

# Lezione 9 - 10

## martedì 23 Marzo 2010

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

# rendere familiare la PCR

memorizzare i termini dei componenti  
i reagenti e le sostanze, le condizioni e le specificità

attraverso esempi e tipi di applicazione si possono capire le  
potenzialità del metodo, le modifiche possibili ed i campi di  
applicazione.

soprattutto si deve conoscere approfonditamente come  
applicare il metodo alle proprie esigenze ed ottimizzare le  
condizioni sperimentali

capire quali sono i controlli essenziali per stare al riparo di  
errori, risultati falsi positivi o negativi, strategie operative utili

## Le componenti per la reazione:

**Volume di reazione:** da 10 a 50  $\mu\text{l}$  (max 100  $\mu\text{l}$ ) per una preparativa.

**Il DNA (templato)**, abbastanza pulito, non deve essere purissimo, la quantità può essere molto poca, normalmente si usano 10-100 ng di un genoma eucariotico, più di 500 ng possono inibire la reazione

**La Taq** polimerasi, DNA polimerasi di “thermophilic eubacterium thermus aquaticus” resiste a  $95^\circ$ , frequenza di errore superiore a quelle di eucarioti,  $26 \times 10^{-6}$ , ora ce ne sono per diverse finalità, a basso tasso di errore = high fidelity  $8.5 \times 10^{-6}$ , e per frammenti lunghi genomici. Se ne usa da meno di 1U fino a 5 U, ma se si fanno molti cicli conviene spezzare la reazione in due fasi e riaggiungerla

**dNTPs:** conc. standard 100  $\mu\text{M}$  per ognuno

**Il tampone:** sale di Tris, il Mg concentrazione empirica tra 0.5 mM e 4.5 mM, ogni Taq pol. ha un tampone con concentrazioni saline (buffer) ideali

**I primers:** scelti per funzionare in coppia, evitare GC ed AT finali, palindromi, sequenze complementari, devono avere  $T_m$ (melting) simili,

**H<sub>2</sub>O** q.b. sterile incontaminata per arrivare al volume finale

# Fasi del ciclo, passaggi



**I denaturazione**, a 94°- 95°C, il Tempo a seconda della lunghezza del frammento da amplificare. Prima del I ciclo si tiene a 95°C per qualche min. per la denaturazione completa del DNA templato genomico. Cicli successivi meno si tiene ad alta temperatura e meno si compromette l'attività della Taq. Polimerasi 92°- 96°

**II Temp. di “annealing”** (appaiamento dei primers) Dipende dalla lunghezza dei primers e dal contenuto in GC/AT (~3 gradi GC/ ~2 gradi AT) dipende anche dalla concentrazione salina di NaCl e dal pH, ci sono programmi che la calcolano con un algoritmo. La conc. finale dei primers di solito è 15 pmoli. La temperatura si tiene circa 4-10 gradi sotto la TM (Temp.Melting = 100% di denaturaz.)

**III Extension**, temperatura ottimale di sintesi della Taq polimerasi 72°C. Si usa ~1 unità di enzima per reazione, se il frammento è corto se ne può usare 1/2; se il frammento è lungo e il ciclo è lungo o ci sono molti cicli, si usano più unità. Si può spezzare la reazione in due e riaggiungere Taq. Alcune Taq sono più attive vanno calibrate. Volume aggiunto < 1/10 la soluz. della Taq contiene glicerolo anticongelante

# Tempi di ogni passaggio (tipo di termociclatore)

**I passaggio:** denaturazione iniziale, una sola volta per tutta la reazione da 3' a 10' a 94°-95° secondo la lunghezza del frammento.

**Ad ogni ciclo:** denaturazione a 94°C 15''- 45'' anche questa a seconda della lunghezza e dalla % GC/AT

**II passaggio:** annealing dei primers secondo la TM tenendo la temp. 4°-10° al di sotto della TM si sceglie la temp. ottimale in modo sperimentale aggiustandola in modo da evitare amplificazione di frammenti aspecifici.

La durata di questo passaggio può variare da 15'' ad 1 minuto (può dipendere anche dalla velocità dello strumento a far variare la temperatura della piastra porta provette (velocità di rampa).

**III passaggio:** sintesi del DNA a partire dai due primers (extension), la temp. è di solito 72°C. La durata può essere di 15'' fino ad 10 minuti se il frammento supera le 5 kb fino a 20kb. La temp. può essere più alta (max. 75°C) o più bassa. Se non ci sono frammenti aspecifici, si può unificare con la fase di annealing e il ciclo sarà di due fasi anche 64°- 68°C.

# Conclusioni:

Ogni PCR va aggiustata empiricamente per:

La quantita' di DNA templatato di partenza (quando si può)

La conc. del MgCl standard a 1.5mM (tra 0.5 - 4.5mM)

La conc. dei primers standard 15pmoli

La conc. dei dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) da 50mM a 200mM  
per sequenze molto lunghe o molto DNA da sintetizzare

Il volume di reazione di solito varia tra 15 e 100  $\mu$  a seconda della  
quantita' finale di DNA che vogliamo o dello strumento, per PCR  
preparative il volume puo' essere maggiore (però piu' lento a scaldarsi)

I tempi delle varie fasi (passaggi) dei cicli dipendono anche dal tipo di  
macchina\* che si usa, dal tipo di provette e dal volume di reaz.

Se e' moderna\* e rapida nel passaggio da una temperatura ad un'altra  
delle tre temperature della reazione, si accorciano i tempi del ciclo.

# controlli

Controlli, negativi, positivi,

Rischio contaminazione

quale è il controllo negativo?

quale il controllo positivo?

a cosa servono?

vanno fatti per ogni reazione?

# da “*elongation*” a PCR

il problema dei primers e del loro orientamento si risolve se si immagina di dover sintetizzare (come in una reazione di *elongation*) due frammenti di DNA che in vece di essere indipendenti sono complementari. Ma la scelta di ognuno dei due primers dipende dal filamento che si deve sintetizzare e sarà complementare al 3' del filamento ed orientato 5'-3'



# controllo -

e' il controllo dei reagenti per vedere che non siano contaminati, di solito si fa anche un controllo negativo dei reagenti di estrazione per vedere che anche le estrazioni del DNA siano incontaminate ed il DNA rappresentativo

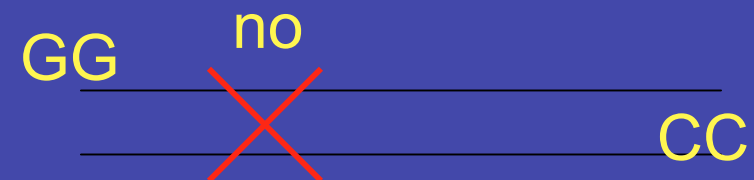
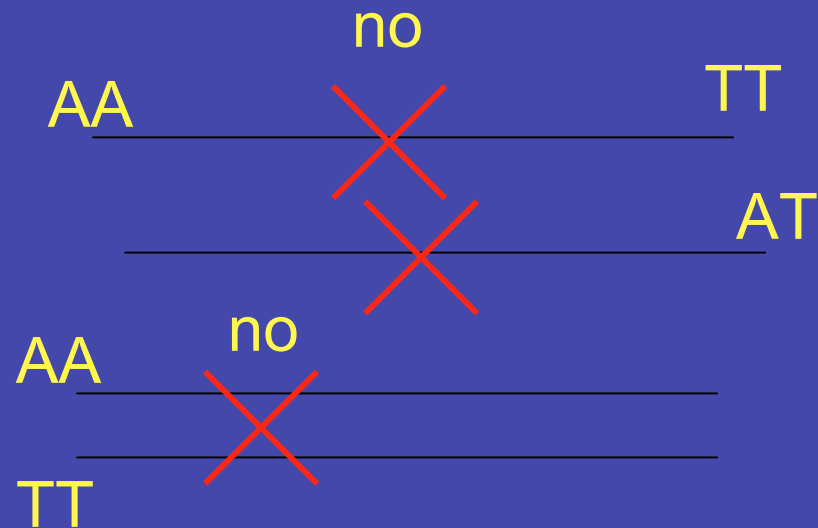


# controllo +

il controllo positivo si fa con un DNA standard per vedere che tutte le componenti funzionino bene, le quantità siano giuste per vedere l'amplicone voluto

e non ultimo: che i reagenti (soprattutto i primers) non facciano amplificare altri frammenti

# scelta dei primers I



le temperature di melting dei due primers devono essere compatibili  $\pm 2/3^{\circ}\text{C}$

calcolo T melting con algoritmo o circa  $2^{\circ}\text{C} \times \text{AT}$  e  $4^{\circ}\text{C} \times \text{C/G}$

la T di annealing è calcolata con qualche grado in meno rispetto alla T melting (50% di molecole appaiate)

la lunghezza dei primers di solito è compresa tra 15 e 25 basi

# come è una sequenza standard

Le sequenze genomiche in banca dati sono sempre a DNA

Gli RNA sono dati come sequenze corrispondenti non come cDNA ma corrispondenti al verso di trascrizione e alla sequenza codificante

Non ci sono tutte e due le eliche, la seconda si ricava,  
I geni sono riportati per il verso di trascrizione 5'→3'

Come si prende il primer forward frw ? = alla seq frw.

quindi la sequenza corrisponderà alla elica “coding” (+) che è depositata in banca dati, se la seq non è codificante va usato il criterio di riferimento con la numerazione che ha in banca dati,  
va tenuto conto di eventuali restrizioni dovute al primer rev.

# scelta del primer rev.

Come è il primer reverse rev ? :

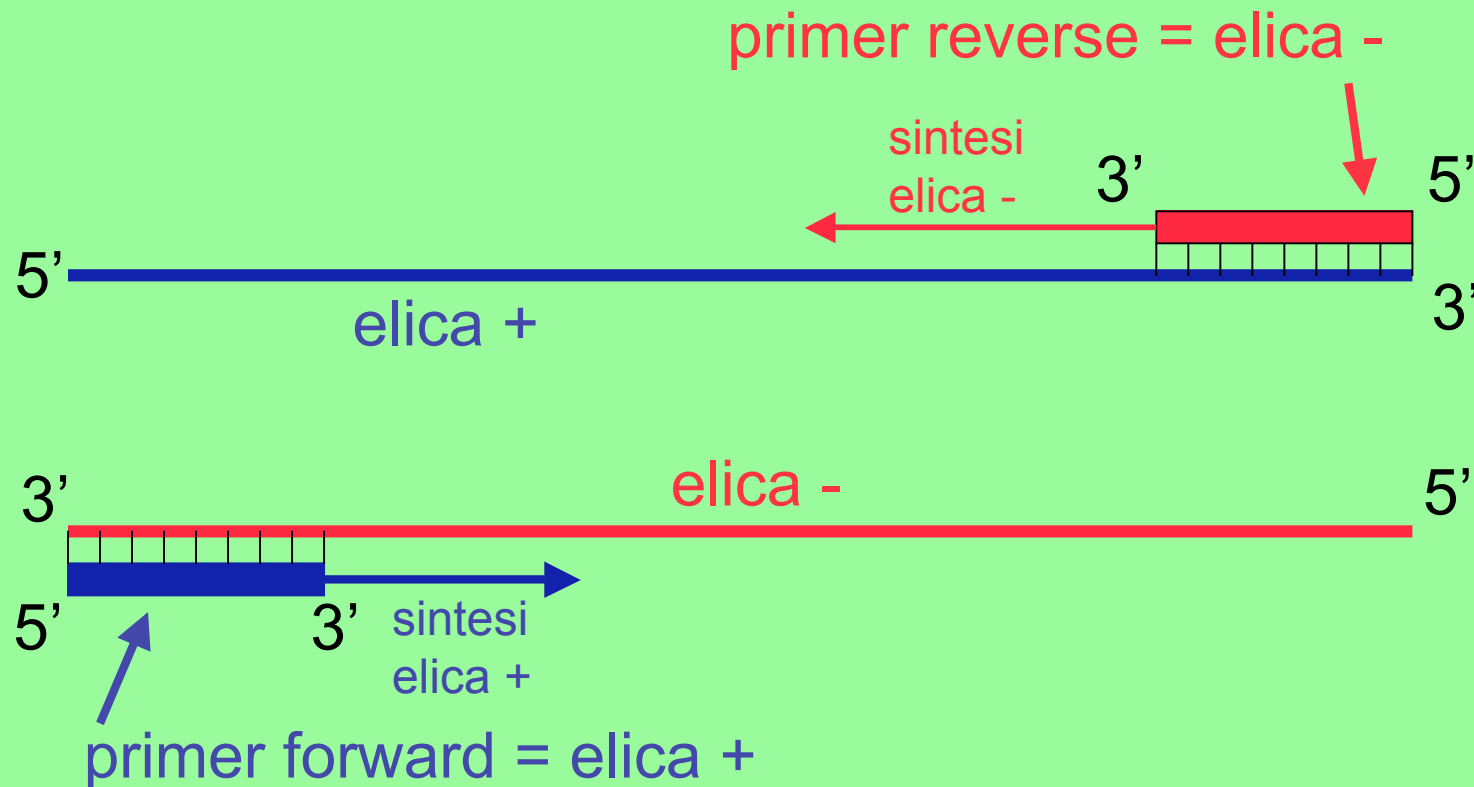
- complementare alla elica di banca dati (+) e reverse, cioè ha il 5' ed il 3' invertiti rispetto alla elica +

A quali sequenze corrispondono ?:

alla elica - , che è complementare e reverse della elica +

Se guardate lo schema di amplificazione lo deducete !

# a quale seq corrispondono i primers



quanti sono i daltonici?

elica + è quella depositata in banca dati a cui si fa riferimento ed ha un numero detto "accession number"

# come si scelgono i primers

esercizio:

le sequenze di DNA in banca dati sono a singola elica  
per determinare la sequenza da amplificare vanno scelti  
primers compatibili in coppia

non devono appaiarsi ad altre sequenze presenti nel  
campione di DNA da amplificare! (come lo so? è genomico?)

non devono avere seq. palindromiche

non devono avere complementari tra di loro

vanno evitate T ed A alla terminazione 3'

non devono avere G e C o A e T alle due estremità, solo  
C o G e A o T, perchè può circularizzare

mai al 3' terminare con GC o AT si ripiega su se stesso alla  
estremità e la polimerase non trova l'estremità libera

# esercizio di scelta dei primers:trova l'errore

```

1  CACCCTGCCC CATCTCCCCA GCCTGGCCCC TCGTGTCTCA GAACCCTCGG GGGGAGGCAC
61  AGAAGCCTTC GGGGAGGGCG GGAAGTGGCT CTGAGGAGCA CCTGGGGGGC CTGCTTTCCC
121 CCCAGACCCT TACCACACGG CGCCCTCGTC GTGCACCACC TCTCCAGGAG CCAGCACGGT
181 GCCGTGAGCG TAGCAGGGGC ACTCCTGGGC GGGCACACAG GCGCCCGCGT CATTGAGGAA
241 GGTGCCCCGCG GGGCAGGTGC AGCCGTCCAC AGGCACGAAG GAAACGCTGC AGGTGACGTC
301 GGCCTCACTC AGGCCGCGGC AAGTGGGCTG GCAGGCATCC ACCACGTAGG CGTAGCGCTG
361 GGACTTGGGG CAGTTCTGCA TGTACTTGGC TGTGGTCGGT GGGGCCAGGG GGGACAGGTC
421 AGCGGCCGAG CAGCCTGGCC AGCCCCCATC TTCAACTCAG CATCCCCGTC TGTGACGTGG
481 GGATCGCAAG GGCATGAGGT TCTTGCGAGG CTGGGATGAG GAAGTGCAA GCTCTGGGCT
541 GAGAACCGTG TGAGTGACGG CTGCTGCCGG CCAGGGTCCC CCGCACCCCC ACGCGGTGTG
601 GACACATCCC ACCCCAGCG TGGGCACTCA CTGCAGACGC CGTCCCTCCA GTCGCTGAGC
661 TGTACGCCCT TGGCGGCACA GGCGTGCACA TAGGAGGACA GCGCGGCGCA CAGGCAGTCC
721 TCGCTCCGCT CACAGTTGCA GGTGTCAAAC ATGCAGTTCT GCGGAGGTGG GAGGCATCGG
781 GGCGTCAGGG ACCCCAGCCT GCCAGGGCTC CCCCACCCAT CCTGCCCAGG CGTGGGGGTC
841 TGGCCTCAGC CTCTCACC GA GTGGAAGGGC TTGGGGTTGA TGATGGAGTG GCAGCGCGAG
901 AAGGCACTGT TGGGATCGGT CAGGCGCGAG CACCAGTGCC GGGCGTAGTT CTCTGTGGGG
961 AAGACCTGAC CTCATCTCCA CGCCCTGCCC CGAAGCCAC ACCCCTGACA CGCAGGCCTG
1021 CGACCCCTC AGCCCGGGGA ACAGTGAGTT GGAATTTGCG GCTCACCTGC TGCGCCTTGG
    
```

I coppia 12 G/C 5 A/T =  $48+10\text{ °C} = 58\text{ °C}$   
 14 G/C 4 A/T =  $52+8\text{ °C} = 60\text{ °C}$   
 amplicone da n.62 a 876 = 814 bp

Il coppia 10 G/C 10 A/T =  $40+20 = 60\text{ °C}$   
 12 G/C 6 A/T =  $48+12 = 60\text{ °C}$   
 amplicone da n.214 a 446 = 431 bp

l'amplicone contiene dal 1° nucleotide del primer frw all'ultimo della sequenza scelta che deve comprendere anche il primer rev. 

# quale è la sequenza dei primers

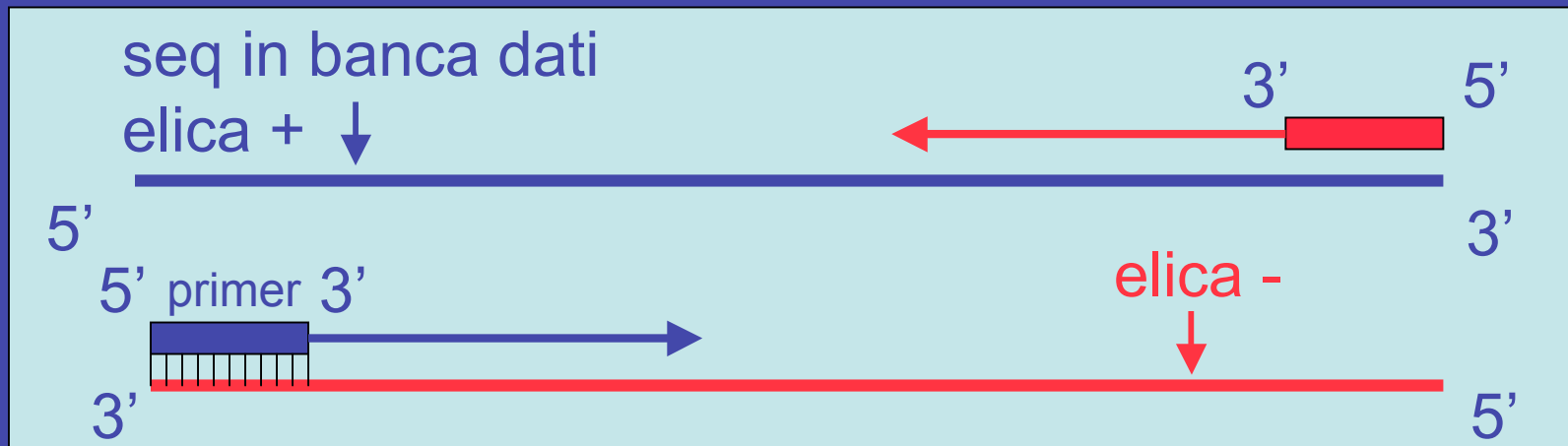
dalla sequenza precedente:

la coppia: primer forward GAAGCCTTC GGGGAGGG

primer reverse CACACAG GCGCCCGCGT C (non buono)

ma stanno sulla stessa sequenza, mentre il primer reverse si deve appaiare alla sequenza complementare quindi:

CACACAG GCGCCCGCGT C → 5' G ACGCGGGCGC CTGTGTG 3'  
deve essere trasformato in complementare e reverse



la sequenza dei primers va descritta sempre in direzione 5' 3'  
per questo il primer reverse deve essere trasformato

# esercizio di scelta dei primers:trova l'errore

```

1  CACCCTGCCC CATCTCCCCA GCCTGGCCCC TCGTGTCTCA GAACCCTCGG GGGGAGGCAC
61  AGAAGCCTTC GGGGAGGGCG GGAAGTGGCT CTGAGGAGCA CCTGGGGGGC CTGCTTTCCC
121 CCCAGACCCT TACCACACGG CGCCCTCGTC GTGCACCACC TCTCCAGGAG CCAGCACGGT
181 GCCGTGAGCG TAGCAGGGGC ACTCCTGGGC GGGCACACAG GCGCCCGCGT CATTGAGGAA
241 GGTGCCCCGCG GGGCAGGTGC AGCCGTCCAC AGGCACGAAG GAAACGCTGC AGGTGACGTC
301 GGCCTCACTC AGGCCGCGGC AAGTGGGCTG GCAGGCATCC ACCACGTAGG CGTAGCGCTG
361 GGACTTGGGG CAGTTCTGCA TGTACTTGGC TGTGGTCGGT GGGGCCAGGG GGGACAGGTC
421 AGCGGCCGAG CAGCCTGGCC AGCCCCCATC TTCAACTCAG CATCCCCGTC TGTGACGTGG
481 GGATCGCAAG GGCATGAGGT TCTTGCGAGG CTGGGATGAG GAAGTGCAA GCTCTGGGCT
541 GAGAACCGTG TGAGTGACGG CTGCTGCCGG CCAGGGTCCC CCGCACCCCC ACGCGGTGTG
601 GACACATCCC ACCCCAGCG TGGGCACTCA CTGCAGACGC CGTCCCTCCA GTCGCTGAGC
661 TGTACGCCCT TGGCGGCACA GGCGTGCACA TAGGAGGACA GCGCGGCGCA CAGGCAGTCC
721 TCGCTCCGCT CACAGTTGCA GGTGTCAAAC ATGCAGTTCT GCGGAGGTGG GAGGCATCGG
781 GGCGTCAGGG ACCCCAGCCT GCCAGGGCTC CCCCACCCAT CCTGCCCAGG CGTGGGGGTC
841 TGGCCTCAGC CTCTCACCGA GTGGAAGGGC TTGGGGTTGA TGATGGAGTG GCAGCGCGAG
901 AAGGCACTGT TGGGATCGGT CAGGCGCGAG CACCAGTGCC GGGCGTAGTT CTCTGTGGGG
961 AAGACCTGAC CTCATCTCCA CGCCCTGCCC CGAAGCCAC ACCCCTGACA CGCAGGCCTG
1021 CGACCCCCTC AGCCCGGGGA ACAGTGAGTT GGAATTTGCG GCTCACCTGC TGCGCCTTGG
    
```

I coppia 12 G/C 6 A/T =  $48+12\text{ °C} = 60\text{ °C}$   
 13 G/C 4 A/T =  $52+8\text{ °C} = 60\text{ °C}$   
 amplicone da n.61 a 1000 = 940 bp

Il coppia 10 G/C 10 A/T =  $40+20 = 60\text{ °C}$   
 11 G/C 7 A/T =  $44+14 = 58\text{ °C}$   
 amplicone da n.214 a 426 = 213 bp

l'amplicone contiene dal 1° nucleotide del primer frw all'ultimo della sequenza scelta che deve comprendere anche il primer rev. 

# 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 sostituito 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)