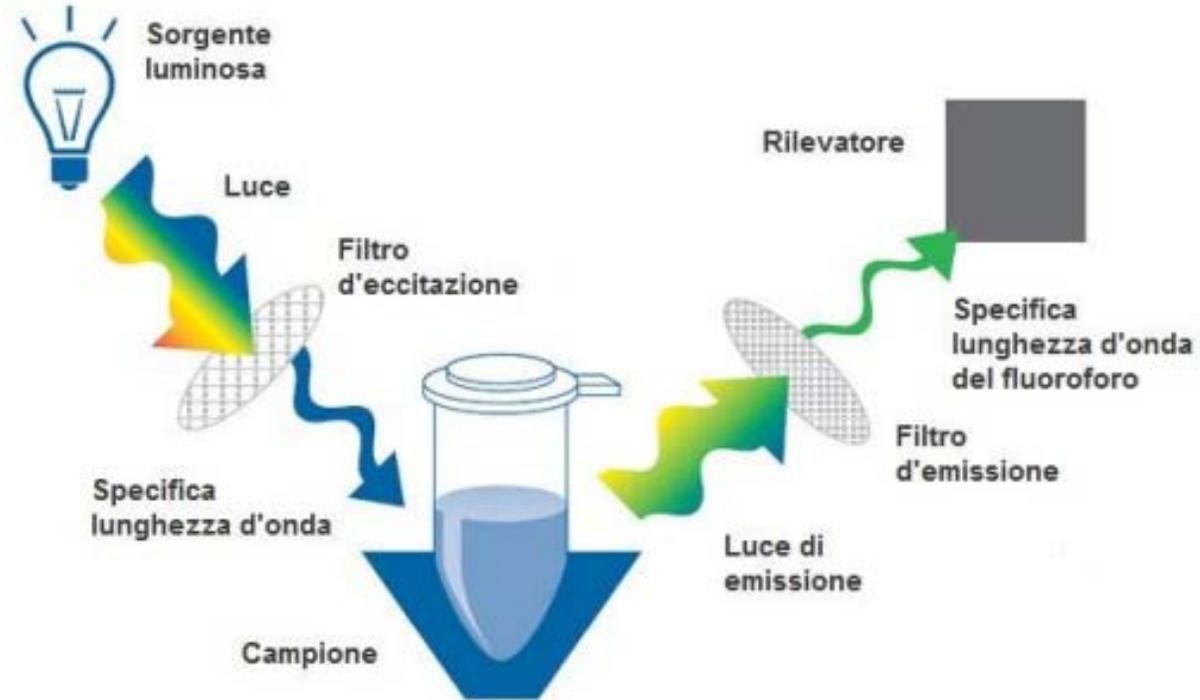
Fluorofori specifici (sonde)

- Il segnale fluorescente viene rilevato solo quando **la sonda si appaia** alla sequenza bersaglio e il segnale
- **Sonde idrolitiche** (sonde TaqMan) e **sonde da ibridazione** (molecular beacons)



Credit: bio-rad.com

Come viene rilevato il segnale?



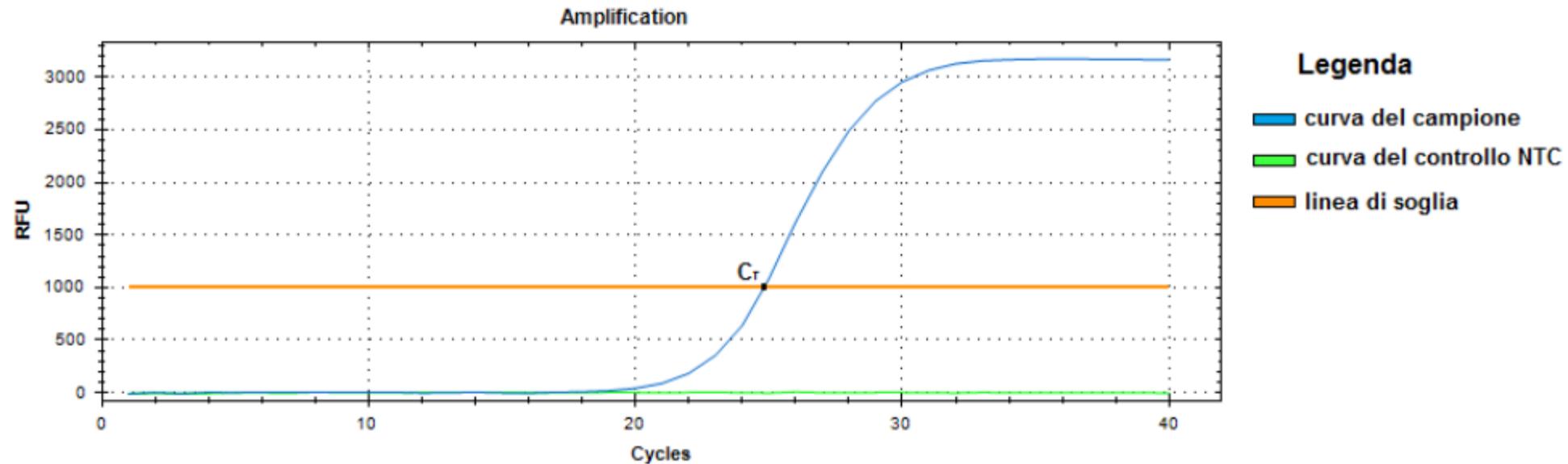
Credit: Andalò A., 2013

Un esempio di real time PCR



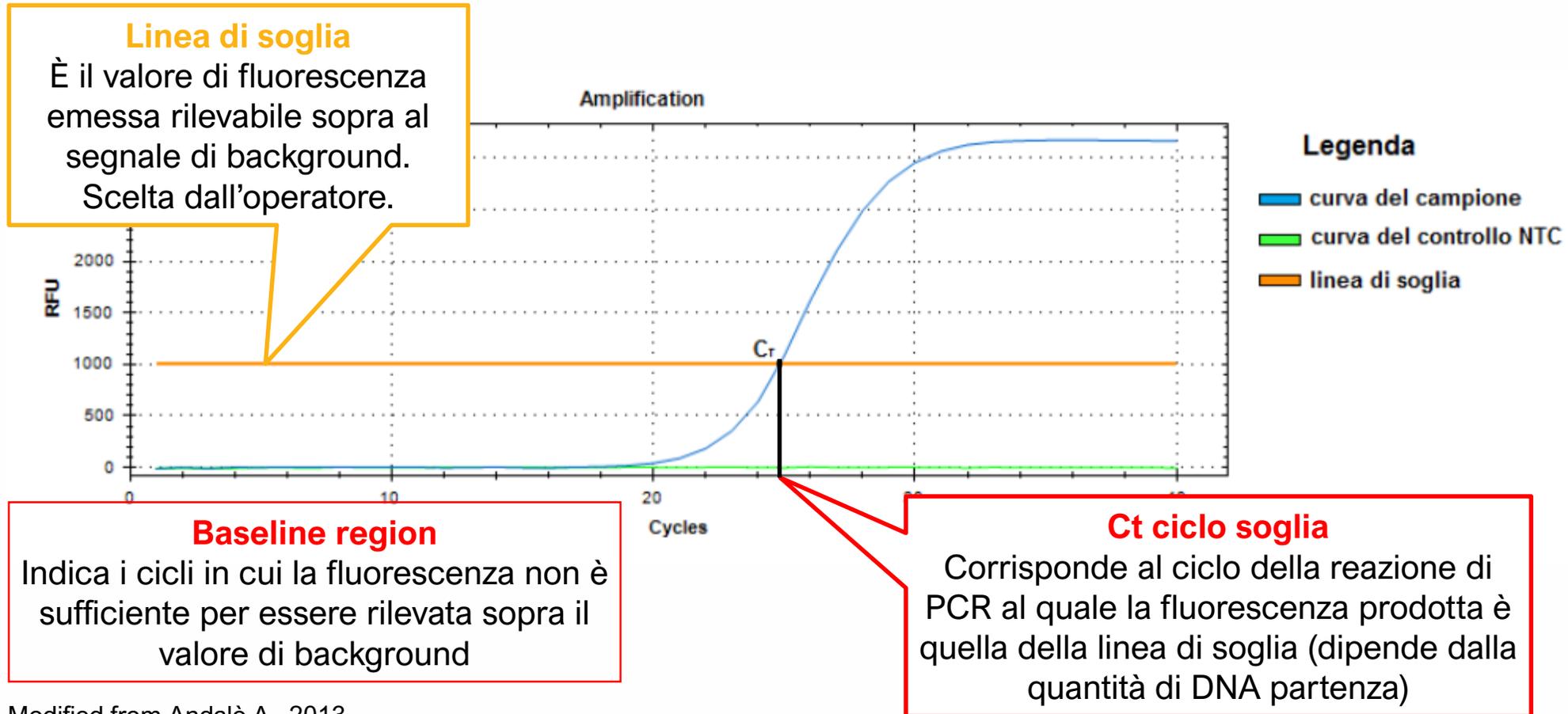
Credit: ThermoFisher.com

Un grafico al posto del gel d'agarosio



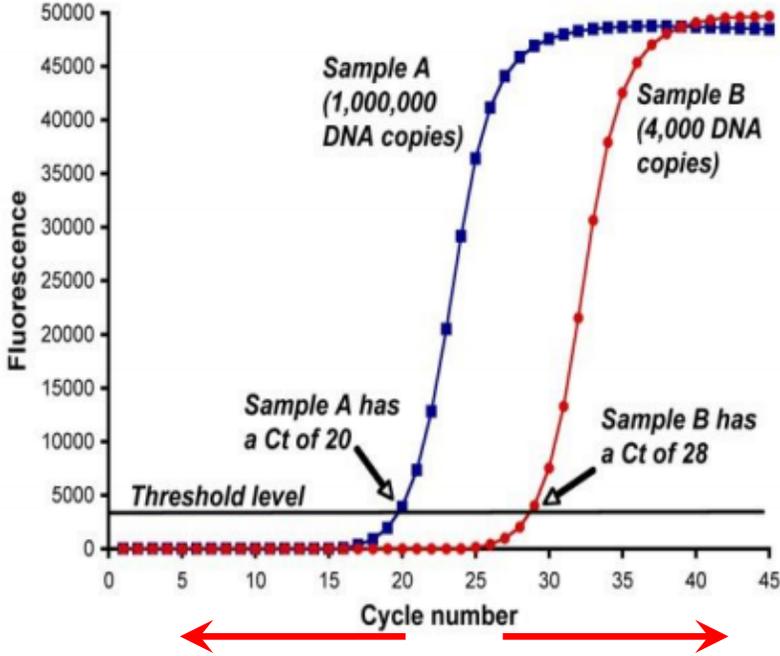
Modified from Andalò A., 2013

Un grafico al posto del gel d'agarosio



Modified from Andalò A., 2013

Quantificazione del campione



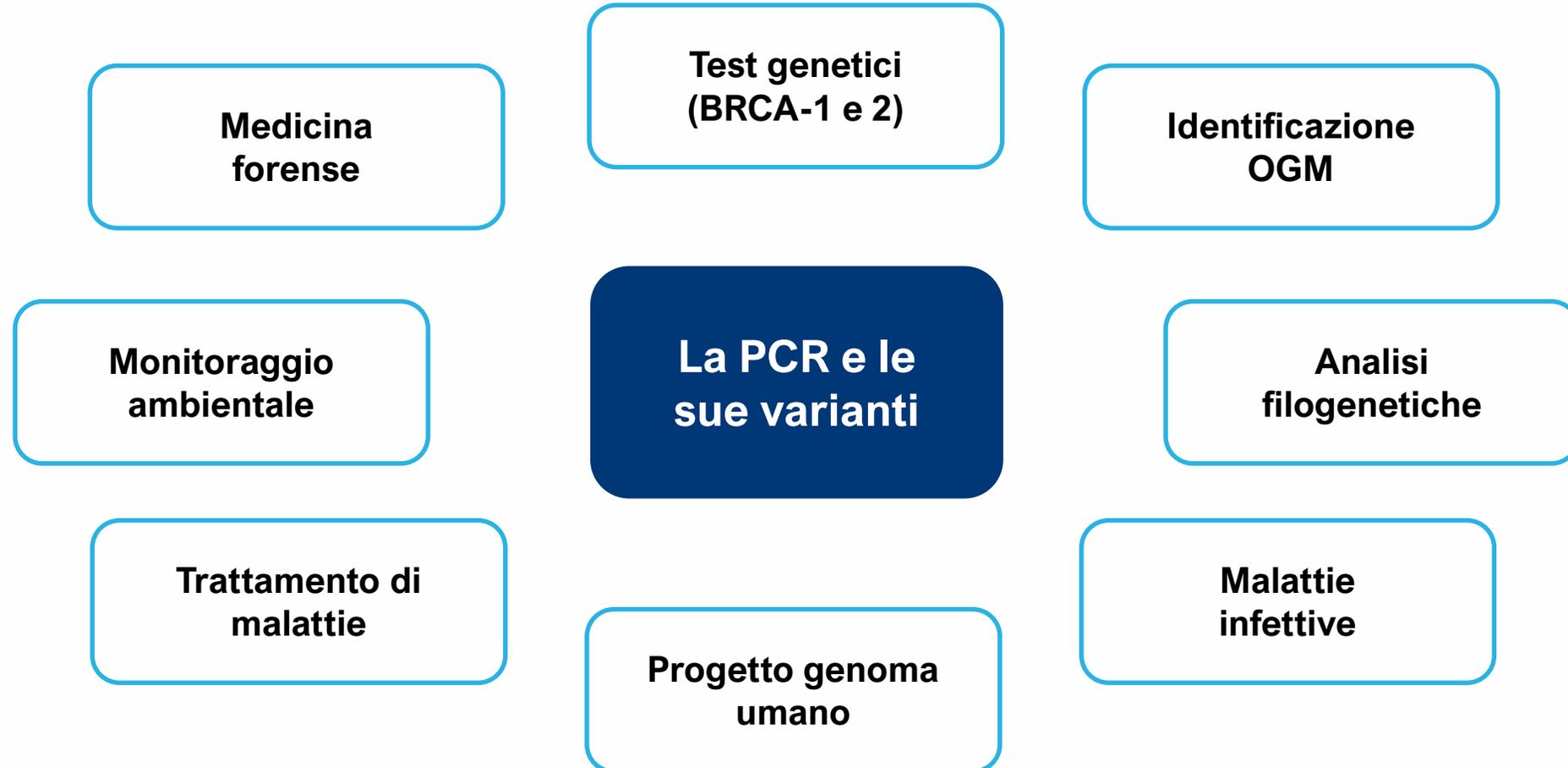
Più DNA nel campione di partenza

Meno DNA nel campione di partenza

Applicazioni Real-Time PCR

- **Studiare il profilo di espressione genica** in un campione biologico
- **Identificare la presenza di patogeni** in campioni alimentari e ambientali
- **Identificazione specie, allergeni e OGM**
- **Quantificare la presenza** delle copie di un **virus** in campioni biologici (**es. virus HIV**) per monitorare l'evoluzione della malattia
- **Studi di variazione genetica** (analisi di SNP e polimorfismi sul genoma umano e di altri organismi)

Tante applicazioni in campi diversi



**consulta tutte le risorse didattiche su
www.fondazione mediasorin.it**