

Lezione 13 - 14

martedì 30 Marzo 2010

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

cosa è una "Nested" PCR

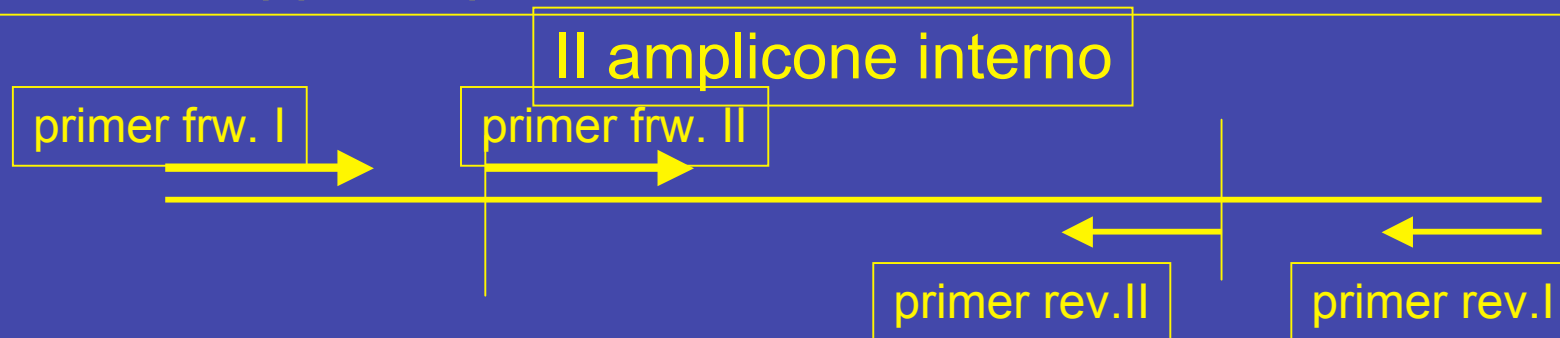
Per aumentare la specificità con PCR ottimizzata e non ulteriormente ottimizzabile con i parametri di reazione

Se si deve avere un prodotto di amplificazione con alta efficienza eliminando altri prodotti indesiderati

- a) omologia parziale dei primers già ottimizzati
- b) sequenze omologhe, pseudogeni, sequenze duplicate

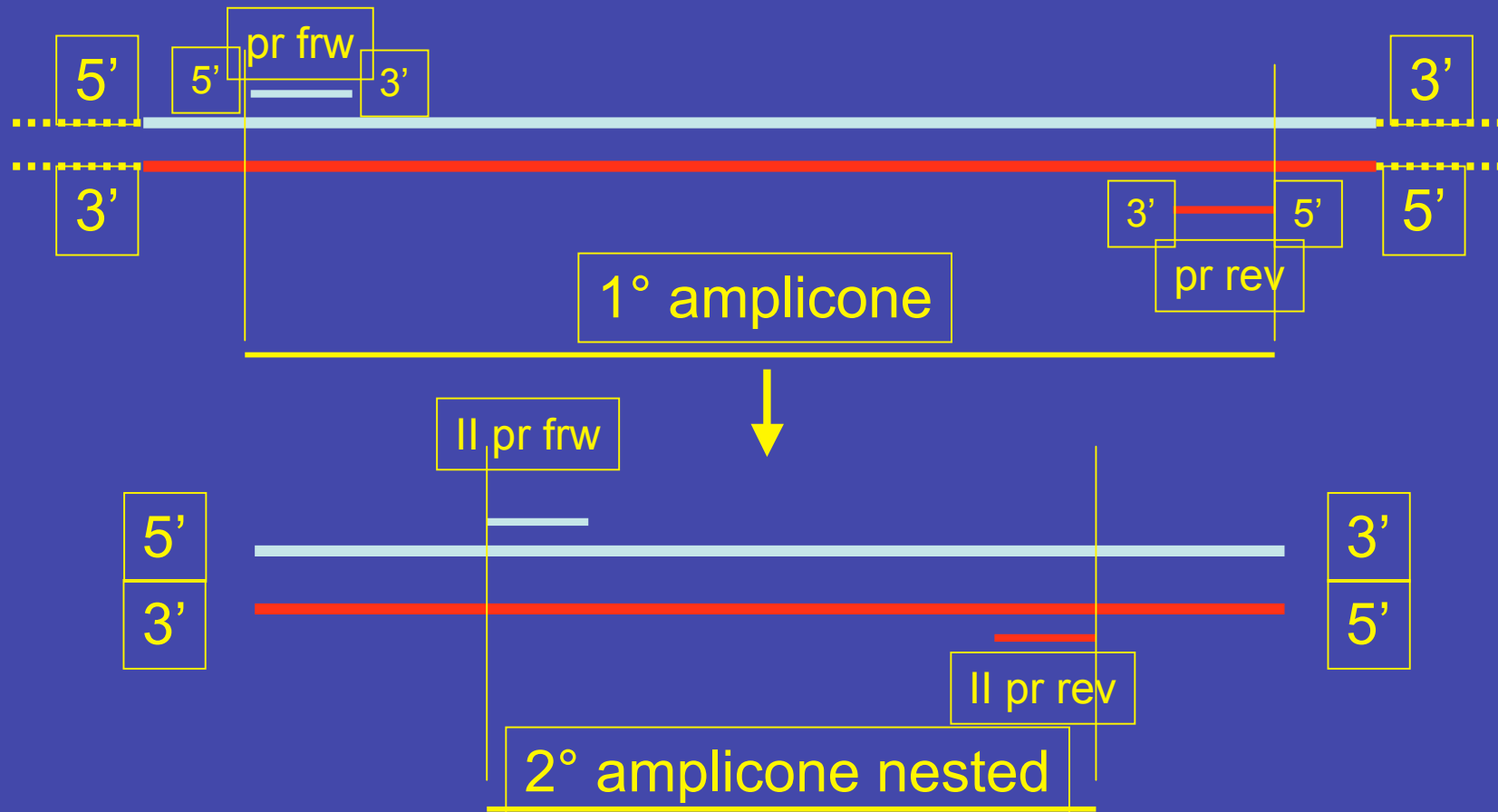
caso a: trovare una seconda coppia di primers interni al primo amplicone (probabilità limitata di omologia di entrambe le sequenze in una stessa regione)

caso b: cercare le regioni divergenti dove scegliere altre coppie di primers



PCR nested primo esempio

Quando abbiamo un amplicone per esempio di 500 bp



il secondo amplicone sarà più breve secondo la posiz. dei primers

esercizio

```
1 CTCAGAGCTG GGAAGGAGGC TCTAGATGGC GGCTGTGCCT TAGAGAGAGC GCGCTCTGCT
61 CCCTGCCTTT GCCTCACTTT ACGCAACTTT CCCTAACTTT CGGGCAGCCT CAGGGGGCCC
121 CCGTAGCCCC CTGCCCTTCC TAGGGACTTA CTGGGGTCGA TTCGAACCTT TTTTGGGAG
181 AAAAGCAGCT TTTAGGAGCT TTCTTTTCGT GCCTTGTTGG AAAGAAGCAG CCGTACTGAG
241 AGCCCAGGTC GTTGTTTTTT CCAGCTTAGA AGCCATGGCG CACCTCCATT TTTGTGCGCT
301 CTCCTAATGA GGTTTTTTTT CTTTCGGACC TGTTTTAGTA TTAATTATTG CTTTATTTTT
361 TTGACCAGTT AACATATTTG AGGGTTATTT TATTTATTTT TCGTTTTTTA ACGGAGGATT
421 TTGCCTTTAT TTTTAATTAT TTGGGATCTG ATATTTTTCT ACTAGTAGAT AGGACTCTTG
481 GTTTGGACAT ACTACATGGA TCAGTAAATA CCTGGGCACA GGACTTCAA GCAAACACAG
541 ATTCCCCCTC CCCCTTAATA TTTAAGAATT AAAAGATGAT GAGAAATAAG GACAAAAGCC
601 AAGAGGAGGA CAGTTCGCTA CACAGCAATG CATCGAGTCA CTCAGCCTCT GAAGAAGCTT
661 CGGGTTCAGA CTCAGGCAGT CAGTCGAAA GTGAGCAGGG AAGTGATCCA GGAAGTGGAC
721 ATGGCAGCGA GTCGAACAGC AGCTCTGAAT CTTCTGAGAG TCAGTCGGAA TCTGAGAGCG
781 AATCAGCAGG TTCCAAATCC CAGCCAGTCC TCCCAGAAGC CAAAGAGAAG CCAGCCTCTA
841 AGAAGGAACG GATAGCTGAT GTGAAGAAGA TGTGGGAAGA ATATCCTGAT GTTTATGGGG
901 TCAGGCGGTC AAACCGAAGC AGACAAGAAC CATCGCGATT TAATATTAAG GAAGAGGCAA
961 GTAGCGGGTC TGAGAGTGGG AGCCCAAAA GAAGAGGCCA GAGGCAGCTG AAAAAACAAG
1021 AAAAATGGAA ACAGGAACCC TCAGAAGATG AACAGGAACA AGGCACCAGT GCAGAGAGTG
```

- Trova i primers per fare una PCR di un frammento di circa 3- 400 bp di questa sequenza,
- trova i primers per una PCR nested.
- Trova i primers per una PCR inversa e nested
- Trova a che gene appartiene questa sequenza

esecuzione esercizio

1° primer forward: da b. 72 a 92 = 21 basi;
10 GC, 11 AT = $40 + 22 = T$ melting 62°C

1° primer reverse: da 786 a 767 = 20 basi;
10 GC, 10 AT = $40 + 20 = T$ melting 60°C
amplicone = 715 bp (da 72 a 786)

nested: 2° forward: da b. 121 a 140 = 20 basi;
14 GC, 6 AT = $56 + 12 = T$ melting 68°C

2° reverse: da b. 520 a 498 = 23 basi;
11 GC, 12 AT = $44 + 24 = T$ melting 68°C
amplicone = 400 bp (da 121 a 520)

esercizio II parte

PCR inversa: dopo aver analizzato per Southern la regione si sceglie l'enzima di restrizione per avere un frammento di circa 4-6 kb
scelta dei primers: 2° e 1° primer forward invertiti (rev. compl.) del 1° amplicone

1° primer rev inv. e 2° da b. 961 a 982

cerca la sequenza in banca dati su sito NCBI:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

nucleotide blast: UniGene infoGeoGene info Homo sapiens chromodomain
helicase DNA binding protein 2 (CHD2), transcript variant 1, mRNA;
Length=9374

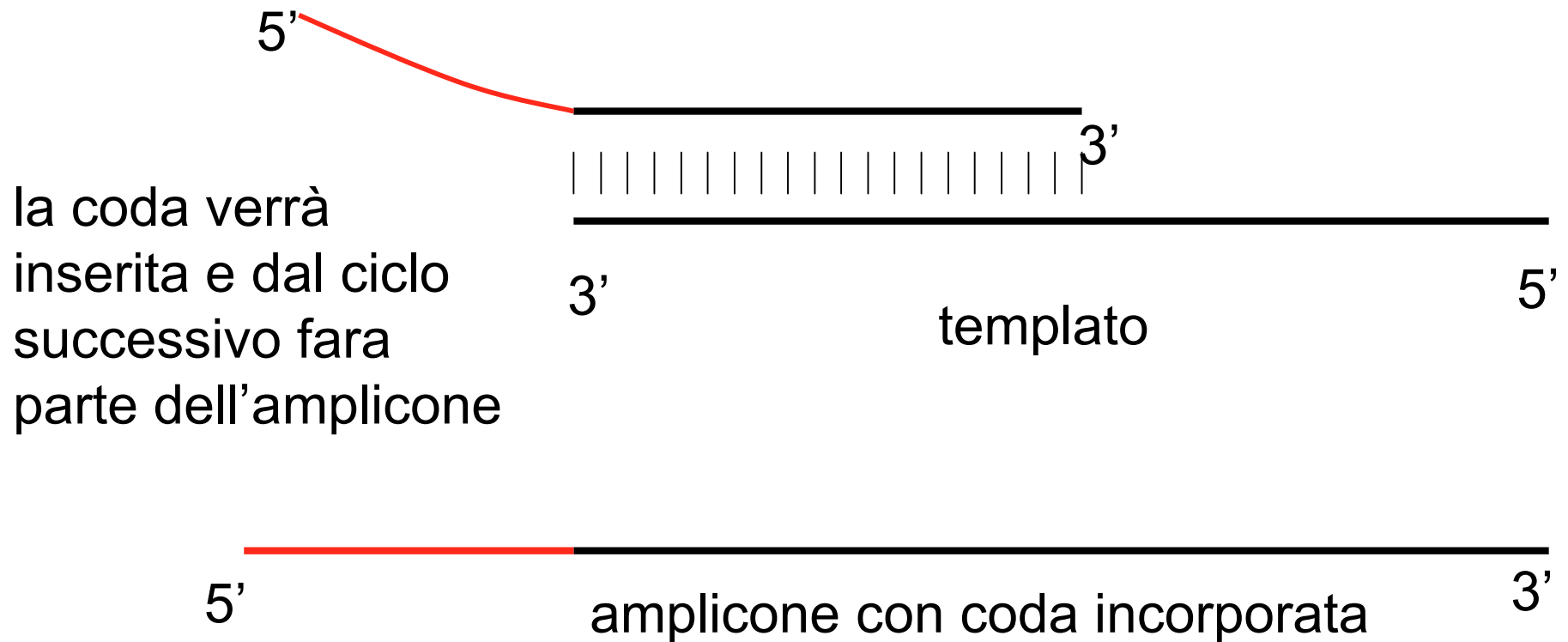
segnare i primers

1	CTCAGAGCTG	GGAAGGAGGC	TCTAGATGGC	GGCTGTGCCT	TAGAGAGAGC	GGCTCTGCT	
61	CCCTGCCTTT	<u>GCCTCACTTT</u>	<u>ACGCAACTTT</u>	<u>CCCTAACTTT</u>	CGGGCAGCCT	CAGGGGGCCC	1° frw; 2° inv
121	<u>CCGTAGCCCC</u>	<u>CTGCCTTTCC</u>	TAGGGACTTA	CTGGGGTCGA	TTCGAACCTT	TTTTTGGGAG	2° frw; 1° inv
181	AAAAGCAGCT	TTTAGGAGCT	TTCTTTTCGT	GCCTTGTTGG	AAAGAAGCAG	CCGTACTGAG	
241	AGCCCAGGTC	GTTGTTTTTT	CCAGCTTAGA	AGCCATGGCG	CACCTCCATT	TTTGTGCGCT	
301	CTCCTAATGA	GGTTTTTTTT	CTTTCGGACC	TGTTTTAGTA	TTAATTATTG	CTTTATTTTT	
361	TTGACCAGTT	AACATATTTG	AGGGTTATTT	TATTTATTTT	TCGTTTTTTA	ACGGAGGATT	
421	TTGCCTTTAT	TTTAAATTAT	TTGGGATCTG	ATATTTTCT	ACTAGTAGAT	AGGACTCTTG	
481	GTTTGGACAT	ACTACATGGA	<u>TCAGTAAATA</u>	<u>CCTGGGCACA</u>	GGAATTCAA	GCAAACACAG	2° rev
541	ATTCCCCCTC	CCCCTTAATA	TTTAAGAATT	AAAAGATGAT	GAGAAATAAG	GACAAAAGCC	
601	AAGAGGAGGA	CAGTTCGCTA	CACAGCAATG	CATCGAGTCA	CTCAGCCTCT	GAAGAAGCTT	
661	CGGGTTCAGA	CTCAGGCAGT	CAGTCGGAAA	GTGAGCAGGG	AAGTGATCCA	GGAAGTGGAC	
721	ATGGCAGCGA	GTCGAACAGC	AGCTCTGAAT	CTTCTGAGAG	TCAGTCGGAA	<u>TCTGAGAGCG</u>	1° rev; 1° inv
781	<u>AATCAGCAGG</u>	TTCCAAATCC	CAGCCAGTCC	TCCCAGAAGC	CAAAGAGAAG	CCAGCCTCTA	
841	AGAAGGAACG	GATAGCTGAT	GTGAAGAAGA	TGTGGGAAGA	ATATCCTGAT	GTTTATGGGG	
901	TCAGGCGGTC	AAACCGAAGC	AGACAAGAAC	CATCGCGATT	TAATATTAAG	GAAGAGGCAA	
961	<u>GTAGCGGGTC</u>	<u>TGAGAGTGGG</u>	<u>AGCCCCAAAA</u>	GAAGAGGCCA	GAGGCAGCTG	AAAAACAAG	2° inv
1021	AAAAATGGAA	ACAGGAACCC	TCAGAAGATG	AACAGGAACA	AGGCACCAGT	GCAGAGAGTG	

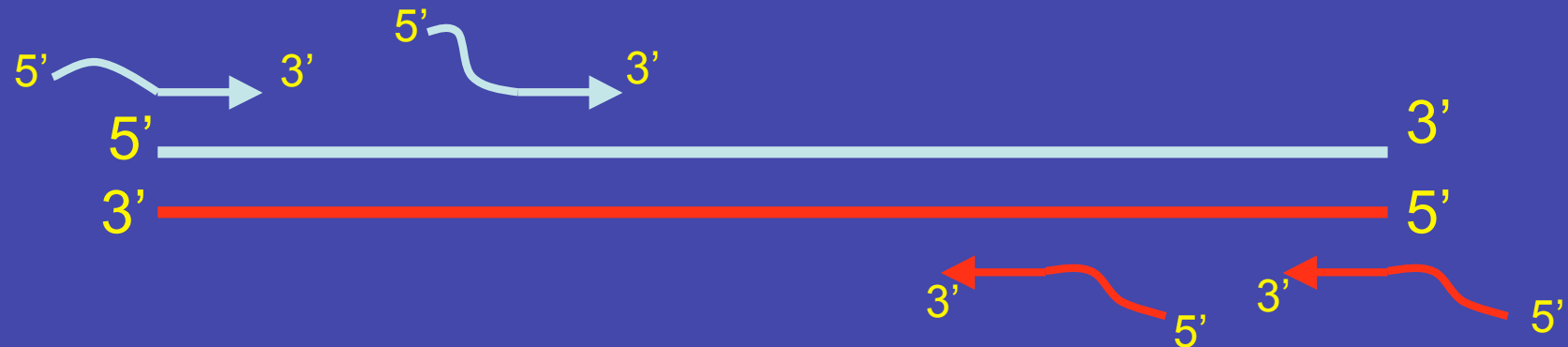
inv = primer per PCR inversa che ha due coppie di primers per poter fare una PCR nested, quelli al 5' della seq. devono essere complementary-reverse e quelli al 3' sono uguali alla sequenza stampo data

primers con code!

la regione di annealing deve essere efficiente sul 3'



se i primers hanno la coda

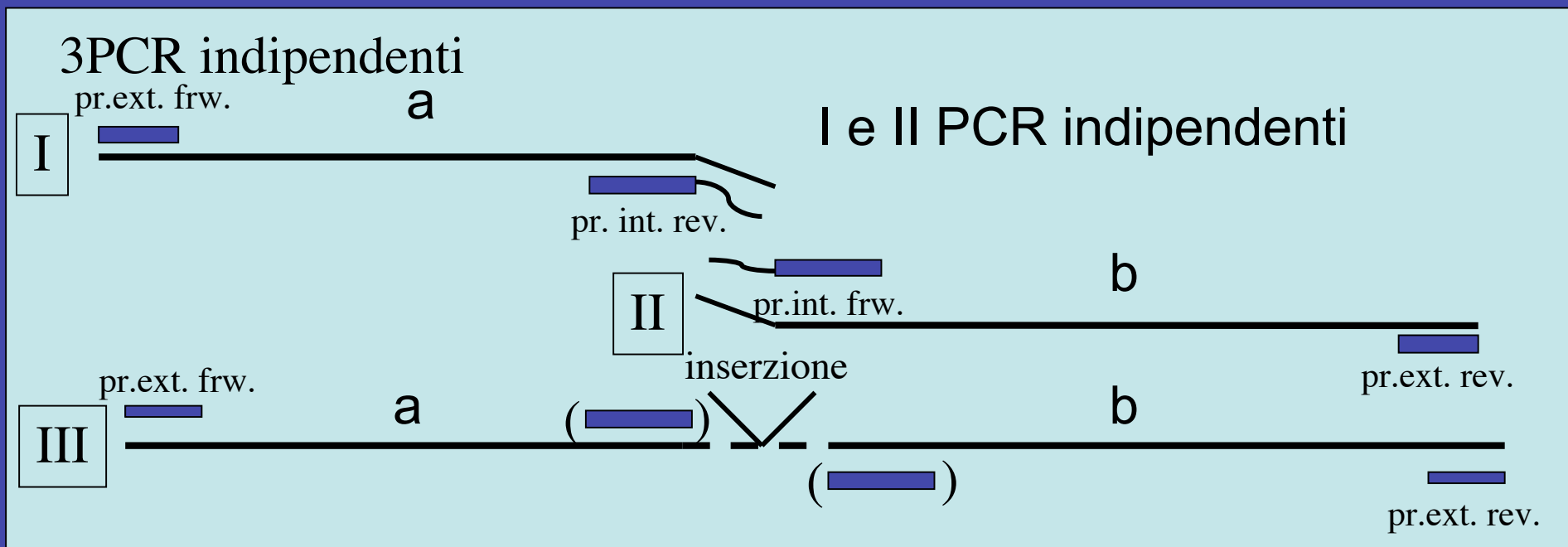
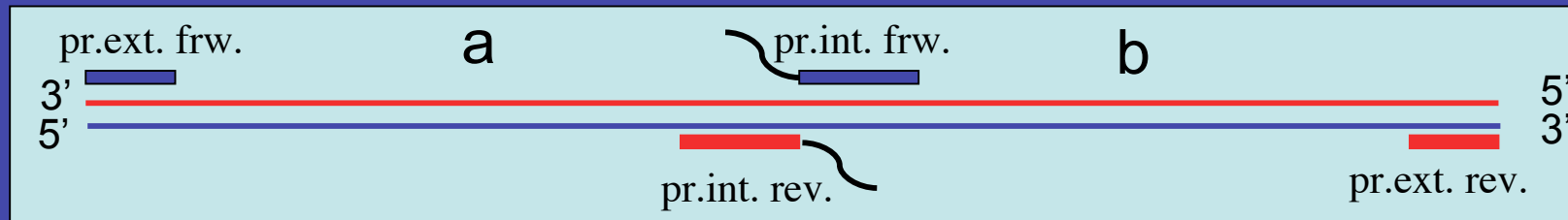


alla polimerase importa solo che il 3' sia appaiato, però la coda del primer sarà incorporato e farà parte dell'amplicone

è la stessa cosa che succede in una amplificazione aspecifica in cui solo il 3' del primer (specifico) trova omologia di sequenza e farà amplificare un prodotto non specifico

Mutagenesi tramite uso di primers modificati

Per fare avvenire una delezione o inserzione si utilizza il metodo a tre passaggi (esempio per inserzione).



per inserire la sequenza mutata nella sequenza voluta o si seleziona un ricombinante dopo trasfezione o si inserisce direttamente la sequenza mutagenizzata con enzimi di restrizione.

Mutagenesi con PCR in tre passaggi

DNA mitocondriale bovino acc. N. V00654, gi 12800 con 16338 bp

L8014 (external forward primer) 5'-ACCCATTGTCCTTGAGTTAGT-3',

H8393 (external reverse primer) 5'-GAGGGTTACAAAGCGATTGCT-3',

H8242 (internal reverse primer)

5'-GAGATCTGCCGTACAGGCCTAGAAATATTTTTGTTGGTGTTCAGT-3'

and L8283 (internal forward primer)

5'-CTAGGCCTGTACGGCAGATCTCAAAACAAAACACCCCTTGAGA-3',

III PCR per estensione della regione sovrapposta

I primers interni L8283 e H8242 hanno una coda al 3'-terminale che è stata usata per introdurre una inserzione di 22 bp (parte sottolineata nella sequenza del primer). La complementarità sta nell'inserzione tra il 3' dell'int. frw. primer ed il 5' dell'int.rev.primer

L'inserzione permette di discriminare per peso molecolare la sequenza bovina da quella del nuovo costrutto usato nella PCR competitiva come riferimento con varie diluizioni a partire da una concentrazione nota.

Il competitore sintetico è stato clonato nel vettore pBlueScript KS⁺ della ditta Stratagene (La Jolla, Ca.CA USA).

Complementarietà delle code

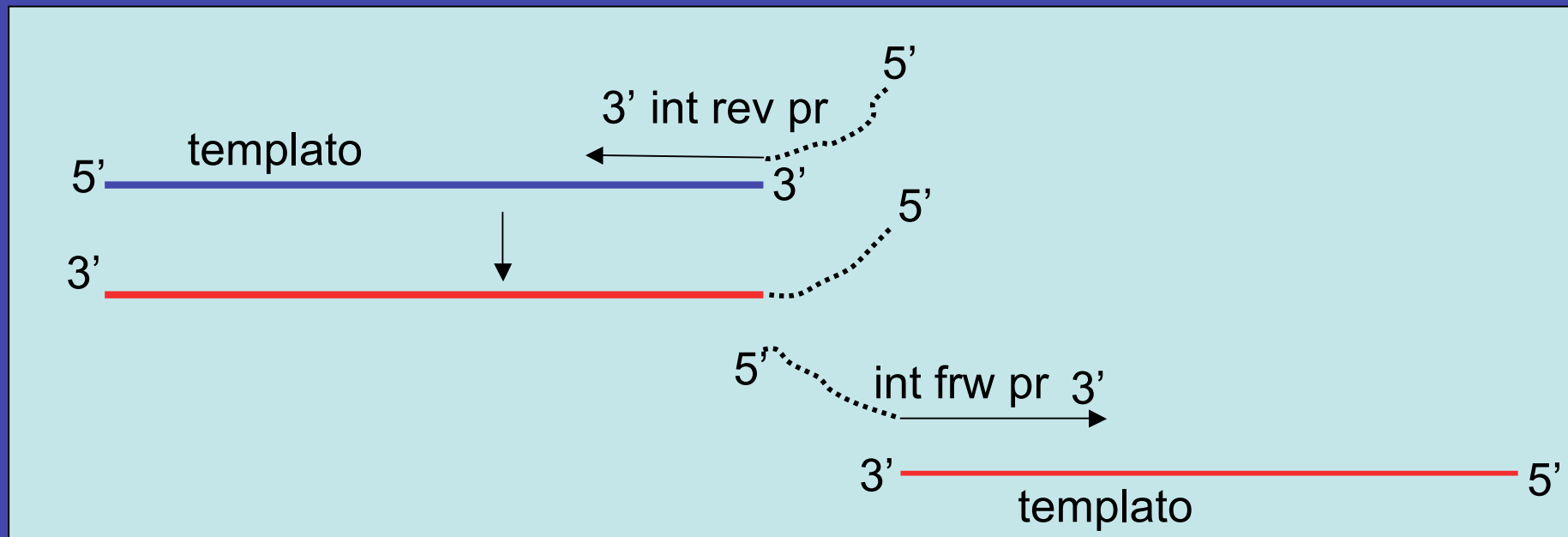
H8242 (internal reverse primer)

5'-GAGATCTGCCGTACAGGCCTAGAAATATTTTTGTTGGTGTCAGT-3'

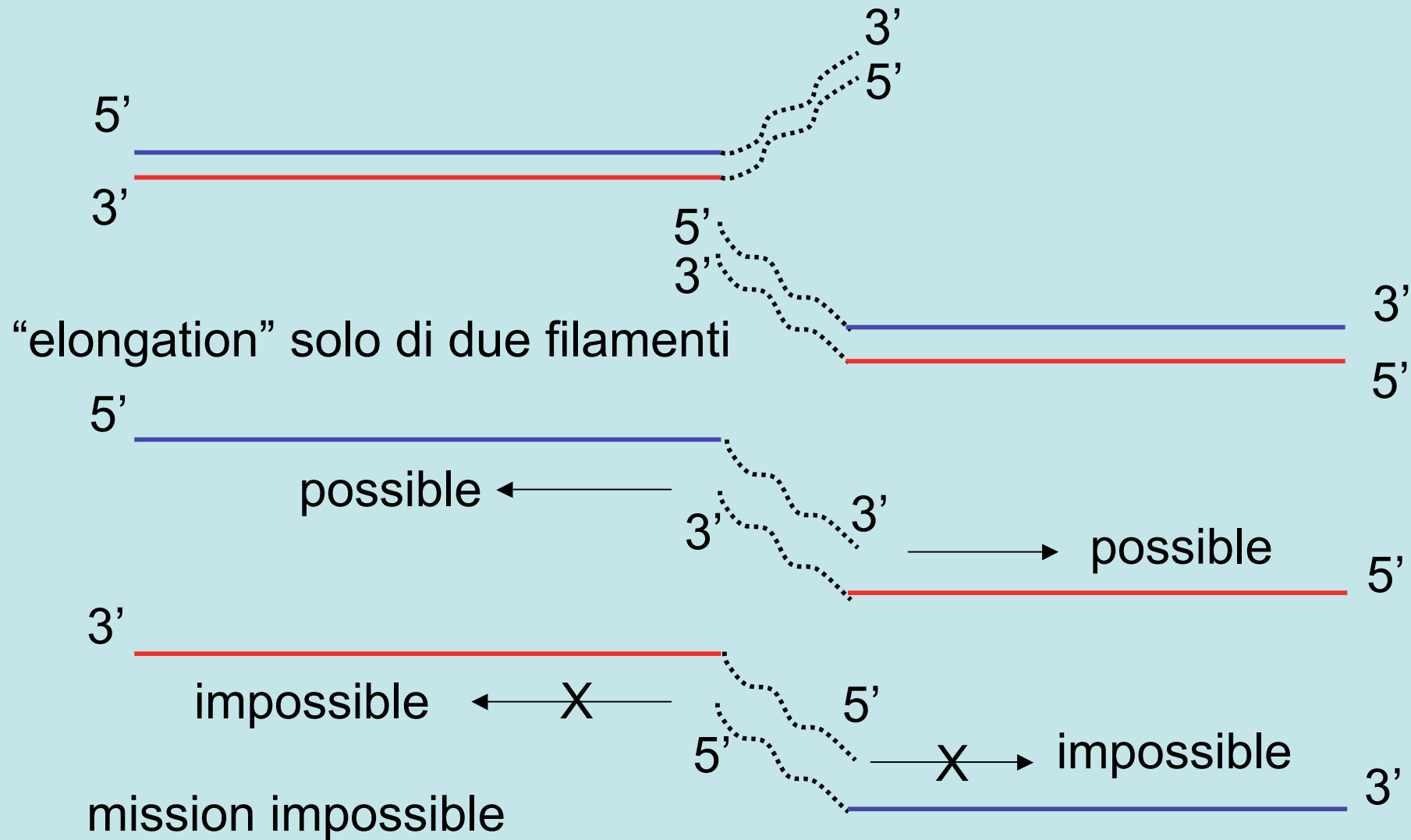
and L8283 (internal forward primer)

5'-CTAGGCCTGTACGGCAGATCTCAAAACAAAACACCCCTTGAGA-3'

coda per appaiamento seq mitoc. spec →
 5'-CTAGGCCTGTACGGCAGATCTCAAAACAAAACACCCCTTGAGA-3'
 3'TTTTATAAGATCCGGACATGCCGTCTAGAG 5'
← seq mitoc. spec

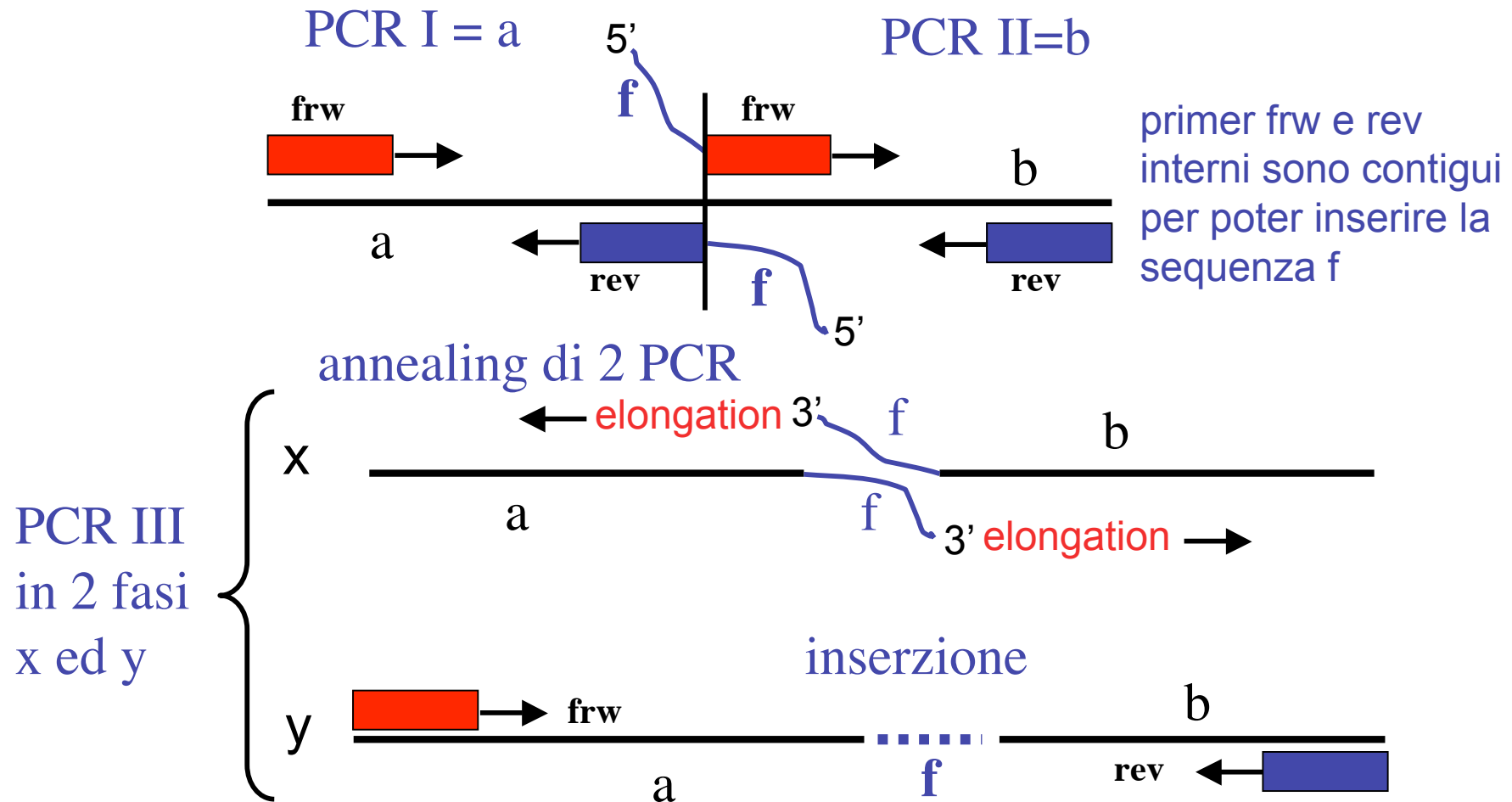


appaiamento PCR I + II



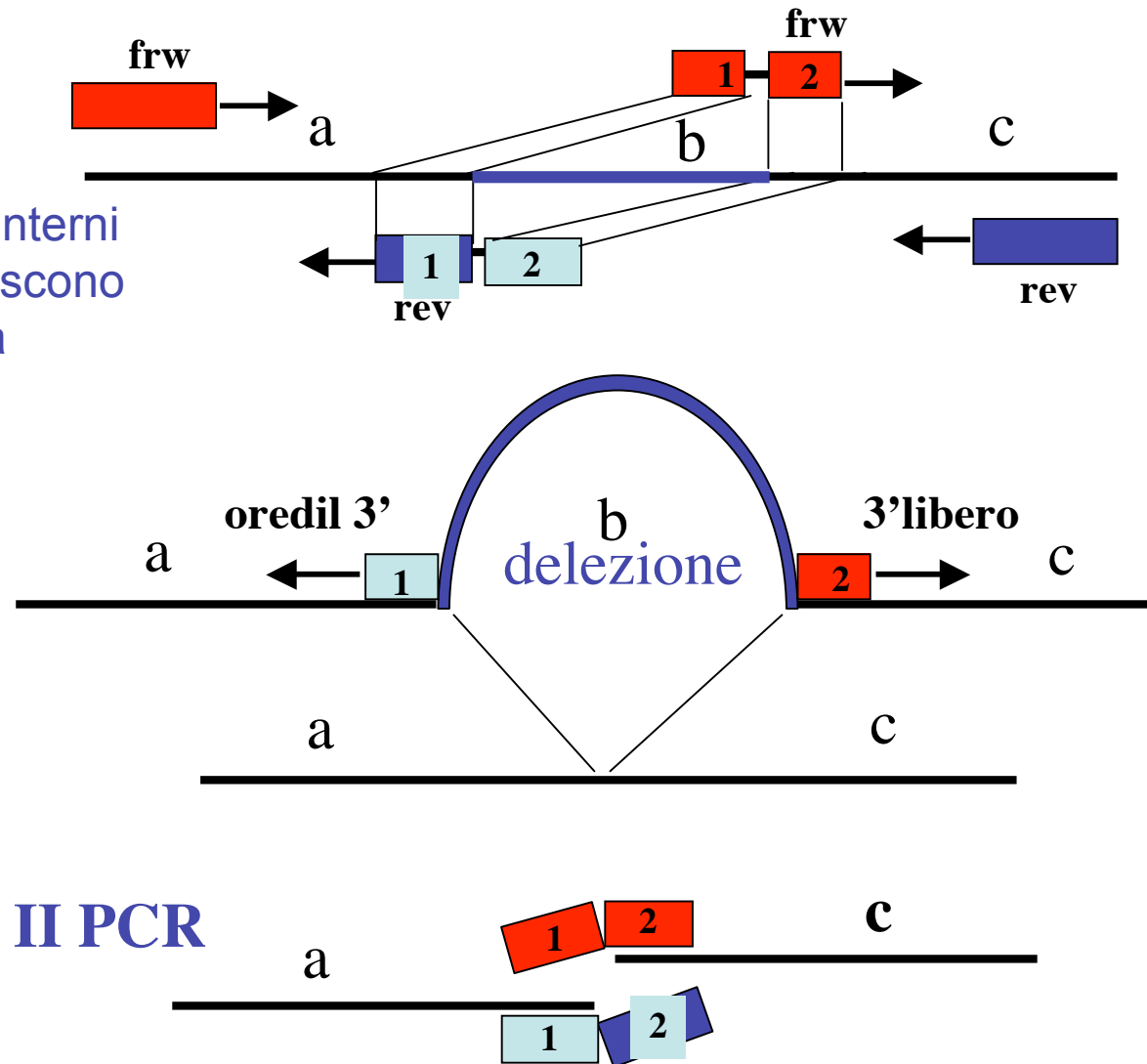
inserzione di un frammento f in un amplicone

(3 steps = 3 passaggi)



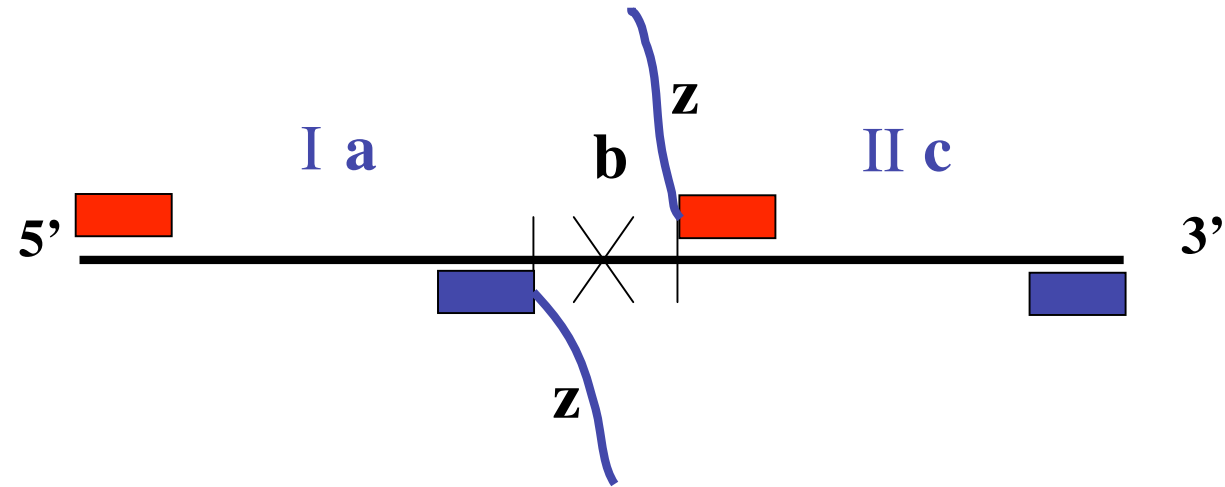
delezione di un frammento b da un amplicone

primer 1 e 2 interni
iniziano e finiscono
sui limiti della
sequenza da
deletere

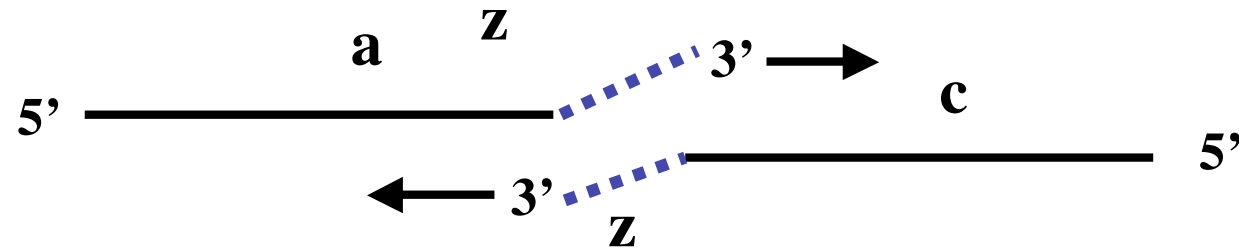


sostituzione in un amplicone in 3 passaggi

II PCR separate

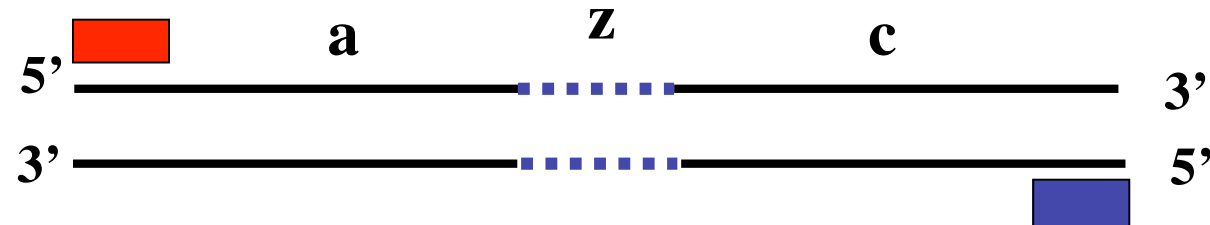


annealing II PCR
ed "extension"



III

PCR finale



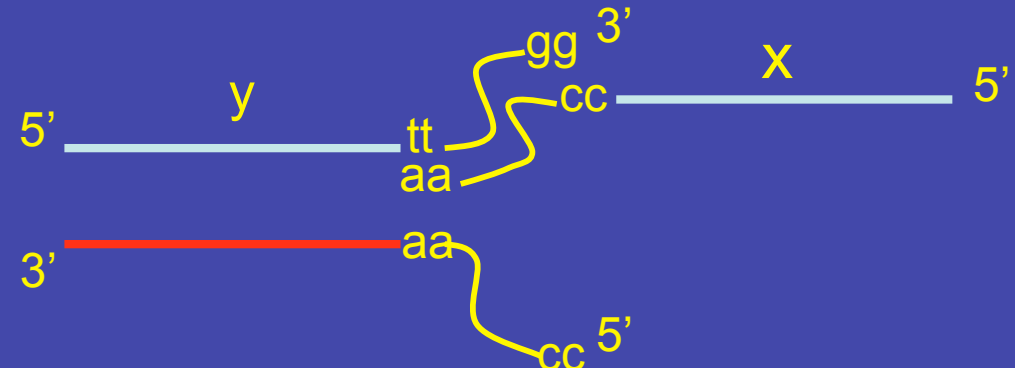
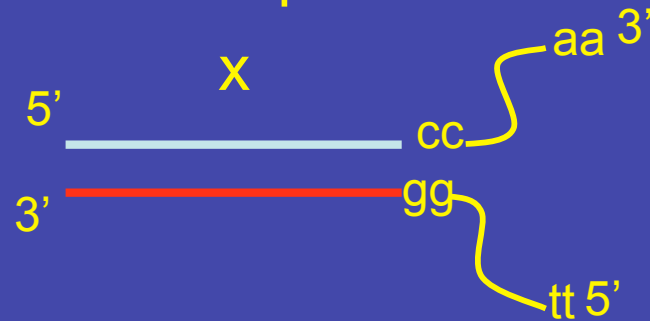
giunzione di due frammenti distanti

la procedura è la stessa di quella della delezione, la differenza consiste nella collocazione del secondo amplicone che si vuole legare al primo che può essere ovunque nel genoma, unica condizione necessaria è la presenza delle code complementari dei primers che è obbligatoria, basta scegliere quale sequenza va al 5' e quale al 3' del nuovo amplicone artificiale

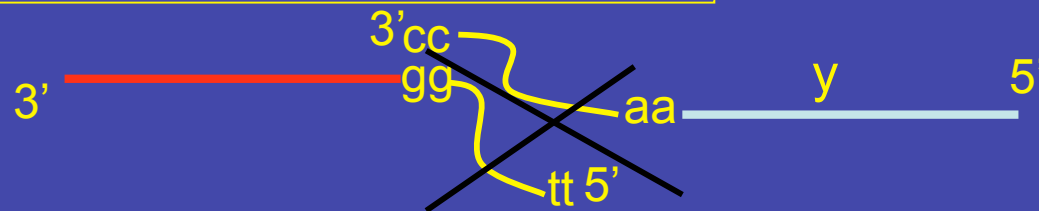


quali code sono produttive

A) code compl. rev

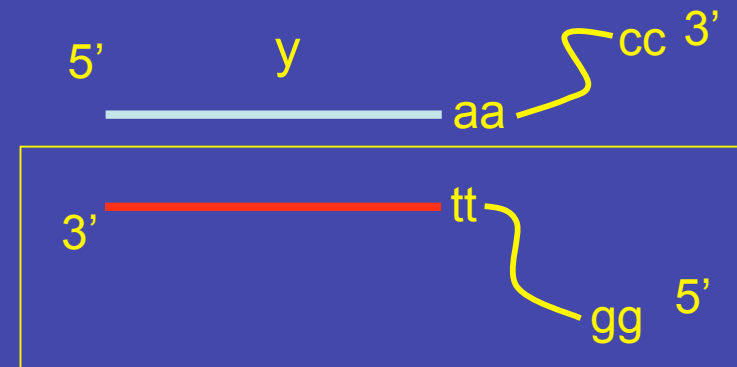


ordine del prodotto : x - y strand +/-



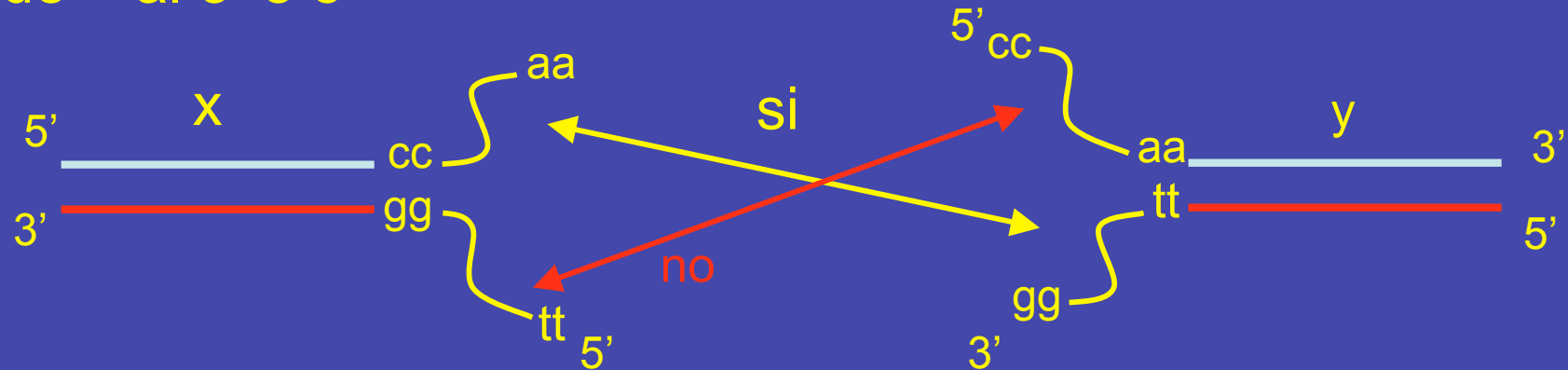
B) code rev.

perchè non funge?



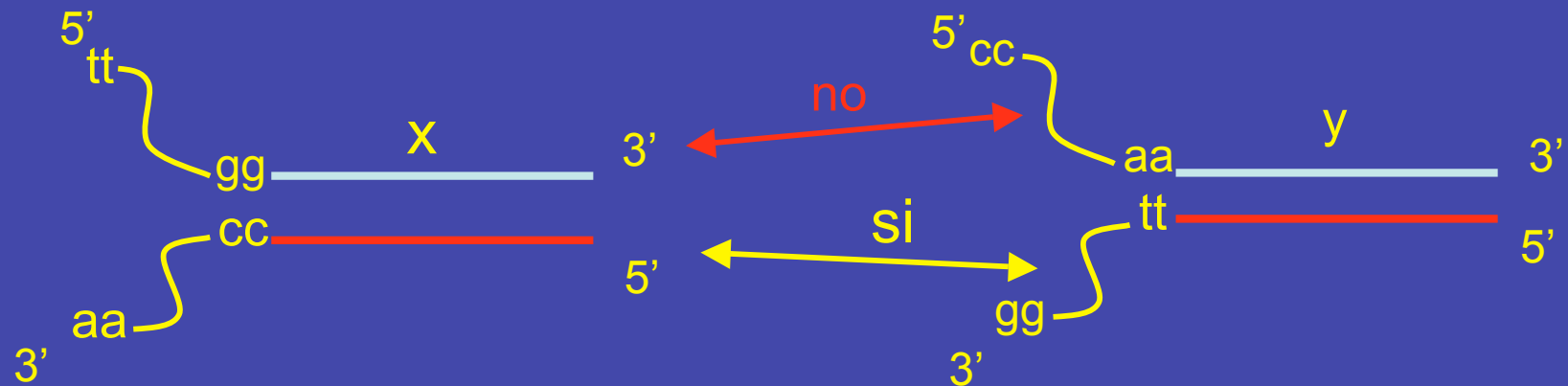
altre code

code = al 3' e 5'



verso = x - y strand +/- dirette

code invertite al 5'



verso = y - x strand +/- invertite

Applicazioni dell'ultimo metodo

Questo terzo metodo che abbiamo visto, può essere utilizzato sia per ottenere inserzioni o sostituzioni, ma anche delezioni però con l'inserzione di un nuovo frammento di lunghezza diversa, anche molto diversa per avere una regione di omologia per l'appaiamento ed "elongation". Dipende da dove si fanno partire i primers interni con la coda. In realtà si possono giuntare anche frammenti non limitrofi per costruire geni di fusione. Si possono legare esoni di geni diversi come per esempio esoni di un gene a cui attaccare la GFP o Lac Z.

riepilogo

RT-PCR

nested PCR

mutagenesi