

lezione 21 - 22

giovedì 15 aprile 2010

aula 2 ore 9:00

corso integrato di Biologia Applicata (BU)
ed Ingegneria Genetica (BCM)

ricapitolazione esercizio primers

PCR diretta = primers convergenti

primer frw = seq. strand + / primer rev = seq. strand -

PCR inversa = primers divergenti

primer al 5' della seq. nota = seq. strand -

primer al 3' della seq. nota = seq. strand +

ormai dovrebbe essere chiaro perchè

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

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 CTTTTCTCTC TCTCCTGAAG
CCTCTTGAAT AGACCTGCAG AAATACCCAA AATAGCCCTG TGGGGTGGCT 500
GAGTCATTGT GAACACAGCC CAGGTCAGGT GTTCCAGCCA GAGAACTGCT
GTTCTGAGAA ACATGCCCCA AAACCGAGAC CTGGCCAGGGT 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 tcttttgattc ctgcctcatt ctattattta tgcacctac gttcaatatt 2frw
181 acaggcgaac atacctacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata
241 acaattgaat gtctgcacag ccgctttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca
301 aacccccccc tccccccgct tctggccaca gcaactaaac acatctctgc caaaccccaa
361 aaacaaagaa ccctaacacc agcctaacca gatttcaaatt tttatcttta ggcggtatgc
421 actttttaaca gtcaccccc cactaacaca ttattttccc ctcccactcc cataactacta
481 atctcatcaa tacaaccccc gcccatccta cccagcacac acacaccgct gctaacccca
541 taccocgaac caaccaaacc ccaaagacac cccccacagt 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

la PCR per quantificare

metodi di quantificazione di ampliconi come marcatori di quantità del genoma di appartenenza

metodi assoluti e relativi

approssimazioni a campioni di riferimento

metodi a fine reazione: “end point”

- “real time” in corso di reazione

- quantitativo / competitivo

PCR quantitativa

Come si può quantificare ? Si possono determinare dei valori assoluti ?

Che metodologie si possono utilizzare ?

- PCR classica chiamata “end point” o terminale o meglio di fine* reazione (fine* inteso come finale, ultimo ciclo).

- analisi dell'amplicone dopo i cicli di fine* reazione, gel elettroforesi colorazione con Bromuro di Etidio o Cybrsafe (intercalante fluorescente del DNA, si rileva con UV) quantificazione comparativa, relativa.

- PCR “real time” o “light cycler” automatizzata con lettura del prodotto della PCR direttamente durante i cicli di amplificazione tramite lettura laser della fluorescenza corrispondente alla quantità di DNA prodotto.

quantitativa

“end point” con misurazione della fluorescenza rispetto allo stesso amplicone amplificato a partire da quantità note di DNA genomico o plasmidico in cui è clonato

le reazioni di amplificazione devono avvenire con la stessa macchina, stessi reagenti, stesse condizioni, possibilmente contemporaneamente ai campioni in analisi

Metodo real time

Differenza con PCR standard “end point”

“end point” si intende reazione a termine

Analisi dell'amplificazione in tempo reale

Tramite fluorescenza dei prodotti amplificati

Colorante fluorescente del DNA intercalante CYBRgreen

Marcatura dei primers o doppia sonda:

“FRET”; “TaqMan”; “amplifluor” brevettati.

non usa la quantificazione a fine reazione,

sicuramente più precisa e più rapida,

non ha bisogno di elettroforesi

però di un campione di riferimento quantificato

PCR quantitativa

Real Time e Light cyclers

1 PCR quantitativa

- quantificazione non “end point” ma in fase logaritmica
- non arriva a saturazione.
- assioma: proporzionalità della quantità amplificata a quella iniziale
- ad ogni ciclo (dal punto di superamento del sottofondo-background) un raddoppio ed in 3,2 cicli si avvicinerà ad 1 log.
- questo metodo assume che si possa confrontare l'amplificazione del DNA di un campione di controllo a varie diluizioni col nostro campione in esame.
- Se vi ricordate con il saggio Northern si normalizza rispetto ad un mRNA “house keeping” per poter fare un confronto
- con questo metodo si quantifica con una curva standard.

Real time e Light cyclers metodo e principi

Confronto plausibile se è standard il sistema di estrazione dei campioni sempre dalla stessa matrice (per es. sangue come nel caso di determinazione di viremia o di livello di infezione da HIV o di qualunque altro patogeno).

- esistono sistemi robotizzati di estrazione da sangue e di PCR successiva.
- con estrazione automatica ed il tipo di campione costante il confronto tra PCR è plausibile (conc linfociti costante).
- determinazione dei valori di varie diluizioni note dell'amplicone con i quali si costruisce una curva standard di riferimento.
- Un algoritmo misura il rapporto tra incremento di fluorescenza e n. dei cicli
- confronto rispetto alla curva standard = concentrazione

Assunzioni e possibilità di errore

- confronto tra quantità di DNA di due PCR diverse
- assunzione che le reazioni avvengano in maniera assolutamente ripetibile,
- campioni confrontati sono estratti dalla stessa matrice o:
- efficienze di estrazione del DNA uguali nei due campioni
- DNA estratti con la stessa efficienza e protocollo

Meglio se il metodo di estrazione è automatizzato e sempre sulla stessa matrice.

Con questa premessa si può assumere che il confronto con una curva standard sia plausibile. Tutto al più se c'è un errore questo si ripercuoterà su tutti i campioni in quanto sono estratti e amplificati tutti nelle stesse condizioni automatiche. Se il metodo è manuale ogni analisi deve essere fatta in triplicato e valutato l'errore standard.

Calcolo della concentrazione

La concentrazione del campione viene valutata interpolando il punto di inizio della fase logaritmica dell' amplificazione determinato come il punto in cui lo strumento riesce a stabilire un aumento sopra al "background" confrontandolo con i punti della curva standard di riferimento.

La curva standard avrà delle amplificazioni di circa tre cicli di differenza per ogni log di diluizione. Se all'interno di questi valori casca il punto di inizio della fase log. del campione, si può ricavare il valore della concentrazione dell'amplicone nel campione (come per esempio il virus nel sangue).

Di solito è lo strumento che ha un algoritmo che fa il confronto con la curva standard che si è determinata, sta all'operatore vedere se il valore è interno o esterno alla curva medesima e valutare se acquisire il dato o ripetere la PCR con un'altra quantità di DNA adeguata.

Come funziona il metodo di determinazione a fluorescenza

Sia il metodo Real time che Light Cycler funzionano con la determinazione diretta del DNA reso fluorescente o con colorazione aspecifica (SYBRgreen) o con primer fluorescente o con sonda fluorescente.

I due metodi si basano su sistemi chimici diversi.

Il meccanismo "Real time" (applied biosystems AB) non è diverso da un normale termociclatore (provette con 30-50 μ l) salvo il laser che legge l'assorbanza nei vari pozzetti con le provette, dovuta alla conc del DNA alla lunghezza d'onda della fluorescenza (nel visibile).

Il meccanismo "Light Cycler" (Roche) è in provetta capillare (20 μ l totale) in un rotore in cui il lettore laser sta fisso rispetto a quello AB in cui si sposta per leggere nelle varie provette la concentrazione.

Principio del funzionamento real-time

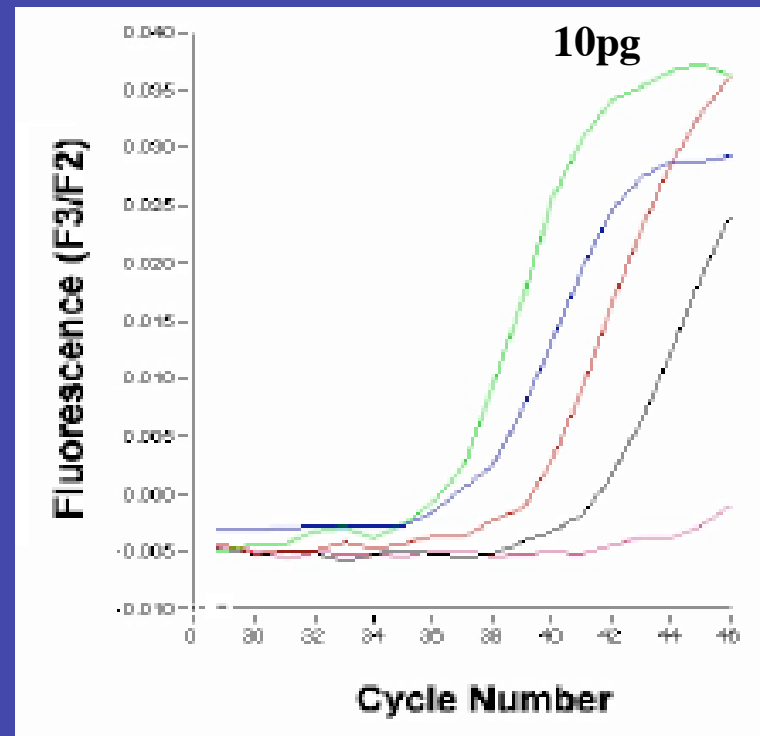
Analisi dell'amplificazione ad ogni ciclo
lettura laser della fluorescenza (qualunque metodo)

Soglia di superamento rumore di fondo

Inizio crescita log macchina
tra 35-40 cicli

Curva sigmoide
Effetto inibiz.

determinazione
di sensibilità
del metodo



1pg

5pg

0.5pg

no DNA

crescita logaritmica

2-4-8-16-32-64-128-256-512-1024-

10-20-40-80-160-320-640-1280-2560-5120

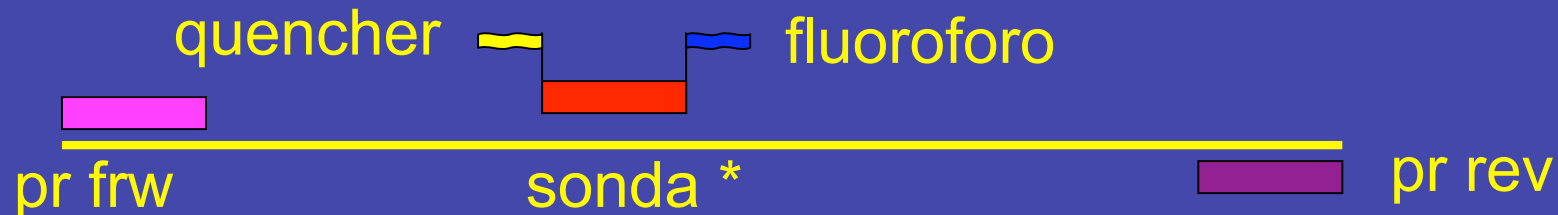
in 10 cicli da 2 ng a 1 microgrammo

da 10 ng a 5 microgrammi

La chimica dei metodi fluorescenti

Fluorescenza aspecifica con SYBRgreen (intercalante)

Fluorescenza specifica sonda taqman Appl Biosyst
(quencher e attività eso-nucleasica della TAQ)



Fluorescenza con enhancer doppia sonda (Roche) FRET

