

Lezione 11 - 12

giovedì 25 Marzo 2010

aula 2 ore 9:00
corso integrato di Biologia Applicata (BU)
ed Ingegneria Genetica (BCM)

applicazioni della PCR

RT-PCR, nested PCR

RACE 3' e RACE 5'

PCR inversa

Mutagenesi

Pcr quantitativa e semiquantitativa competitiva

variazioni sul tema PCR multiplex

Real Time PCR abbreviata = RT-PCR da non confondere

AFLPs

(uso di adapters anche col random sequencing e PCR)

3C = chromosome conformational capture e varianti

Altre possibilità di analisi tramite PCR

- perfezionamenti delle tecniche e degli enzimi
- nuove macchine con determinazione in tempo reale (real-time PCR) tramite laser (light-cycler) del DNA o cDNA amplificato proporzionale al template iniziale presente nel campione in analisi.

Questa è la PCR quantitativa, diversa dalla PCR semiquantitativa o competitiva.

La PCR quantitativa da un valore assoluto rispetto ad un amplicone di riferimento a quantità nota con la così detta curva di taratura da cui si ricava un c/t value (threshold cycle)

Altre possibili applicazioni della PCR

- abbiamo visto RT-PCR
tramite reverse transcriptase da mRNA

RT-PCR è il metodo per determinare l'espressione o meglio la trascrizione di un gene

- alternativa all'analisi Northern ma non determina la lunghezza del mRNA, solo la presenza e volendo la quantità trascritta

applicazione RT-PCR

nuovo esercizio: se devo retrotrascrivere un mRNA per ottenere un cDNA

devo fare prima una retrotrascrizione con random priming con esanucleotidi

e poi la PCR per vedere se il gene è espresso (trascritto) esperimento sostitutivo di un Northern, ma non dice la lunghezza del messaggero

i primers come li scelgo ? : sulla sequenza coding che è quella depositata in banca dati e che non è il cDNA che sarebbe il DNA complementare all'mRNA dopo retrotrascriz.

quindi si selezionano i primers come per una normale PCR purchè si abbia la sequenza corrispondente a quella coding = al mRNA = sequenza codificante (quella in banca dati)

La reverse trascrittasi RT

L'uso della reverse trascrittasi risale a quando furono scoperti i meccanismi molecolari con cui i virus ad RNA si replicavano all'interno delle cellule infettate.

Le più utilizzate sono quelli della Murine Moloney leukemia virus MMLV, Avian myeloblastosis virus AMV che poi sono state anche trasformate per resistere meglio ad alta temperatura per fare la “one step RT-PCR”

Oltre alle RT anche le Taq polimerasi sono state migliorate per efficienza ed affidabilità (riduzione di errori di sintesi).

RT-PCR: cosa si analizza

= analisi della trascrizione di un gene o isolamento di un cDNA senza Northern blot o screening di una cDNA library (si deve avere una sequenza nota).

La RT-PCR: da RNA totale di cellule per verificare che sia trascritto quel particolare gene. Basta una quantità di RNA molto piccola a differenza di un northern dove per ogni corsa ci occorrono 2-3 µg di poly A mRNA o 7-10 µg di RNA totale. Nel caso di una cDNA library la quantità iniziale di RNA e di lavoro è assai maggiore.

RT-PCR classica:

- Primo filamento o con primer di oligo dT o random priming con esanucleotidi. - L'enzima funziona a 37°C; mutanti resistono fino a 60°C.
- Si retrotrascrive tutto l'mRNA o tutto l'RNA, nel caso in cui i trascritti siano molto lunghi e l'enzima potrebbe non completare la retrotrascrizione a partire dal polyA.
- Dall'RNA va eliminato il DNA genomico.
- Dopo la sintesi del primo filamento di DNA si può far partire una normale PCR, ma si fa un trattamento di RNase per eliminare l'RNA, gli esanucleotidi e l'oligo dT; ci sono protocolli in cui si fa un'unica reazione perché la temperatura della PCR è selettiva e la Taq hot-start non si attiva prima di essere portata oltre 70°C.

stratagemmi della RT-PCR

Accorgimento: quando si estrae l'RNA si deve evitare il DNA e si può fare un trattamento di DNase, e/o scegliere i primers a cavallo di due esoni

I filamento con rev transcript. a bassa temp.

Il filamento con Taq polymerase, I coppia di primers (sulla sequenza del mRNA). Non si vede tutto il trascritto, come in un Northern, non se ne può valutare il peso, ma solo se quel frammento è trascritto (cioè se c'è quel mRNA), non si vede lo “splicing” alternativo salvo scelta dei primers su esoni diversi

Valgono tutte le cose che si fanno per la PCR compreso rischio di amplificazioni aspecifiche, la reazione va messa a punto ogni volta. A differenza del Northern la buona amplificazione del frammento (amplicone) può dipendere non solo dal fatto che c'è molto mRNA, ma anche dall'efficienza della PCR, quindi così non è quantitativa.

la retrotrascrizione

Per RT si intende reverse transcriptase su template di RNA

Per avere un cDNA (DNA complementare ad un RNA messaggero) si deve retrotrascrivere l'mRNA cioè farlo diventare DNA

I retrovirus ad RNA fanno la sintesi del DNA complementare al loro cromosoma ad RNA tramite una DNA polimerasi specifica che usa come template RNA anziché DNA.

Pero' sempre con la sintesi in direzione 5'-3' come ogni polimerasi.

L'enzima "reverse transcriptase" o trascrittasi inversa che si utilizza non è termoresistente, ma deriva da un retrovirus eucariotico, AMV avian myeloblastosis virus, M-MuLV Moloney leukemia virus murino ed anche altri. Più recentemente sono state isolate e clonate delle RT mutanti che resistono a temperatura più alta di 37°C fino a 60°C per aumentare specificità.

Le tecniche precedenti per lo studio della trascrizione erano l'analisi Northern e l'isolamento dei cDNA da libraries clonate in vettori vari.

vantaggi della RT-PCR

Analisi della trascrizione tramite PCR

Analisi a partire da piccole quantità di RNA totale,
svantaggio: non si sa la lunghezza del cDNA o mRNA

Analisi della trascrizione e non determinazione del PM
dei trascritti (Northern)

Analisi dei livelli di trascrizione più fine per la sensibilità
del metodo, se si vedessero tramite Northern le stesse
quantità il Northern sarebbe più informativo (anche PM)

Ampliconi possibilmente a cavallo di introni, perché ?

come si fa una RT-PCR

Si deve ottenere il retrotrascritto cioè il cDNA (DNA complementare all' mRNA)

Si parte da estratti di RNA totali o arricchiti per poly ⁺(A) su resina con oligo dT

La retrotrascrizione può avvenire con primers di esanucleotidi random o con poly T, a seconda della lunghezza dei trascritti e se si vogliono tutte le regioni trascritte o sempre a partire dal 3' poliadenilato.

RNA è molto instabile e vanno usati degli inibitori delle Rnasi per evitare che si degradino. Il cDNA è molto più stabile e si conserva meglio e più a lungo.

Il cDNA si utilizza per la PCR però c'è un solo filamento complementare al trascritto con senso 5'-3' inverso.

RT-PCR dal II filamento in poi

Accorgimenti e controlli della RT-PCR

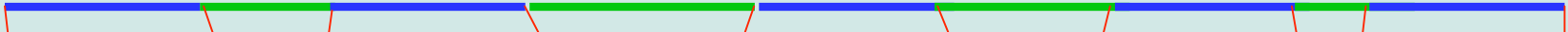
Prima di retrotrascrivere il cDNA si tratta l'RNA con DNase per eliminare ogni traccia di DNA genomico che potrebbe dare falsi positivi.

Ottenuto il cDNA dalla reverse trascrittasi si passa alla PCR vera e propria con i primers specifici della regione del messaggero che vogliamo amplificare.

Come accorgimento si può (si deve quando è possibile) amplificare un amplicone che comprende due porzioni di due esoni diversi e così non si amplifica il frammento di DNA genomico che è molto più lungo in quanto contiene l'introne. Naturalmente la lunghezza dell'amplicone è sempre ragionevole e non c'è nessun bisogno di amplificare esoni interi, ma sequenze dalle 150 alle 500 pb.

genomic & coding sequence, mRNA, cDNA

genomic sequence con esoni ed introni

5'  3'

5'  3'

mRNA = coding sequence

5'  3'

cDNA primo filamento RT

3'  5'

PCR su cDNA a due filamenti

5'  3'

Correzione parametri di una PCR

La PCR deve dare dei prodotti che corrispondono agli attesi

Quando i prodotti non sono gli attesi:

Smear - poca specificità nonostante i primers specifici

- si gioca sulla temperature di “annealing”, temp. ↑ su
- cicli troppo lunghi rendono aspecifica l’amplificazione

Bassa amplific. - stringenza “annealing” alta, temp. ↓ giù

- ciclo troppo corto, allungare tempi di annealing o extension

Ritocco dei parametri del protocollo, le variabili, il ciclo,

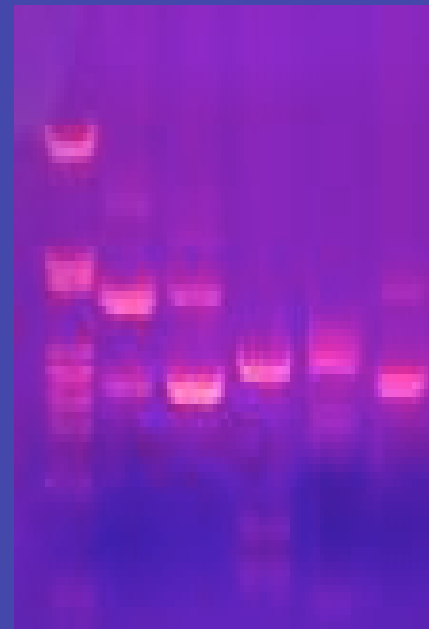
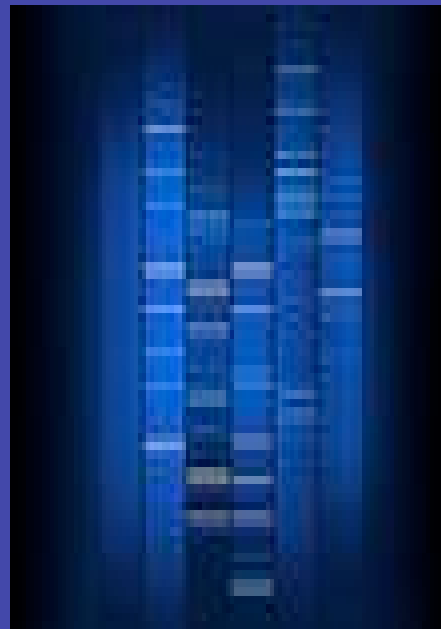
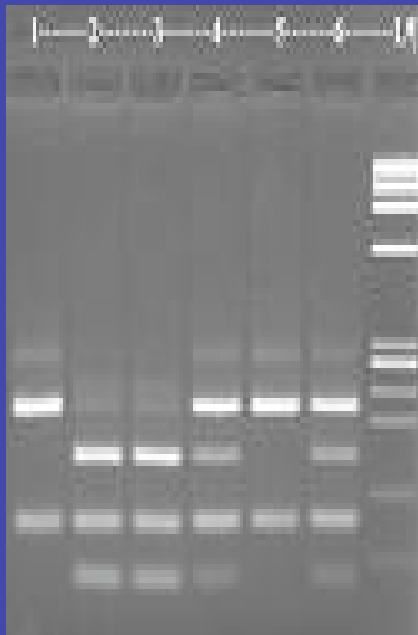
sequenza di un cDNA dalla banca dati

per aumentare specificità?

facciamo una doppia PCR :

la seconda interna alla prima = nested PCR

se abbiamo provato ad ottimizzare in ogni modo la nostra PCR
e vediamo che si amplificano altri frammenti si prova a fare
una seconda PCR sul primo prodotto con nuovi primers



amplificazioni
aspecifiche,
peso
molecolare
diverso
dall'amplicone
prescelto

la sequenza 5'- 3' di un cDNA

```

GGATCCCTGT TCCTGATCAC TGATCTCTGG TTCTTTTATT ATGCATATTC 50
ATTTTGAAAT CTGATTCCTT TTCTGAGCAT GTATCAGTCT GACTAGACAC
TGAGTCCTGT CTGATTTCTG AGCCTTGGCC CTCATGAGTA AGTGACCTGC
AGTGGTGGAG GGAGCTCCAG GGGAGCCGAG ACCCTCTCAG TGCATGTACT
CACTGGTAGA TGAAGAAATG ACCCCAATGA TTGCTCCATT CTTCCAGGCT
CAGAGGGGTG TGTAGGCCCC AGGAGGACTT GGTGGGGAGA AGACCAGCCC
AGGCCCTGTG AGTACACCCA GCCCCAGCCC CTAAGGGGTC GCCAGGTCTC
GACTTAGCAC TGGGGAGGGG GTACAGTACA GGAGTGGGGA CAGGAAGGTG
AGGGGAGGCC ATGCCGTTTG TATTCTCTTG CTTTCTCTC TCTCCTGAAG
CCTCTTGAAT AGACCTGCAG AAATACCCAA AATAGCCCTG TGGGGTGGCT 500
GAGTCATTGT GAACACAGCC CAGGTCAGGT GTTCCAGCCA GAGAACTGCT
GTTCTGAGAA ACATGCCCCA AAACCGAGAC CTGGCCAGGT GTGCCTGGGG
CCTGAGCGAG GGGCTGCAGC CACAGGTAGG CCCAGCCCCA ACCAGCCCAG
AGTCAGCTAG GGCTTTCCAG GTCCAGGGTT AGGCAGAGGT CAGCCAGGGT
CAACCACGGT CTATCTGAGG GGAGAGACAA GAGACACAGA GACATAGAGA
GAGAGAGACA GGGATGGGGA GAGACAAGAG AGACAGGAAA GGAGAGACAA
AGACAGACAC AGAGAGAGAG ATGGGGATGG AGAGAGATAA GAGACAGGGA
CAGGGAGGGA CAGAGGCGAG GCCAGTGACA GAGACAGAGT TACAAGAGAC
AGAAAGAGAG AGAGATGAGA TGAGAGAGAT CAGAAGAAAC GGAGACACAG
ATGGGAGAAA AAGAGAGGAG ATGGGAACAG GAAAAGAGA CATGGAGACA 1000
    
```

calcolate:
la T°C e
lunghezza
ampliconi
da bp a bp

scrivete i
primers
da 5' a 3'

I coppia rossa amplicone + lungo

II coppia celeste nested amplicone + corto

una nested PCR

```
1 gatcacaggt ctatcaccct attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggtatttt
61 cgtctggggg gtgtgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc 1frw
121 gcagtatctg tctttgattc ctgcctcatt ctattattta tgcacctac gttcaatatt 2frw
181 acaggcgaac atacctacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata
241 acaattgaat gtctgcacag ccgctttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca
301 aacccccccc tccccccgct tctggccaca gcaacttaaac acatctctgc caaaccccaa
361 aaacaaagaa ccctaacacc agcctaacca gatttcaaatt tttatcttta ggcggtatgc
421 actttttaaca gtcaccccc aactaacaca ttattttccc ctcccactcc cataactacta
481 atctcatcaa tacaaccccc gcccatccta cccagcacac acacaccgct gctaacccca
541 taccocgaac caaccaaacc ccaaagacac ccccacagt ttatgtagct tacctcctca
601 aagcaatata ctgaaaatgt ttagacgggc tcacatcacc ccataaacia ataggtttgg
661 tcctagcctt tctattagct cttagtaaga ttacacatgc aagcatcccc gttccagtga
721 gttcaccctc taaatcacca cgatcaaaaag ggacaagcat caagcacgca gcaatgcagc 2rev
781 tcaaaacgct tagcctagcc acacccccac gggaaacagc agtgattaac ctttagcaat
841 aaacgaaagt ttaactaagc tatactaacc ccagggttgg tcaatttcgt gccagccacc
901 gcggtcacac gattaaccca agtcaataga agccggcgta aagagtgttt tagatcacc 1rev
961 cctccccaat aaagctaaaa ctcacctgag ttgtaaaaaa ctccagttga cacaaaatag
1021 actacgaaag tggctttaac atatctgaac acacaatagc taagacccaa actgggatta
```

determinare lunghezza posizione T melting dei primers
lunghezza ampliconi = da bp n.x a bp n.y e posizione

i controlli essenziali

Controlli, negativi, positivi,
(i controlli ci fanno capire se l'esperimento è venuto bene)

Cosa è il controllo negativo? E quello positivo?
A cosa servono?

Rischio contaminazione (il DNA templato potrebbe essere
presente nell'ambiente dove si esegue l'esperimento)

Perché si ha contaminazione ?

procedure

a differenza del Northern si può usare quantità minime di RNA

la Rev Transcript virale a 37°C, mutanti max 65°C

oligo dT, random priming con esanucleotidi,
dal cDNA in poi PCR

sistemi onnicomprensivi con entrambe le reazioni

PCR con primers esonici

Primers: le stesse condizioni di scelta di PCR diretta

precauzioni

estrarre RNA eliminando DNA genomico che falsifica il risultato

cosa si vuole vedere con RT-PCR: la trascrizione di un gene

come eliminare il DNA: con estrazioni specifiche con gradiente in ClCs o con solventi specifici (Guanidina)

dopo l'estrazione trattamento con DNase

scelta di primers su esoni diversi: il DNA contaminante ha peso molecolare maggiore (introni)

può essere quantitativa?

la RT-PCR può essere quantitativa

l'amplificazione è proporzionale alla quantità di template

l'amplificazione è proporzionale alla quantità iniziale

dopo un certo numero di cicli c'è saturazione

saturazione = impossibilità di rilevazione delle differenze o di crescita lineare del prodotto di amplificazione, si perde la proporzionalità di amplificazione e quindi una risposta di tipo quantitativo, resta solo una indicazione qualitativa.

perchè quantitativa ?

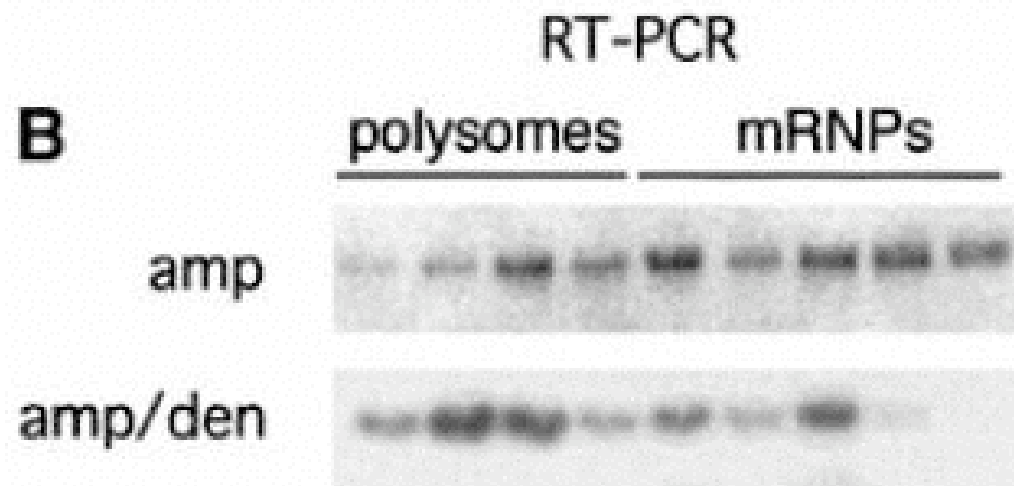
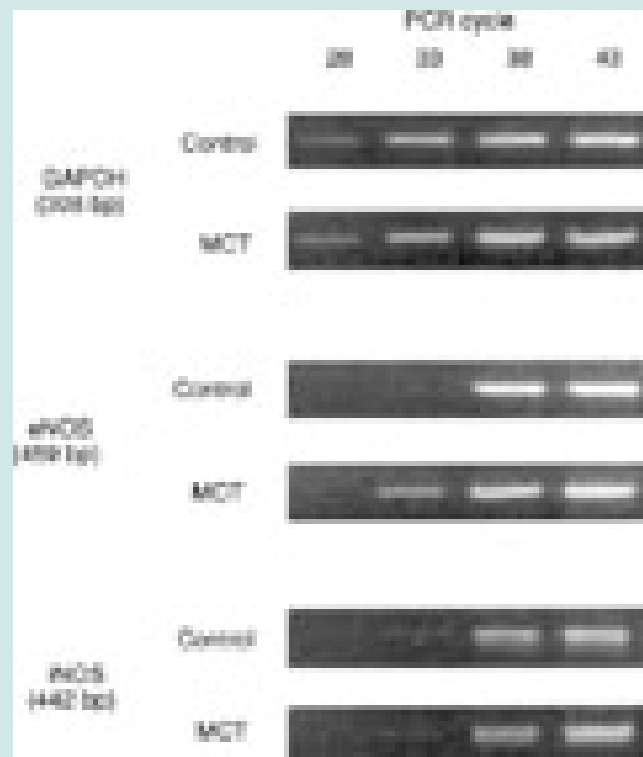
l'amplificazione è proporzionale al template iniziale,

perchè si conserva la proporzionalità anche dopo molti cicli di amplificazione ?

rispondete perchè già lo sapete!

la rivelazione su gel

dopo elettroforesi su gel di agarosio si rivela il DNA
amplificato come intensità di banda



controllo di RT-PCR

altro controllo negativo :

assenza di amplificazione sui campioni di RNA non retrotrascritti

se si amplifica cosa vuol dire?

altro controllo positivo nel caso che il trascritto sia assente o debolissimo:

amplificazione con primers per un gene house-keeping

Controlli della PCR

Controlli di estrazione: quali?

- ripetibilità della amplificazione
- ripetibilità su campioni indipendenti
- univocità di amplificazione col protocollo ottimizzato

Controlli di contaminazione: quali?

- a. estrazione di controllo con i prodotti di estrazione
- assenza di amplificazione su a.
- b. assenza di amplificazione

su tutti i prodotti di reazione della PCR:

primers

taq polimerase

nucleotidi

tampone

acqua di diluizione