

# Lezione 23 - 24

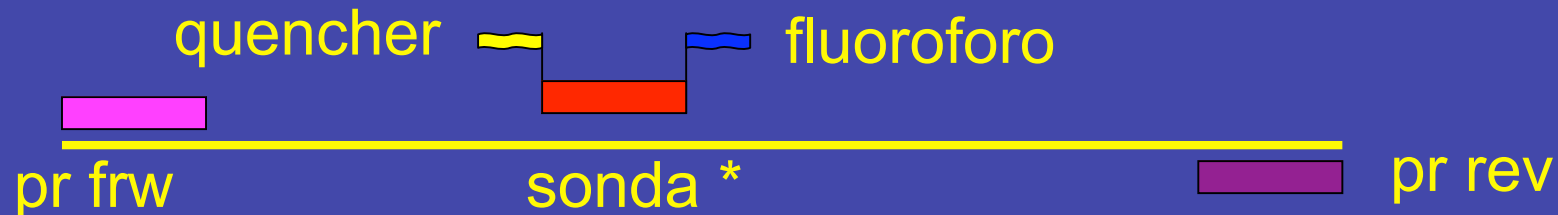
Martedì 20 Aprile 2010

corso integrato di Biologia Applicata BU  
e Ingegneria Genetica BCM

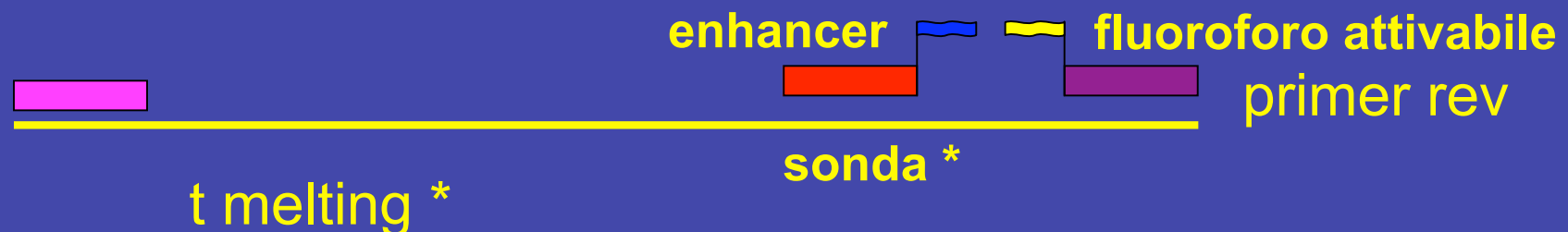
# La chimica dei metodi fluorescenti

Fluorescenza aspecifica con SYBRgreen (intercalante)

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



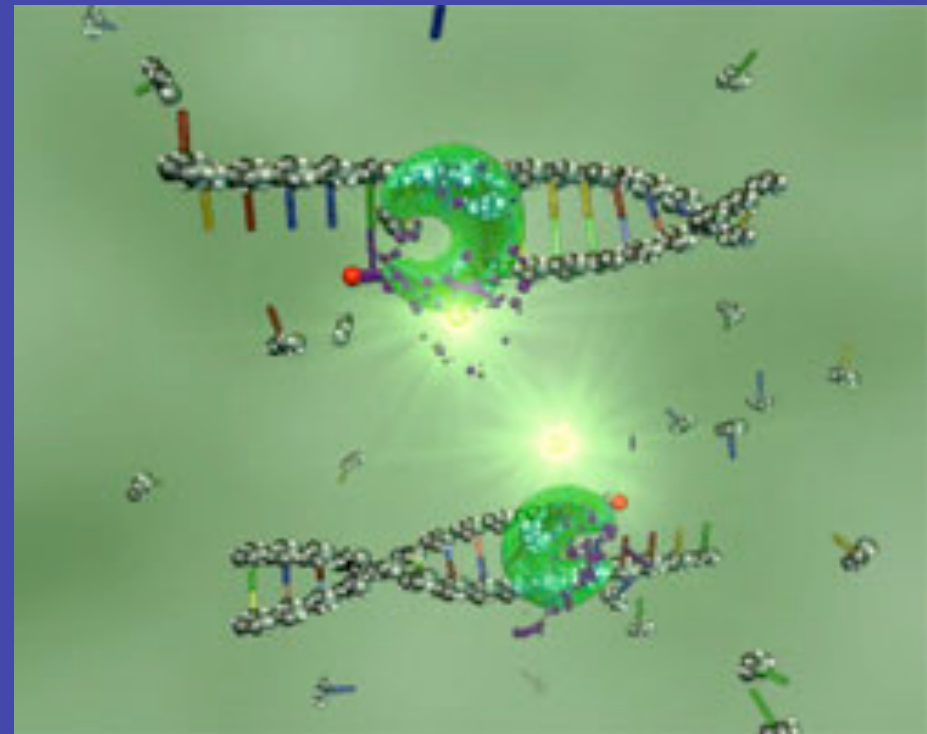
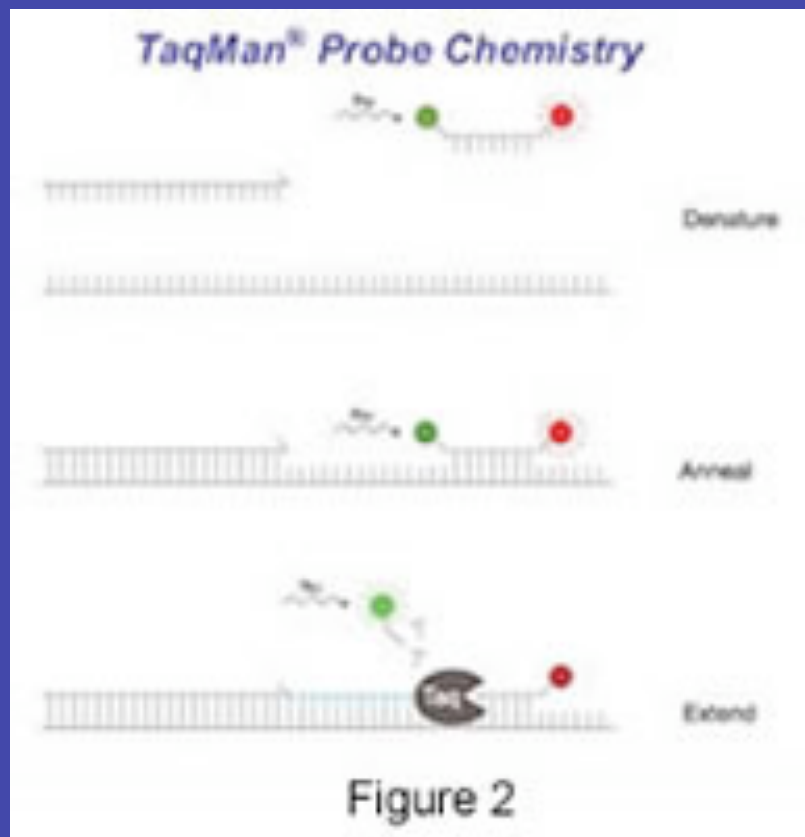
Fluorescenza con enhancer doppia sonda (Roche) FRET



# Metodo Taqman

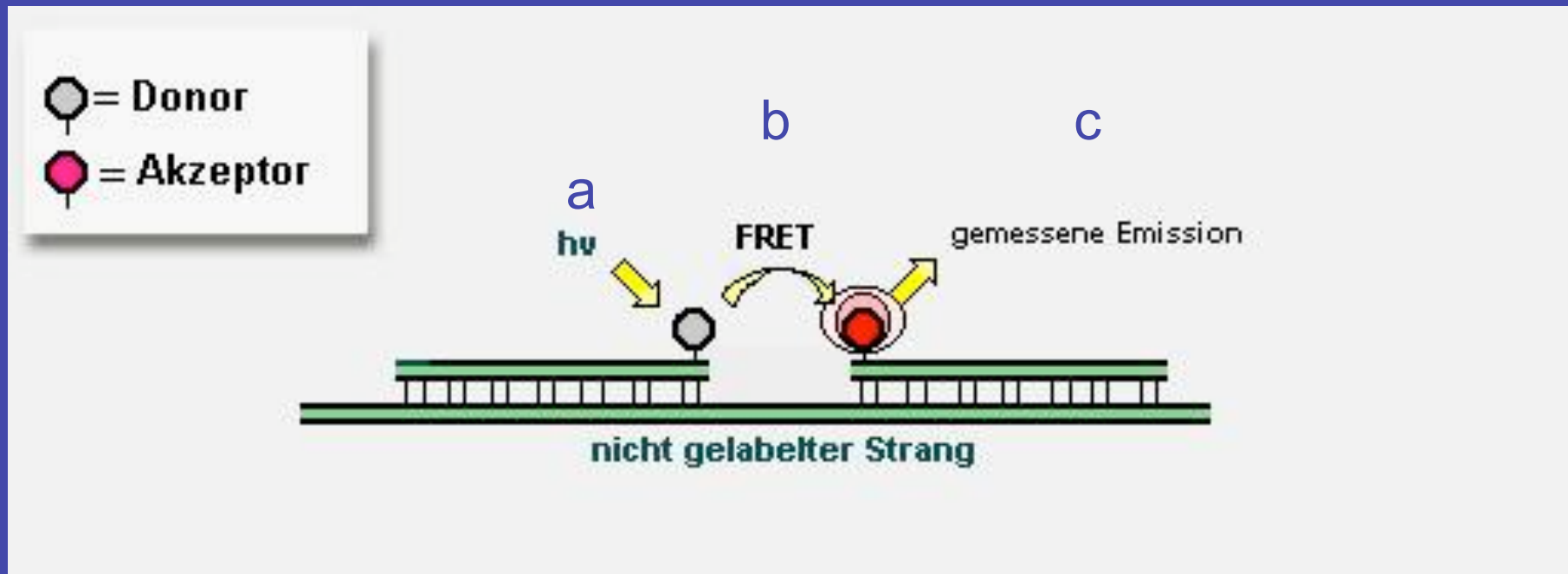
TaqMan probes are oligonucleotides that contain a fluorescent dye on the 5' base (typically) and a quenching dye on the 3' end.

Taq esonucleasi idrolizza il quencher, fluoroforo emette



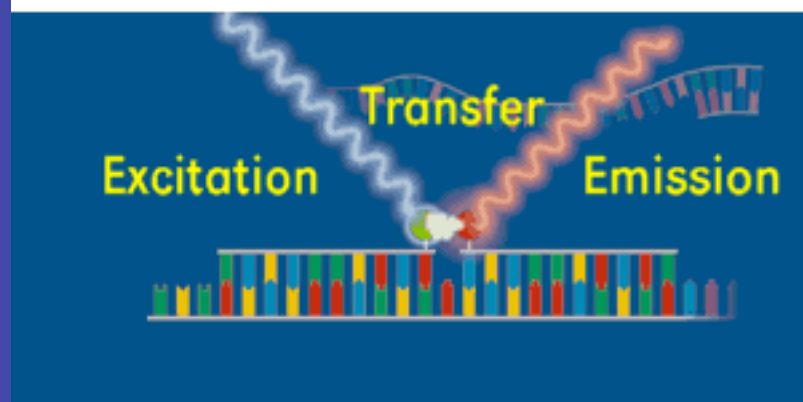
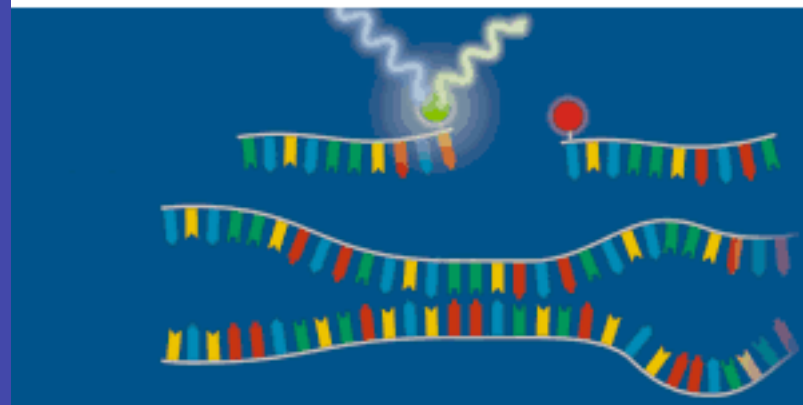
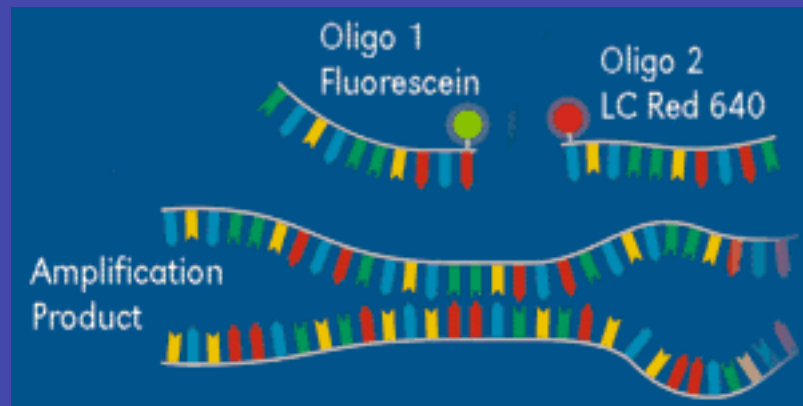
# Metodo FRET

fluorescence resonance energy transfer



a, eccitazione - b, passaggio di energia - c, emissione  
eccitazione a x nm; emissione ad y nm

# ancora FRET



Se si amplificano due ampliconi

La melting curve lo mostra

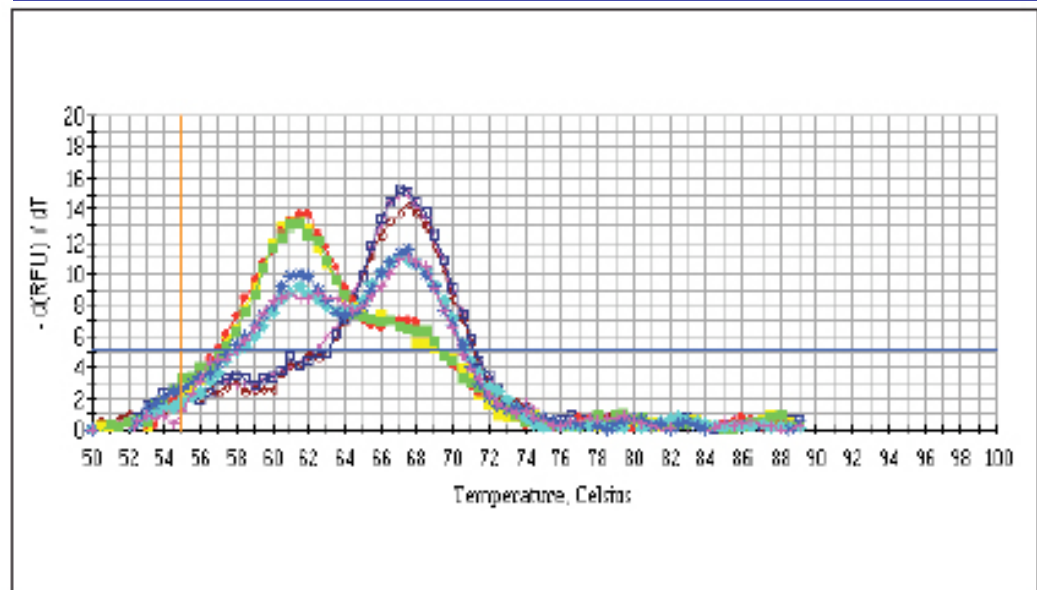
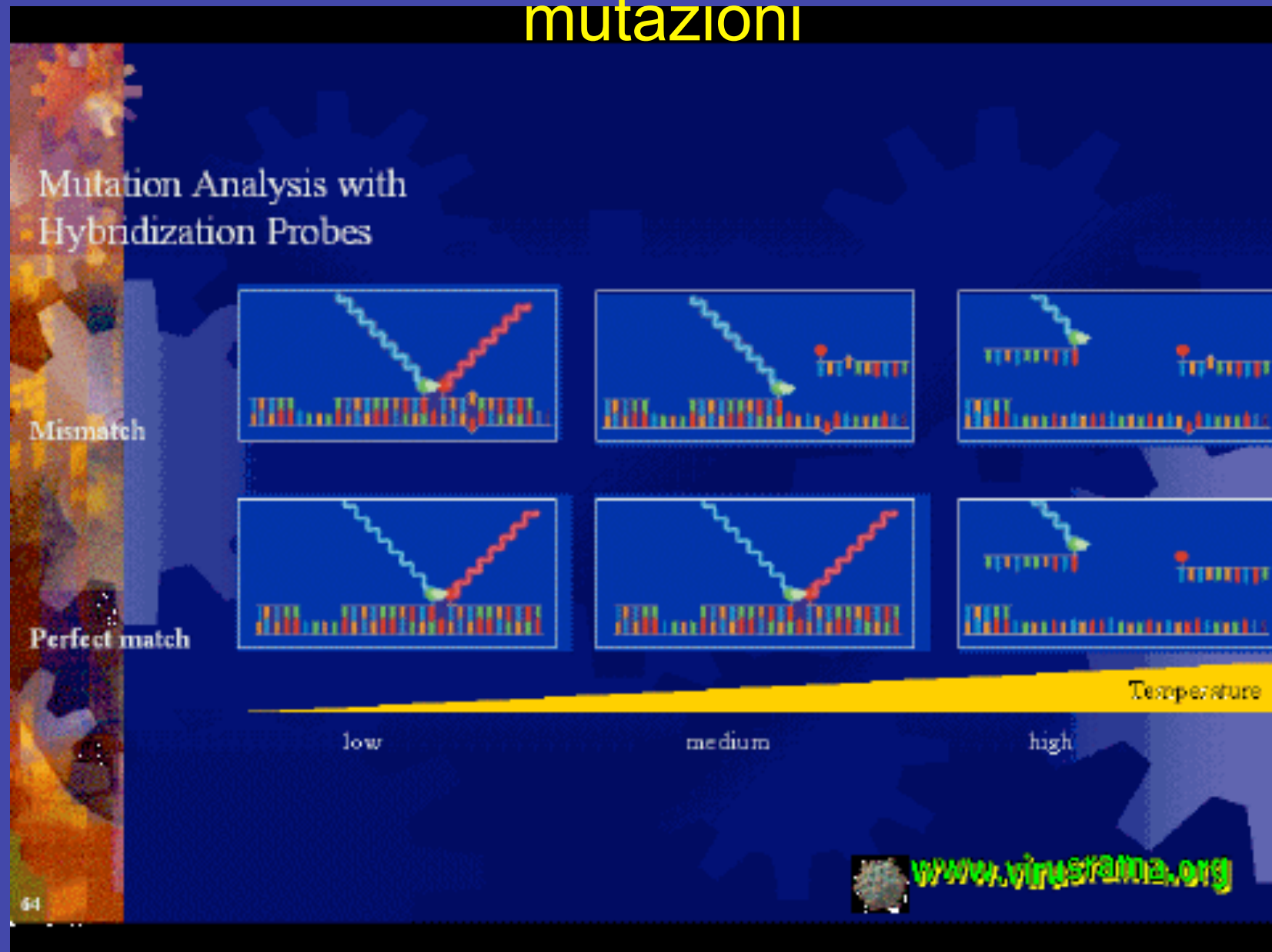


Fig. 1. Melt-curve plot of all samples.

# altra applicazione FRET x polimorfismi o mutazioni



# quali sono i controlli necessari

ripetizione e richiamo per domande o dubbi:

## PCR

- controllo negativo dei reagenti (non contaminati)
- controllo negativo di estrazione (assenza di contaminazione)
- controllo positivo (primers e protocollo di amplificabilità)
- controllo positivo dei campioni (amplificabilità di altri ampliconi)

## RT-PCR      oltre a quelli della PCR classica

- mancanza di DNA genomico (assenza di amplificazione senza reverse trascrittasi)
- controllo positivo con altri ampliconi di geni house-keeping
- nella PCR competitiva e quantitativa: ripetibilità e effetto dose-diluizione (linearità tra diluiz., quantità finale e/o n. di cicli)

# Calcolo della concentrazione

Concentrazione del campione valutata interpolando “l’inizio di fase logaritmica” di amplificazione determinato come il punto in cui lo strumento vede aumento costante sul “background” (crossing-point) e confronta con i punti della curva standard di riferimento.

Fase logaritmica virtuale e che esiste anche in fase precedente (quando lo strumento non ha la sensibilità per determinarla) e successiva (se non mancano i reagenti e se non c'è inibizione da troppo DNA)

La fase logaritmica che osserva lo strumento è quella in cui la crescita della conc. del DNA è direttamente proporzionale al n. di cicli della PCR. A poco più di tre cicli si ha un aumento di 10 volte della conc. dell'amplicone.

Quando non supera il background di Il background di fondo non è eliminabile, si può diminuire.

# metodo di analisi quantitativa

La curva standard di riferimento avrà delle amplificazioni a 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 la conc. di 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 con un'altra diluizione.

# concentrazione e numero di cicli

quando la PCR è ben calibrata  
il protocollo ben ripetibile  
si possono fare dei confronti quantitativi

il calibratore è il DNA dell'amplicone a concentrazione nota

la curva di riferimento = assunzione che il metodo sia ripetibile  
(si esegue col calibratore)

II assunzione = amplificazione proporzionale alla conc.  
iniziale del DNA

III assunzione = il numero di cicli per superare il "background"  
è proporzionale alla quantità iniziale

# il numero di cicli e relatività

il numero di cicli per superare il livello di background varia con la concentrazione iniziale, ma anche con i diversi protocolli

ogni amplicone è una storia a se ed ha la sua curva standard

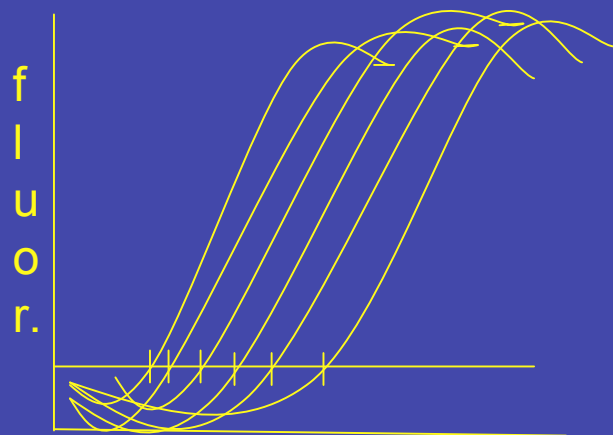
però con le diluizioni successive si riesce a trovare empiricamente linearità tra diluizione e numero di cicli

trovata la linearità tra diluizioni e numero di cicli:

i numeri dei cicli necessari a superare il background corrispondono ad una concentrazione di DNA “teoricamente uguale” a quella del calibratore

# 1 log per ~3.3 cicli

Crescita a esponente 2      ogni tre,tre cicli 10 x incremento



n. cicli

ct crossing treshold

Ascissa n. cicli / ordinata fluorescenza

Intercetta col “cut off” background =  
punto inizio log phase determinabile

La conc. Misurata con una curva standard  
di riferimento  $x =$  condizioni

# PCR competitiva

competitore ottenuto con mutagenesi tramite PCR di un amplicone a seconda delle esigenze.

Per poter fare un competitore dobbiamo sapere per cosa lo dobbiamo usare, se per PCR classica o se per “Real Time - LC.

- inserzione di un frammento all'interno di un amplicone
- si ottiene un competitore con peso molecolare diverso dal frammento w.t. con sostituzione di una sequenza

La sequenza esogena inserita non deve avere omologie con il genoma e si utilizza come target della sonda per la quantificazione “Real Time - LC” oppure per discriminarla su gel.

# Primers con la coda (3' o 5')

Riguardiamo come si fa mutagenesi di un amplicone

I primers con la coda si usano per creare omologie tra sequenze e favorire appaiamenti tra ampliconi diversi, bada al 5' o 3'!

|          |                                    |
|----------|------------------------------------|
| SA2.5-A2 | ggccggtaccGGATCCCGGTTCCTGATCACTG   |
| SA2.1-A2 | ggccggtaccCTTCCTGCCAACCTGGGGGCTG   |
| SA2.5A   | ggccacgcgtGGATCCCGGTTCCTGATCACTG   |
| SA2.6A   | ggccacgcgtCCACAGTCACTGCCAGATGCTC   |
| SA2.1A   | ggccacgcgtCTTCCTGCCAACCTGGGGGCTG   |
| SA2.2B   | ggccacgcgtGGCTTTTGCCAGTCCTCCTAC    |
| SA.8A    | ggccacgcgtCGCTCGCTGCCCCACTCAGGAGG  |
| SA.9B    | ggccacgcgtCTCCTAGCAGGGTCTCCTCCCTGG |

A cosa possono servire delle code ?

Se devo fare una mutagenesi posso adoperarle ? In che modo ?

Come devono essere le code ? Quali requisiti devono avere ?

Cerchiamo dove mappano a quali geni appartengono ?

# PCR competitiva “end point”

Quantificazione:

confronto amplicone / competitore

- valore relativo non assoluto

fluorescenza osservata su gel con Et.Br.(bromuro di etidio)

- diverso peso molecolare oppure su “Real time” con sequenza interna diversa riconoscibile da sonda specifica

- competitore amplificato nella stessa reazione (fisicamente nella stessa provetta)

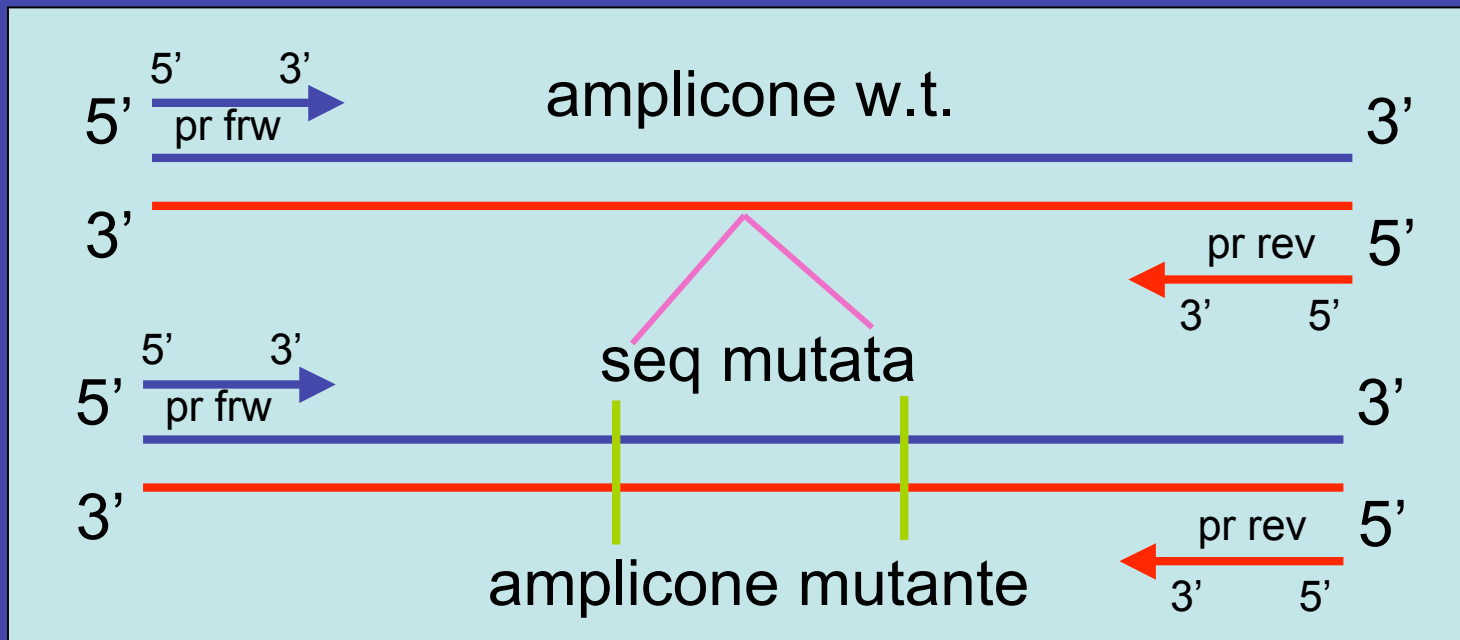
- la quantificazione relativa misurata col rapporto tra la conc. (fluorescenza-luminanza) dell'amplicone e del competitore

- determinazione da un numero ampio di diluizioni note del competitore, mantenendo costante la quantità di DNA del campione da quantificare.

# Come si fa la PCR competitiva

Perchè competitiva

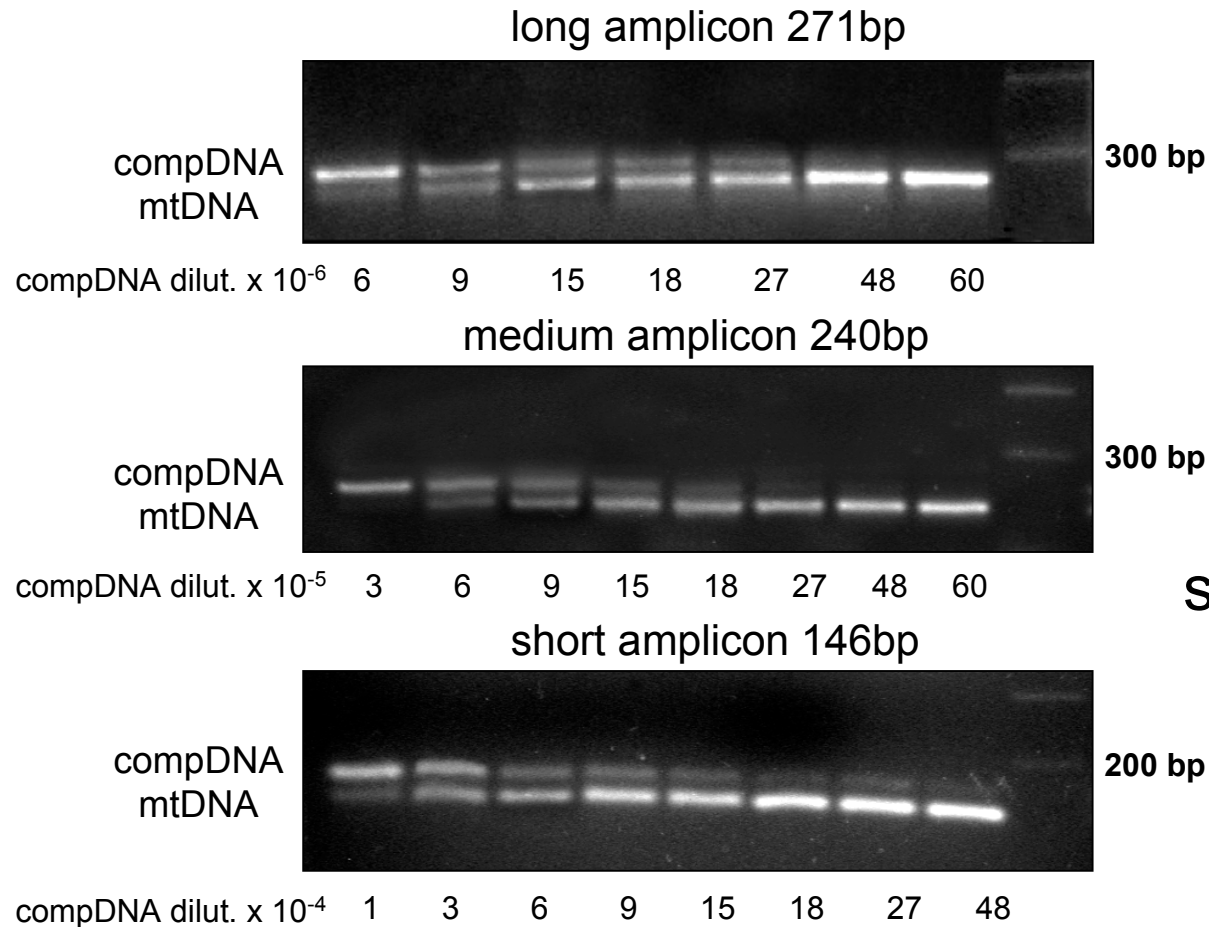
- analisi della concentrazione del competitore e dell'amplicone
- le due sequenze competono per i primers
- Perché competono ?
- come è fatto il competitore ? È un “mutante dell'amplicone” per inserzione, mutaz. con PCR a 3 passaggi (vedi lez.15-16)



# Procedura competitiva

- reazione col DNA del campione in analisi ed il DNA del competitore.
- primers in comune amplificano i due diversi ampliconi.
- almeno 5 reazioni con 5 diluizioni del competitore e stessa concentrazione del DNA in analisi.
- In ogni provetta la quantità di DNA amplificata sarà proporzionale alla quantità iniziale del DNA dei due templati aggiunti alla reazione: il competitore ed il wt.
- competitore a concentrazione nota
- PCR messa a punto per assenza di amplificati spuri

# gel PCR competitiva end point



Confronta le  
concentrazioni del  
competitore nei tre  
diversi esempi.  
Come si interpreta?

si tratta di PCR nested

Come mai cambia il peso  
anche del competitore ?