

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

Corso Integrato: Diagnostica per Immagini e di Laboratorio

Modulo:
Basi di Diagnostica di Laboratorio (2 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

Il Laboratorio di Diagnostica Clinica

Il laboratorio di diagnostica clinica si avvale di tecniche tipiche della chimica analitica, della biochimica e della biologia molecolare,

nel laboratorio di diagnostica clinica vengono stimati parametri utili alla biochimica clinica ed alla biologia molecolare clinica;

la biochimica clinica e la biologia molecolare clinica studiano il singolo soggetto malato per raccogliere dati che abbiano valore di prove semeiologiche a favore o contrarie alla diagnosi formulata dal clinico.

La semeiotica é una disciplina che studia i sintomi ed i segni delle malattie e di come entrambi debbano essere integrati per giungere alla diagnosi.

IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA ED IL CONTROLLO DI QUALITA'

Prelievo, raccolta e conservazione di materiali biologici

Variabilità analitica ed errori di misura

Controllo dei metodi impiegati in un laboratorio di diagnostica

Variabilità biologica e valori di riferimento

BIOCHIMICA CLINICA

Misure spettrofotometriche per la misura di analiti

Metodi immunochimici per la misurazione di antigeni

Dosaggi enzimatici dei fluidi biologici

Proteomica applicata alla diagnostica

BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

Enzimi di restrizione

La reazione di PCR nella diagnostica clinica

Real-Time PCR

Prevenzione da contaminazioni in un laboratorio di biologia molecolare

TESTI CONSIGLIATI

METODOLOGIE DI BASE PER LA BIOCHIMICA E LA BIOTECNOLOGIA, A.J. Ninfa, D.P. Ballou, Ed. Zanichelli

BIOTECNOLOGIA MOLECOLARE, R.G. Glick, J.J. Pasternak, Ed. Zanichelli

VET.

BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

Roberto Giacomini Stuffer

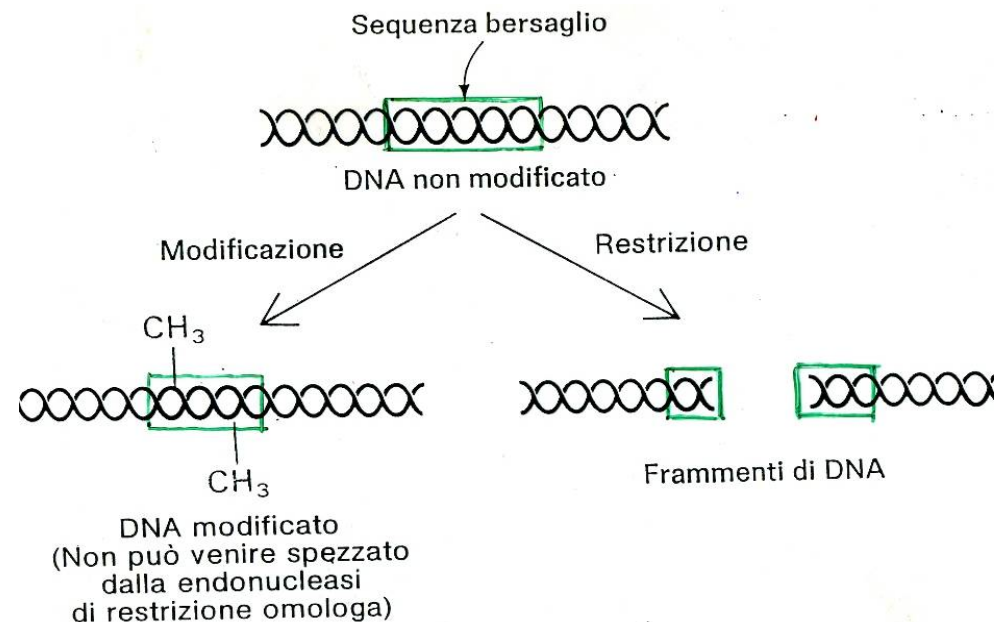
Enzimi di Restrizione

Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi di origine batterica. Sono stati scoperti con esperimenti di infezione dell'E.Coli con batteriofagi,

ogni ceppo di Coli è in grado di proteggersi dall'entrata di DNA esterno, utilizzando da una parte gli enzimi di restrizione e dall'altra metilando il suo DNA. Quando entra un DNA estraneo non metilato, le nucleasi riconoscono sequenze specifiche e lo tagliano,

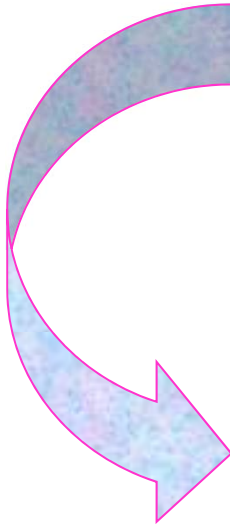
ogni enzima di restrizione è caratterizzato da una precisa sequenza di riconoscimento palindromica,

l'endonucleasi di restrizione e la corrispondente metilasi vengono denominate SISTEMA DI RESTRIZIONE-MODIFICAZIONE.



Enzimi di Restrizione

PALINDROMO



Deriva dal greco *palindromos*: tornare indietro di nuovo.
E' una parola, frase o verso che risulta uguale quando viene letto da sinistra verso destra o da destra verso sinistra
es. radar, ossesso..

Nel DNA, il termine viene applicato quando vi sono delle ripetizioni invertite di una sequenza di basi azotate, con una doppia simmetria presente nelle due catene.

Enzimi di Restrizione

Enzimi di tipo I e III



legano sequenze specifiche di DNA, tagliano il legame fosfodiesterico lontano dal sito di riconoscimento, con distanze che variano dal tipo I al tipo III. Hanno sempre associata un'attività metilasi. Poiché il sistema non può essere controllato, non sono utilizzati in vitro.

Enzimi di tipo II



tagliano solamente nella sequenza di riconoscimento, con modalità differenti; non hanno associata un'attività metilasi.

Enzimi di Restrizione

I 3 tipi principali

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Esempio	<i>EcoB</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoPI</i>
Sito di riconoscimento	TGAN ₈ TGCT	GAATTC	AGACC
Sito di taglio	Fino a 10 kbp dal sito di riconoscimento	Tra G e A (entrambi i filamenti)	24-26 paia di basi in direzione 3' dal sito di riconoscimento
Sito di metilazione	^m TGAN ₈ TGCT ACTN ₈ ACGA _m	^m GAATTC CTTAAG _m	^m AGACC (solo un filamento metilato)
Nucleasi e metilasi nello stesso enzima?	Sì	No	Sì
Requisiti per la scissione	ATP, Mg ²⁺ , AdoMet	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	Mg ²⁺ , AdoMet
Requisiti per la metilazione	ATP, Mg ²⁺ , AdoMet	AdoMet	Mg ²⁺ , AdoMet

Enzima di Restrizione di tipo I

Esso presenta tre subunità:

la catena α ha l'attività nucleasica,

la catena β ha l'attività metilasi,

la catena γ riconosce la sequenza palindromica;

la scissione avviene fino a 10 kbasi (kbp) dal sito di riconoscimento e la metilazione avviene al suo interno;

l'enzima si sposta lungo il DNA, idrolizzando ATP (richiesto per la traslocazione dell'enzima e per il superavvolgimento del DNA).

Enzima di Restrizione di tipo II

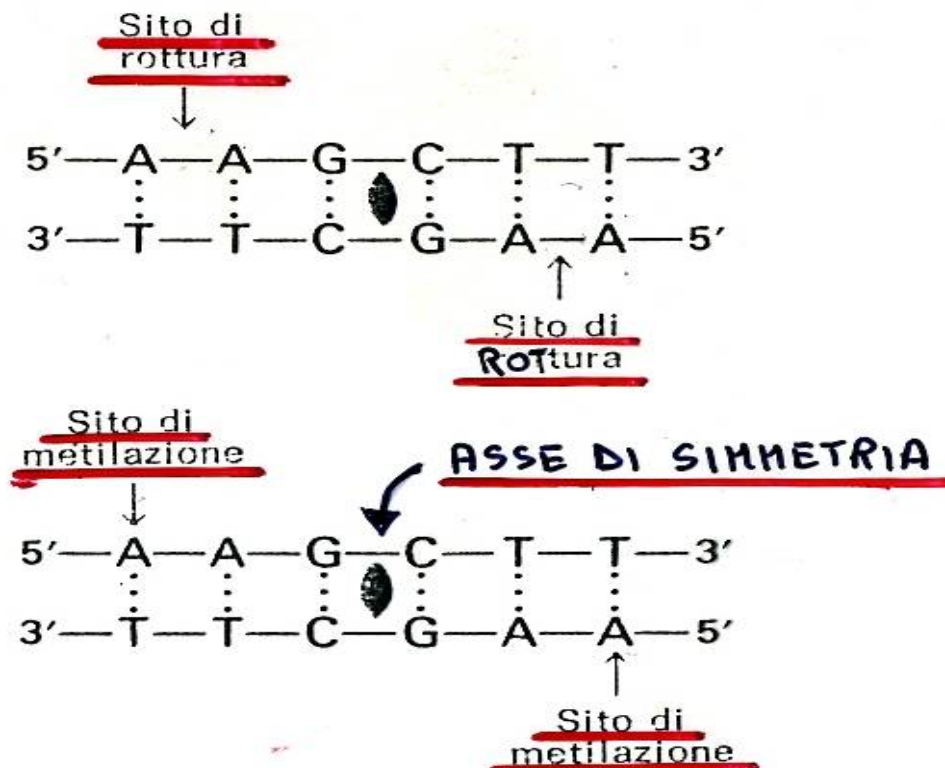
Molti enzimi sono omodimeri, con subunità di P.M. tra 30 e 40 kDa, ciascuno ha una corrispondente metilasi (che non fa parte dell'omodimero);

il tipo II non richiede ATP e taglia il DNA all'interno della stessa sequenza di riconoscimento,

si utilizzano diffusamente nella tecnologia del DNA ricombinante.

Enzima di Restrizione di tipo II

Un esempio di sequenza riconosciuta da un enzima di restrizione di Tipo II,
la maggior parte di questi enzimi riconosce sequenze di lunghezza
compresa tra 4 e 8 basi azotate,
essi idrolizzano un legame fosfodiesterico su ciascun filamento.



Enzimi di Restrizione di Tipo II

Le sequenze di riconoscimento di alcune endonucleasi di restrizione di tipo II, con indicate le basi azotate che vengono metilate (*)

table 29-2

Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases			
<i>Bam</i> HI	<pre> ↓ * (5') G G A T C C (3') C C T A G G * ↑ </pre>	<i>Hind</i> III	<pre> (5') A A G C T T (3') T T C G A A ↑ </pre>
<i>Cla</i> I	<pre> ↓ * (5') A T C G A T (3') T A G C T A * ↑ </pre>	<i>Not</i> I	<pre> ↓ (5') G C G G C C G C (3') C G C C G G C G ↑ </pre>
<i>Eco</i> RI	<pre> ↓ * (5') G A A T T C (3') C T T A A G * ↑ </pre>	<i>Pst</i> I	<pre> *↓ (5') C T G C A G (3') G A C G T C ↑* </pre>
<i>Eco</i> RV	<pre> ↓ (5') G A T A T C (3') C T A T A G ↑ </pre>	<i>Pvu</i> II	<pre> ↓ (5') C A G C T G (3') G T C G A C ↑ </pre>
<i>Hae</i> III	<pre> ↓* (5') G G C C (3') C C G G *↑ ↓ </pre>	<i>Tth</i> 111I	<pre> ↓ (5') G A C N N N G T C (3') C T G N N N C A G ↑ </pre>

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation of the bacterial species

from which it is derived (e.g., *Bam* for *Bacillus amyloliquefaciens*, *Eco* for *Escherichia coli*). The Roman numerals included in the enzyme names (e.g., *Bam*HI) distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species rather than the type of restriction enzyme.

Enzima di Restrizione di tipo III

Esso ha due subunità per le attività nucleasica e metilasica,

si sposta lungo il DNA senza consumo di ATP;

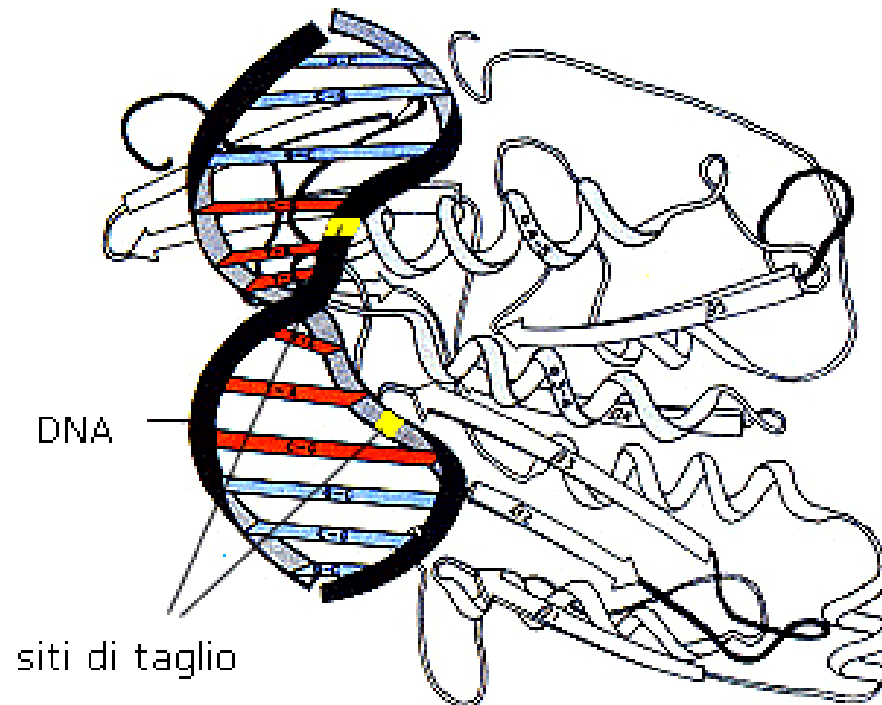
modifica solo un filamento di DNA ed ha un sito di taglio relativamente vicino al sito di riconoscimento (24-26 bp).

Enzimi di Restrizione

Tutti gli enzimi di restrizione riconoscono una sequenza palindromica, che si legge allo stesso modo in una direzione su un filamento e nell'altra nell'altro filamento.

5' – GAATTC – 3'
3' – CTTAAG – 5'

Il numero di basi della sequenza di riconoscimento può variare. In genere sono 4, 6, 8 o anche di più;



prima di tagliare, l'enzima riconosce e si lega alla sequenza di DNA.

Enzimi di Restrizione

Per legarsi al DNA, l'enzima deve trovare delle sequenze generiche che fiancheggiano la sequenza di riconoscimento.



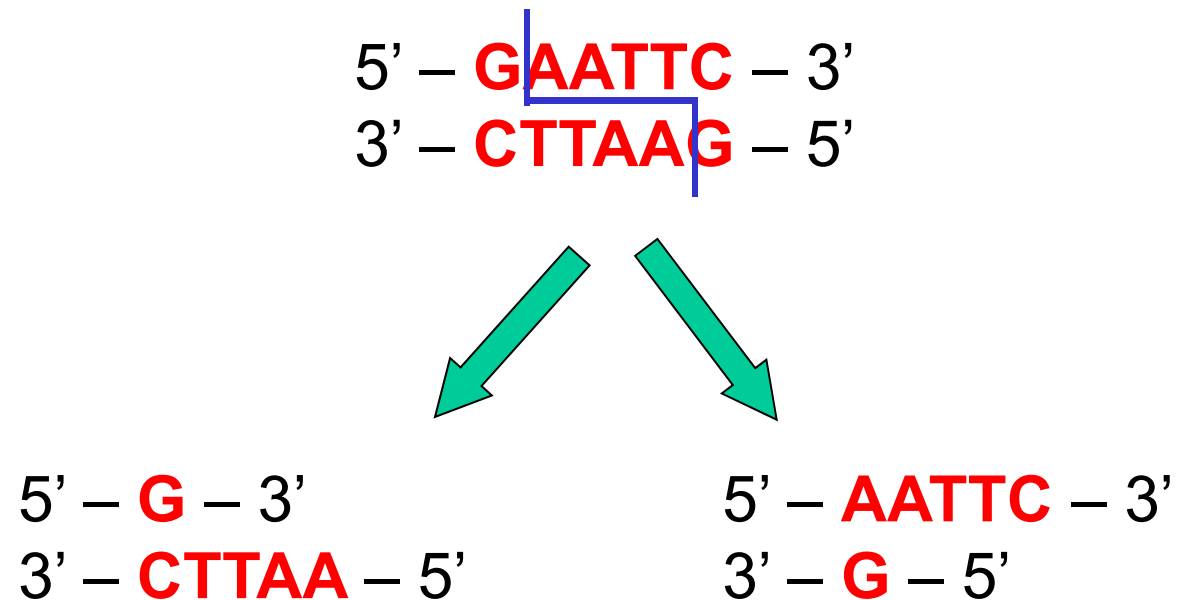
Le sequenze extra hanno il ruolo di:

1. decidere quale elica viene tagliata per prima;
2. decidere la velocità del taglio.

Una volta che l'enzima si lega, il taglio è sfalsato, cioè non avviene contemporaneamente sulle due eliche, ma prima su una e poi sull'altra.

Enzimi di Restrizione

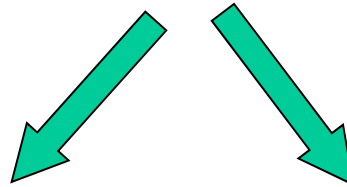
Esempio di enzima che genera estremità protruding (coesive), lasciando 2 o 4 nucleotidi non appaiati in entrambe le estremità.



Il DNA viene tagliato fra le stesse due basi nei due filamenti.

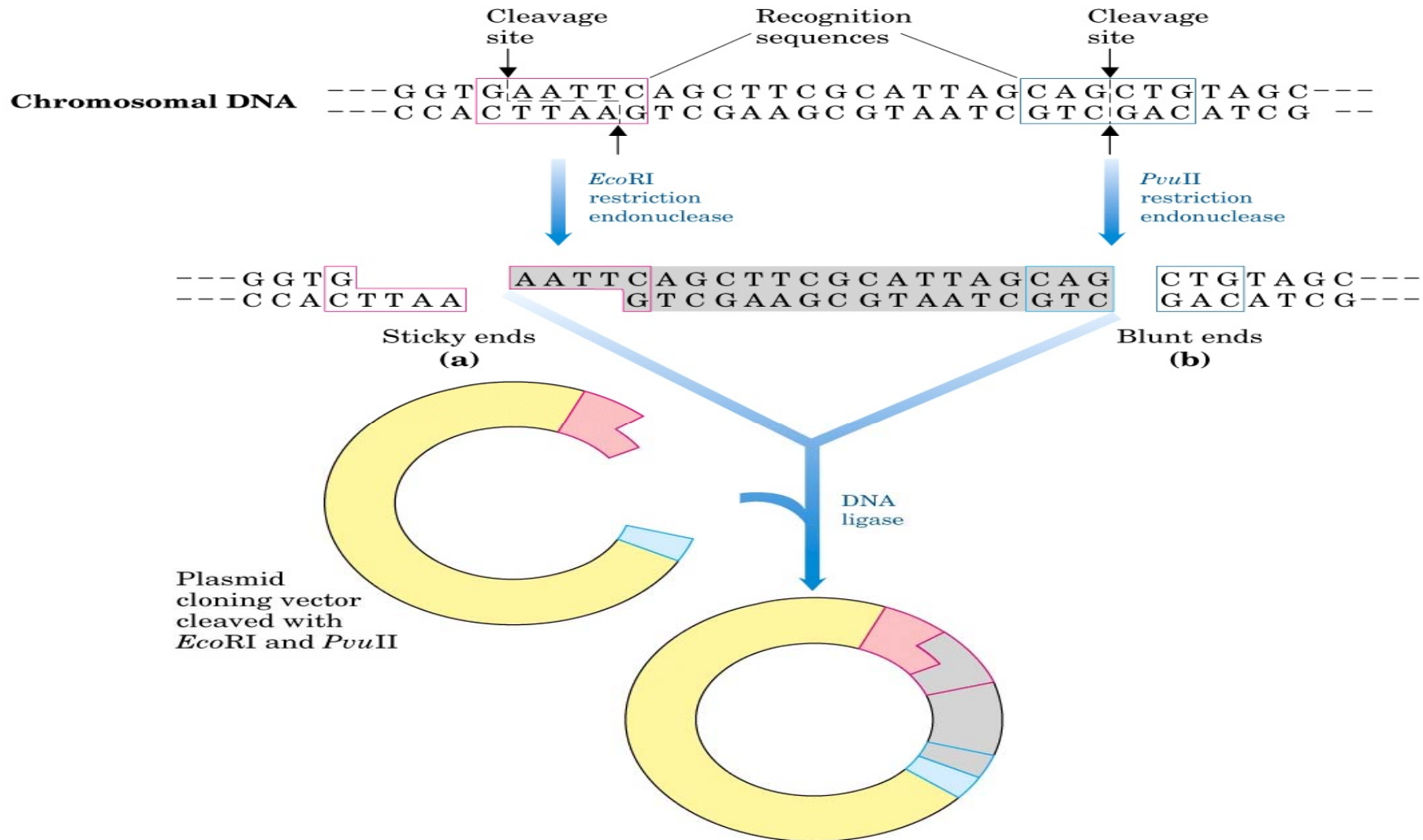
Enzimi di Restrizione

Esempio di enzima che genera estremità blunt (non coesive), lasciando nucleotidi appaiati in entrambe le estremità.



Enzimi di Restrizione

La scissione di molecole di DNA in frammenti ad opera di endonucleasi di restrizione.



Enzimi di Restrizione

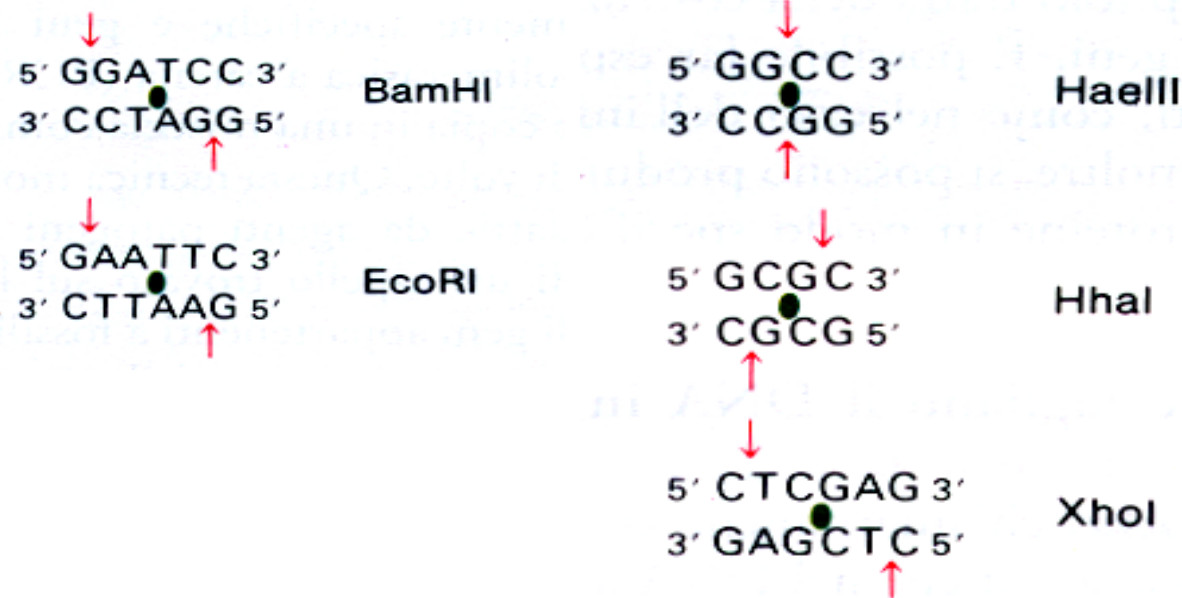
ISOCAUDAMERI: enzimi di restrizione che riconoscono siti diversi ma lasciano estremità compatibili. Non necessariamente quando si uniscono due frammenti creati con due enzimi isocaudameri si riforma uno dei due siti.

ISOSCHIZOMERI: enzimi di restrizione isolati da organismi diversi e quindi con nomi diversi e talvolta con esigenze diverse (temperatura, pH, etc.) che riconoscono lo stesso sito. Ciò non implica che abbiano caratteristiche uguali, perché, in alcuni casi, il taglio che si ottiene è differente.

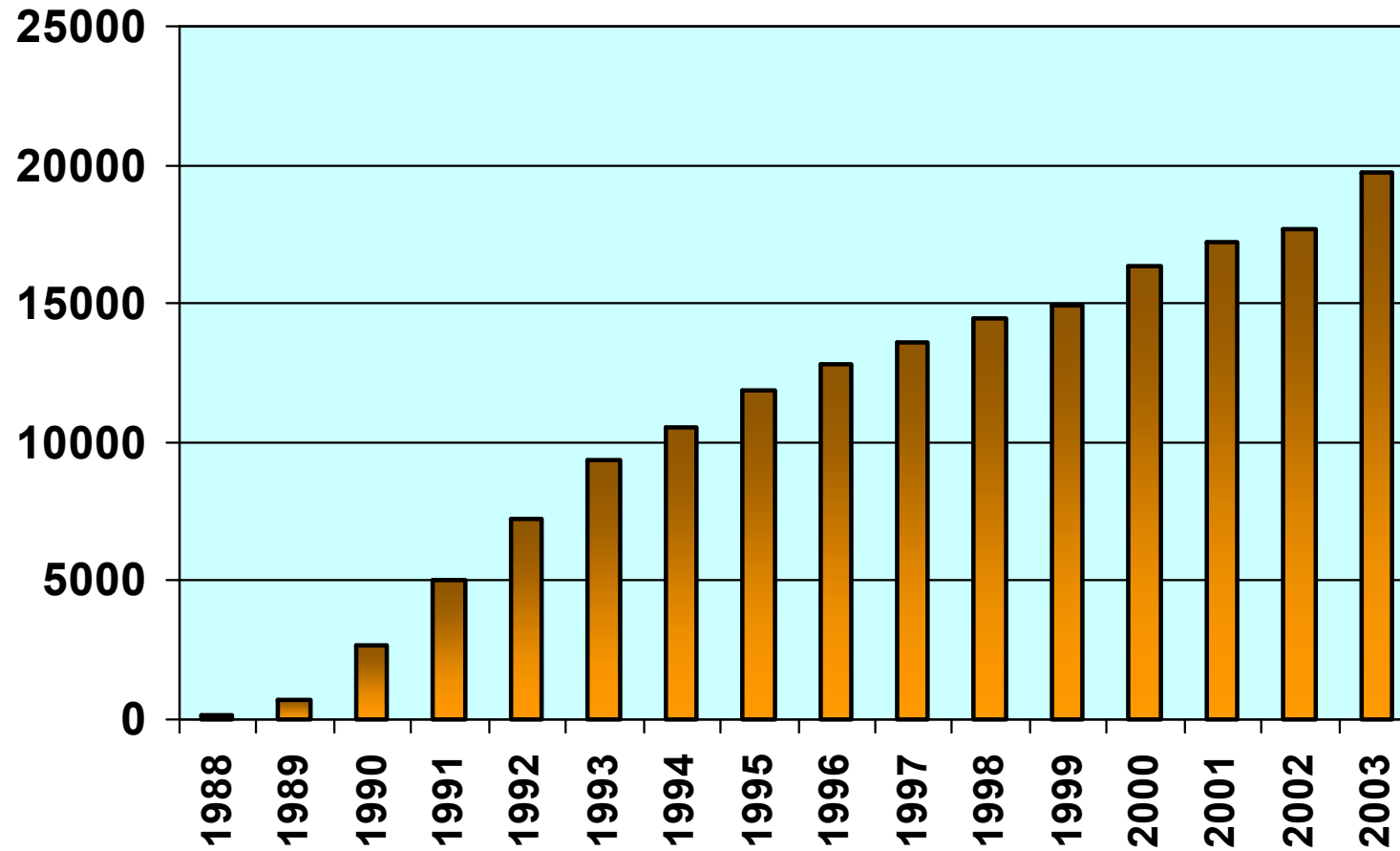
Enzimi di Restrizione

Sono note più di 100 endonucleasi di restrizione disponibili oggi commercialmente. I loro nomi derivano da un'abbreviazione a tre lettere che indica l'organismo di appartenenza, es.:

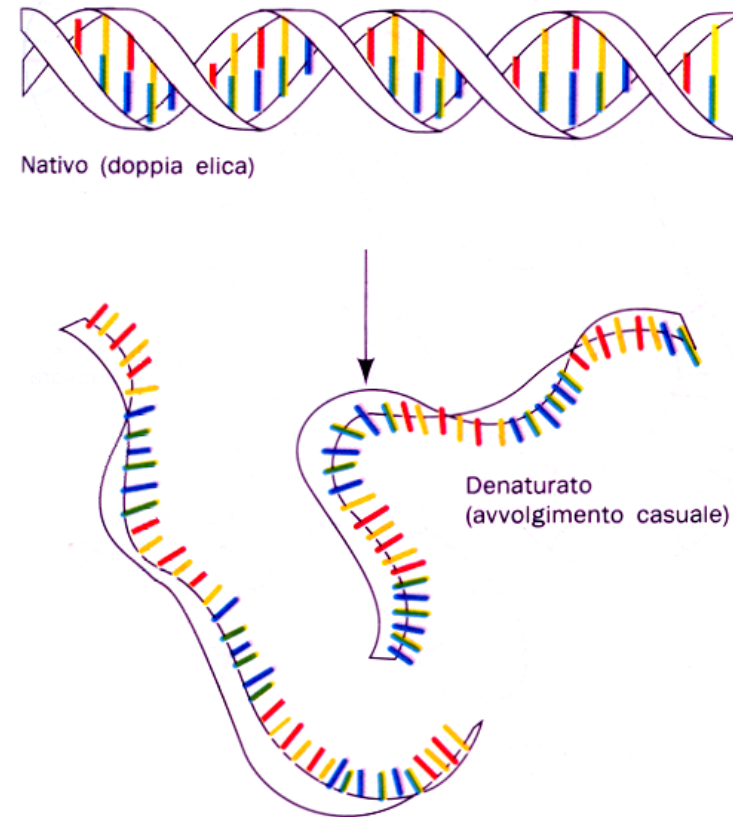
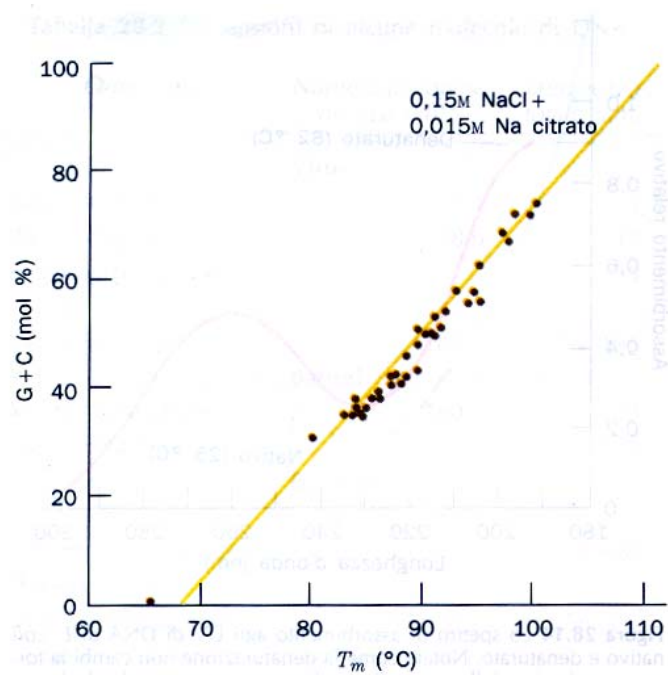
Eco per *E.coli*, Hin per *Haemophilus influenzae* e Hae per *H. aegyptius*, seguito dall'indicazione del ceppo e dal numero romano (se vi è più di un enzima di restrizione prodotto dallo stesso organismo).



Tecniche per la Diagnosi Molecolare



Tecniche per la Diagnosi Molecolare

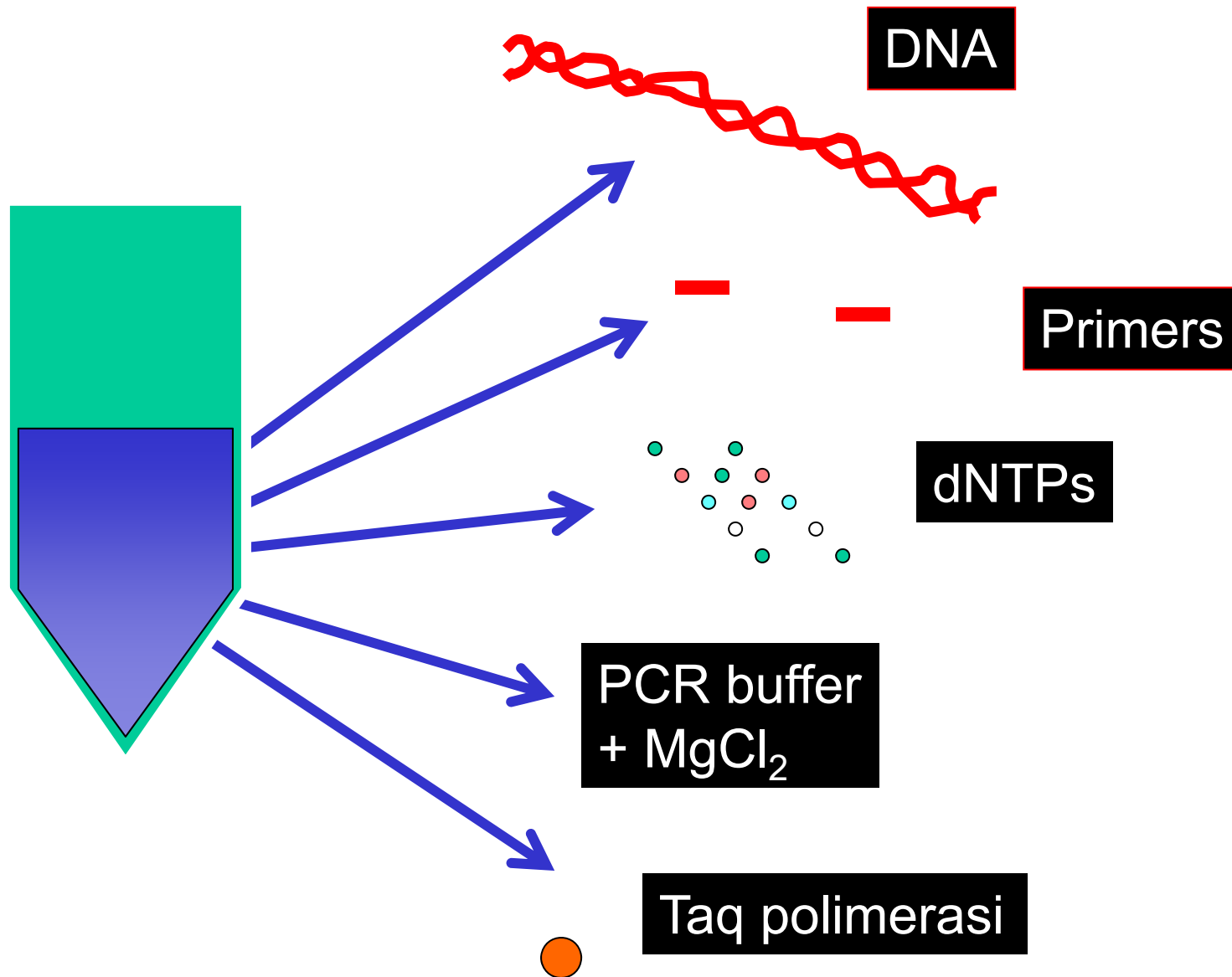


Tecniche per la Diagnosi Molecolare

The logo consists of the letters 'PCR' in a bold, yellow, sans-serif font, centered within a solid blue rectangular background.

La PCR (Polimerase Chain Reaction: reazione di polimerizzazione a catena) è una tecnica di amplificazione in vitro, che consente la sintesi esponenziale di un frammento di DNA, a partire da uno stampo, del quale si conosca la sequenza nucleotidica delle regioni terminali;
fu introdotta da Kary Mullis alla metà degli anni '80 ed ha rivoluzionato la genetica molecolare.

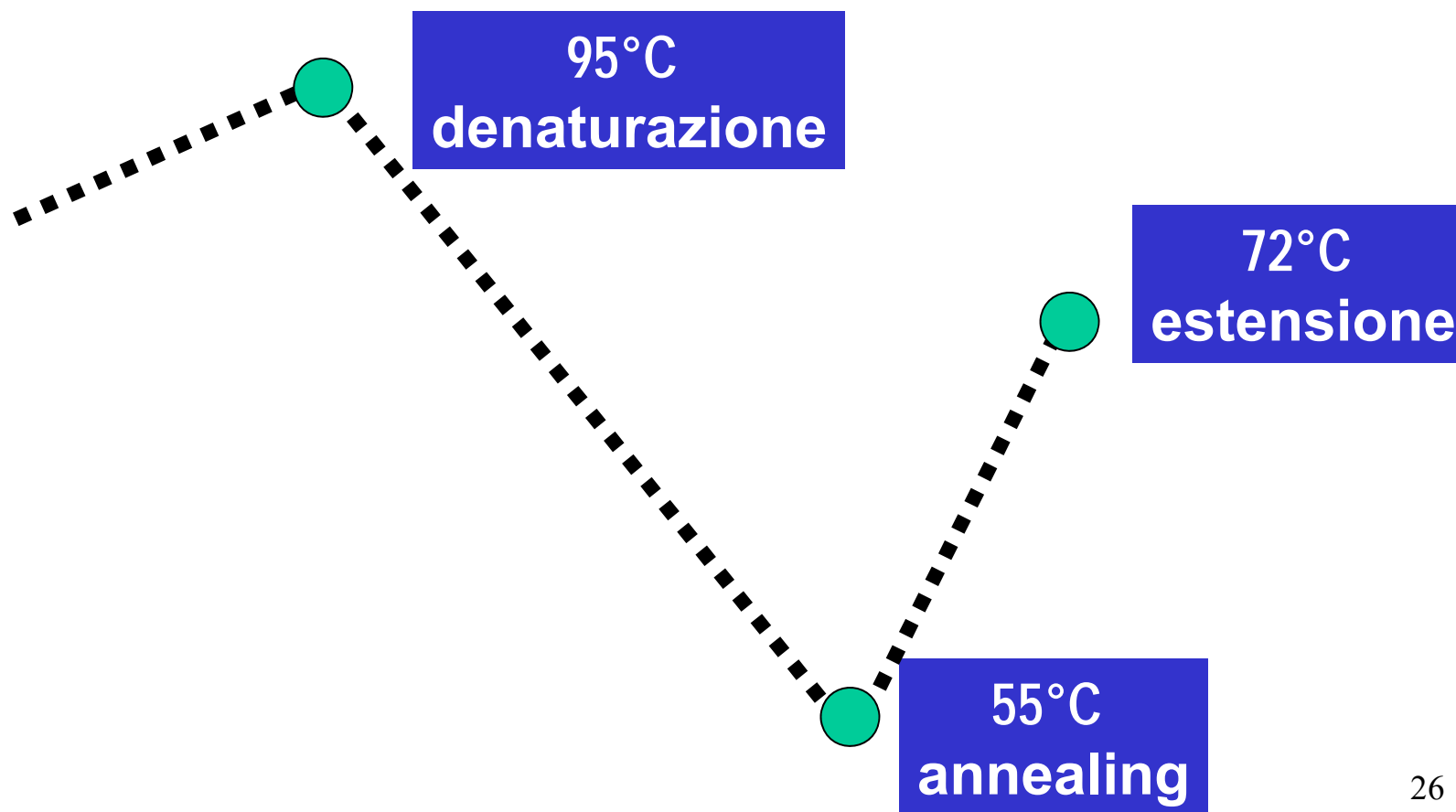
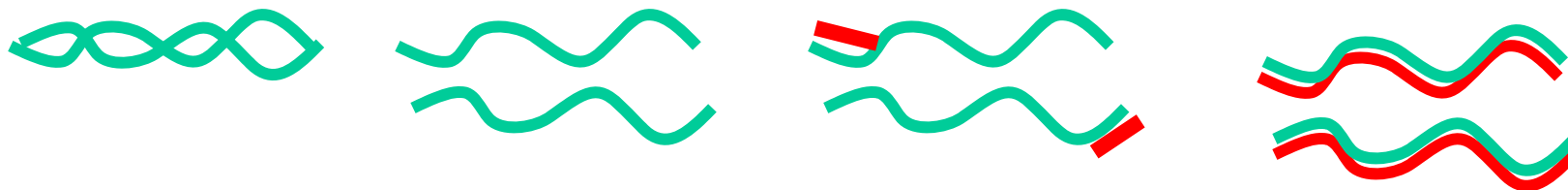
Materiali Necessari per Effettuare una PCR



Materiali e Strumenti Necessari per Effettuare una PCR

- 1) il DNA deve contenere la sequenza da amplificare (meno di 1 µg di DNA genomico totale; a volte basta una singola molecola di DNA),
- 2) la TAQ Polimerasi é una DNA polimerasi estratta dal batterio *Thermophilus Aquaticus*. Il suo vantaggio é nella termostabilità. Sintetizza il DNA in direzione 5'→3'. Ha attivita' 5'-3' esonucleasica. É priva di attivita' 3'-5' esonucleasica,
- 3) due sonde oligonucleotidiche (primers) complementari all'estremità 3' del segmento di DNA da amplificare, sintetizzati chimicamente,
- 4) una miscela dei quattro nucleotidi precursori (dNTPs: 2' deossiribonucleosidi 5' trifosfato).

Il principio della PCR



Le Fasi della PCR

Tre passaggi amplificati per 30 o 40 cicli:

denaturazione a 95°C, 30 sec. - 1 min.

annealing a 54-60°C, 30 sec. - 50 sec.

estensione a 72°C, 1-2 min.

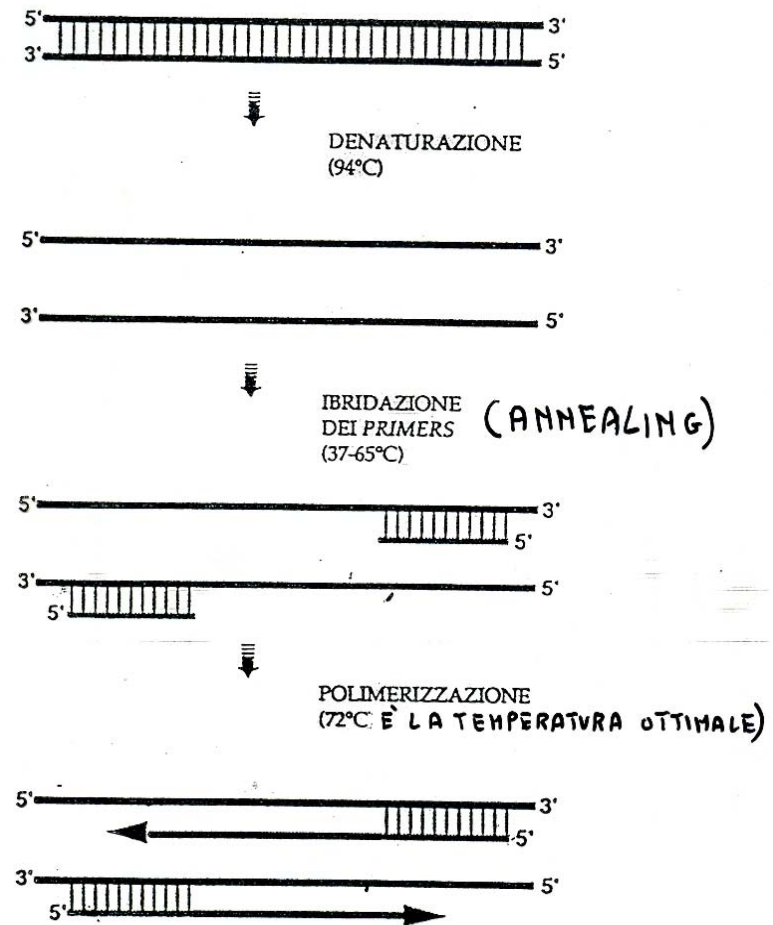


Fig. 1. Rappresentazione schematica dei tre passaggi di ogni ciclo di PCR. Il DNA del campione è rappresentato da una linea lunga nera; i primers da una corta linea grigia; il DNA neosintetizzato da una linea grigia con la freccia all'estremità 3' terminale.

La Taq polimerasi

É una DNA polimerasi DNA-dipendente,
termostabile anche a temperature $>90^{\circ}\text{C}$,
ha attività ottimale intorno a 72°C
ed un range di pH ottimale tra 8,2 e 9,0.

La Taq polimerasi

Il ciclo di denaturazione–ibridazione é ripetuto per 30-40 volte per consentire la **sintesi esponenziale** del DNA localizzato tra i due primers;

al termine di **n** cicli, la miscela di reazione conterrà un numero massimo teorico di molecole di DNA pari a **2^n** .

I vantaggi nell'uso della Taq polimerasi

È sufficiente aggiungerlo una **sola volta** all'inizio della reazione, la polimerizzazione ad alte temperature (70-75°C), con questo enzima, **aumenta la specificità**, perché riduce gli appaiamenti aspecifici degli oligonucleotidi e la formazione casuale di strutture secondarie; è possibile **automatizzare** il processo.

La sensibilità della Taq polimerasi

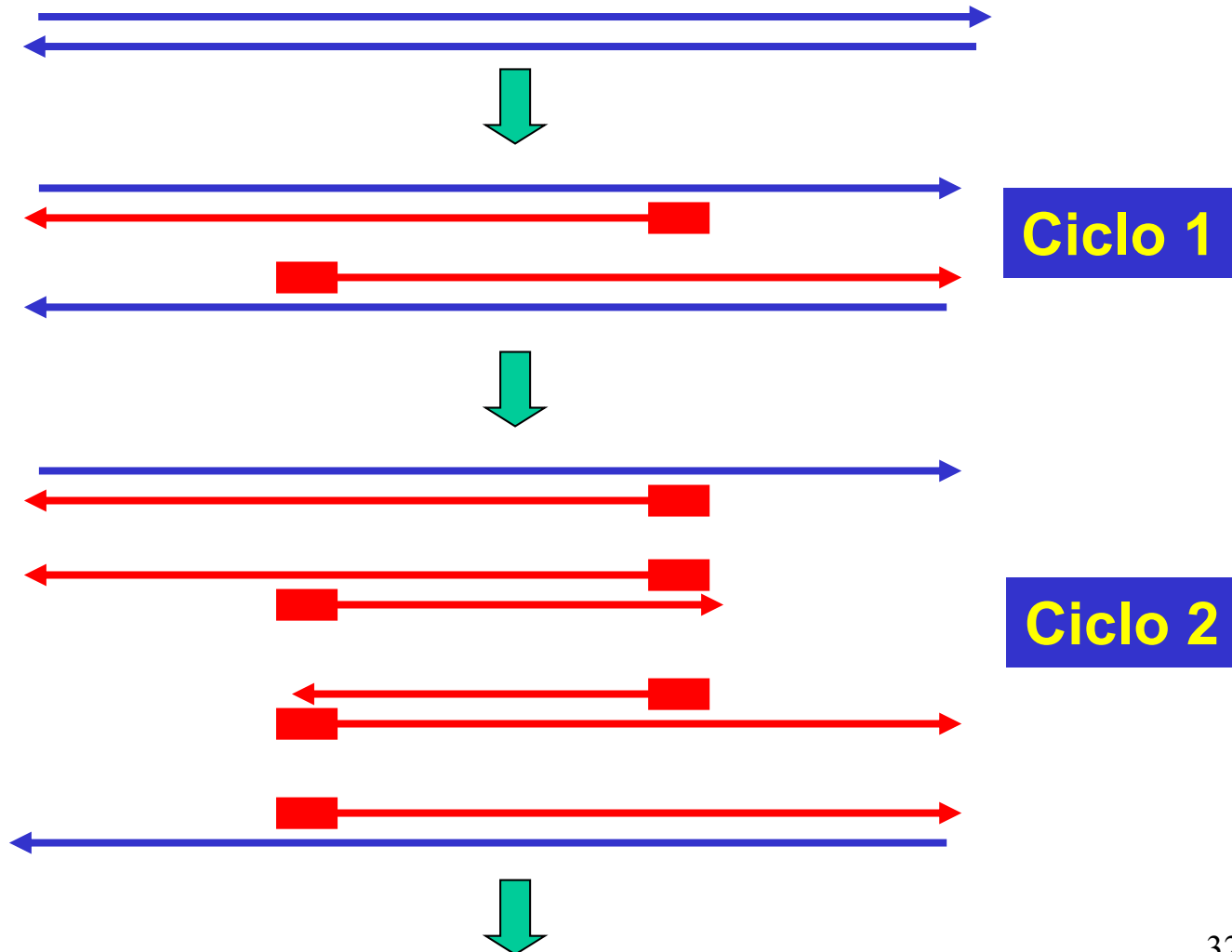
La PCR permette di ottenere in tempi brevi (**alcune ore**) alcuni mg di DNA, a partire da un numero molto ridotto di molecole iniziali, in casi estremi anche una singola molecola,

questo è legato alla **natura esponenziale** della reazione;

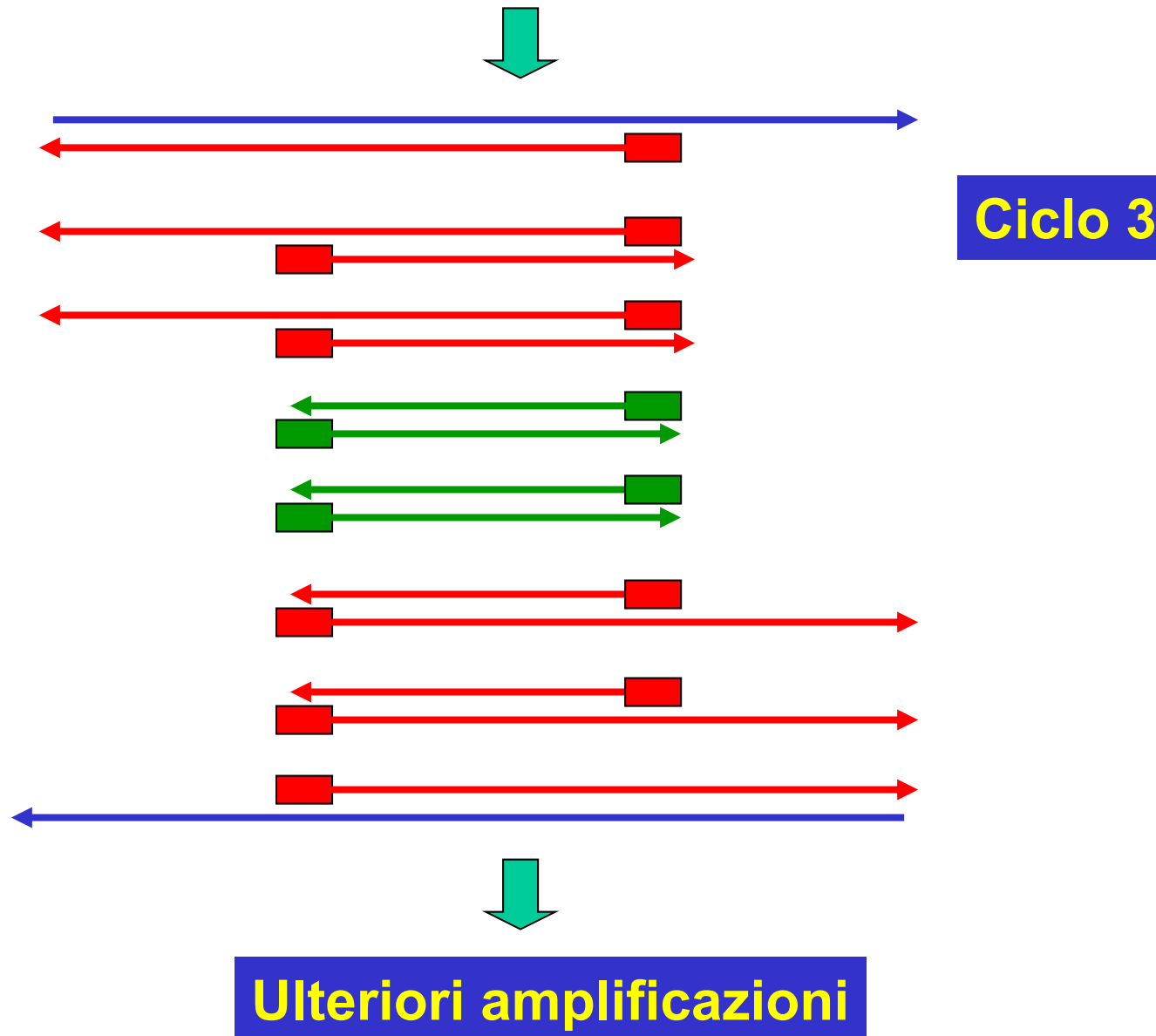
l'amplificazione avviene mediante **ripetuti cicli di polimerizzazione**, che utilizzano come stampo i due filamenti complementari di DNA e come innesco una coppia di primers, che delimitano la regione da amplificare.

La natura esponenziale della PCR

DNA



La natura esponenziale della PCR



La natura esponenziale della PCR

$$N = N_0 (1+E)^n$$

N = numero di molecole finali di DNA

N_0 = numero di molecole iniziali di DNA presenti

E = efficienza della reazione (fra 0 e 1)

n = numero di cicli

Es.: $E = 0.85$

$n = 30$

$$N = N_0 (1+0.85)^{30}$$

$$= N_0 \times 103.550.000$$

La Scelta dei Primer

Hanno una lunghezza da 20 a 29 basi,
ed una percentuale di G+C compresa tra il 40% e il 60%,
la loro sequenza deve essere priva di omologie interne,
si ottengono mediante una sintesi chimica.

La Scelta dei Primer

5'

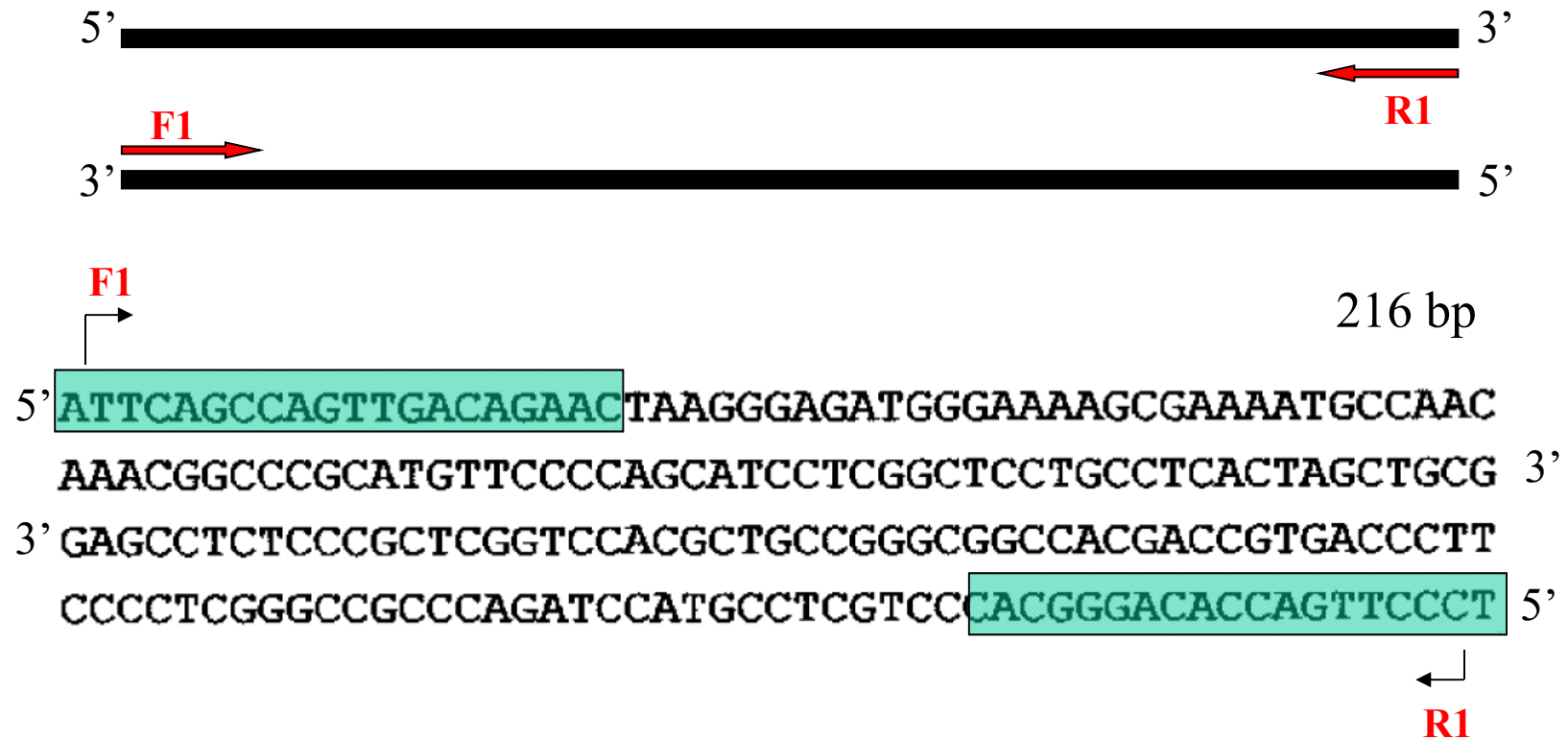


3'

Un cattivo appaiamento (mismatch) o la inserzione di sequenze estranee all'estremità 5' non impediscono l'amplificazione.

**Un cattivo appaiamento (mismatch) all'estremità 3' impedisce l'amplificazione:
es. G-G invece di G-C.**

Il Disegno dei Primer



F1: 5'-ATTCAGCCAGTTGACAGAAC-3'

R1: 5'-TCCCTTGACCACAGGGCAC-3'

Gli Strumenti

Il thermal cycler (termocicizzatore) permette di ottenere con grande precisione e omogeneità le variazioni di temp. necessarie al compimento della reazione ciclica di PCR;

esistono strumenti che automatizzano la fase di estrazione, allestimento ed esecuzione dell'amplificazione, senza intervento esterno e con ridotti rischi di contaminazione da parte dei prodotti di amplificazione.

Attenzione alle Contaminazioni!!

**Organizzare aree di lavoro separate,
tenere fisicamente separati i campioni,
usare puntali usa e getta,
dividere i reagenti in aliquote,
utilizzare controlli negativi,
conservare il materiale di lavoro sotto cappa a flusso
laminare e sottoporlo ad irradiazione con luce UV,
minimizzare le manipolazioni di campioni e reagenti.**

Verifica dei Risultati della PCR

Essa avviene attraverso:

l'analisi della lunghezza dei frammenti amplificati mediante gel elettroforetico e colorazione con bromuro di etidio,

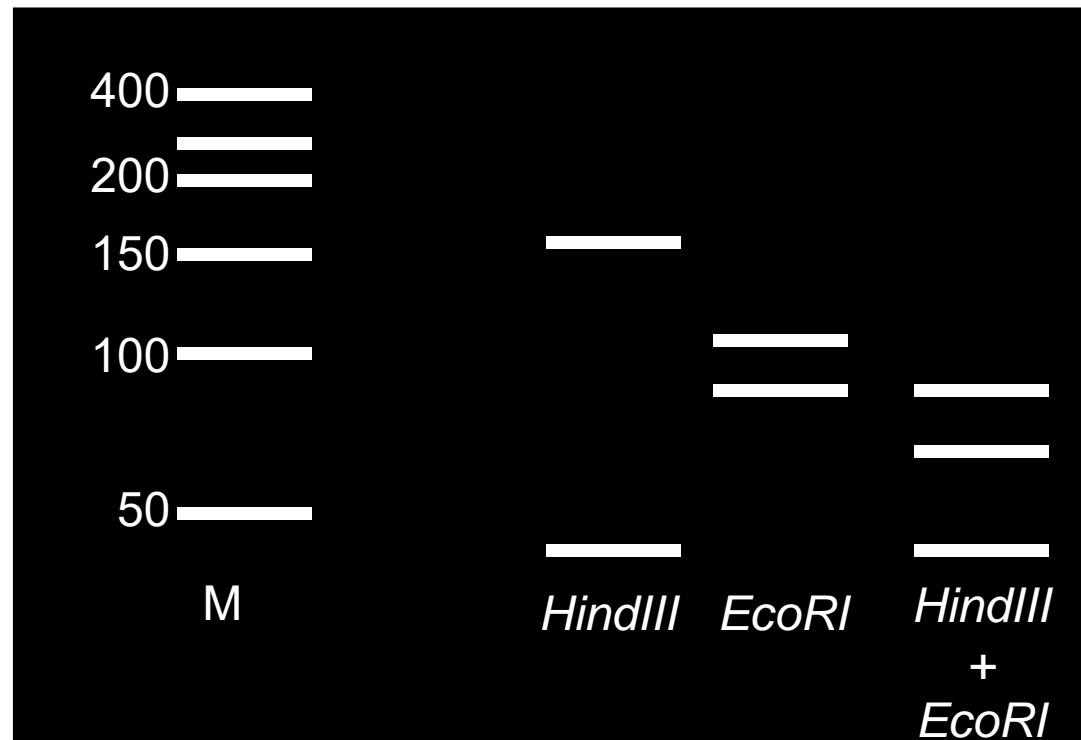
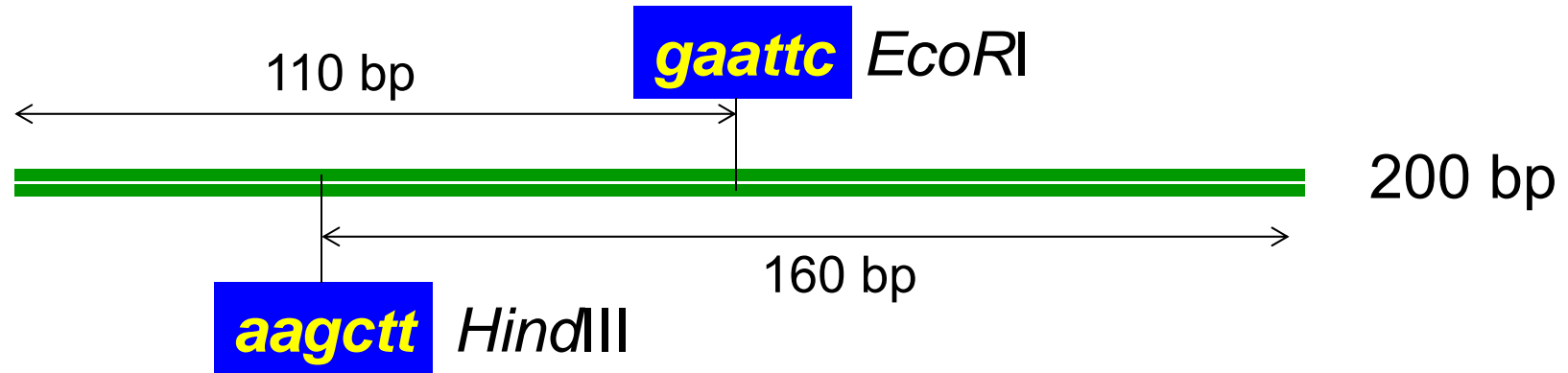
l'analisi di restrizione con specifiche endonucleasi,

l'ibridizzazione con sonde marcate (Southern blotting).

SOUTHERN BLOTTING

Tecnica che permette di identificare un frammento di restrizione contenente una sequenza di basi specifica ibridizzandolo con un filamento marcato di DNA complementare.

Verifica dei Risultati della PCR



Le Applicazioni della PCR

Applicazione analitica:

identificazione della presenza / assenza di determinate sequenze geniche nel campione in esame
(es. identificazione di genomi virali).

Applicazione preparativa:

il campione amplificato viene utilizzato come bersaglio per ulteriori tecniche di biologia molecolare
(es. può essere sequenziato, ibridato con specifiche sonde, sottoposto ad enzimi di restrizione, a screening per la ricerca di mutazioni, ecc).

La PCR é Diventata di Uso Corrente per:

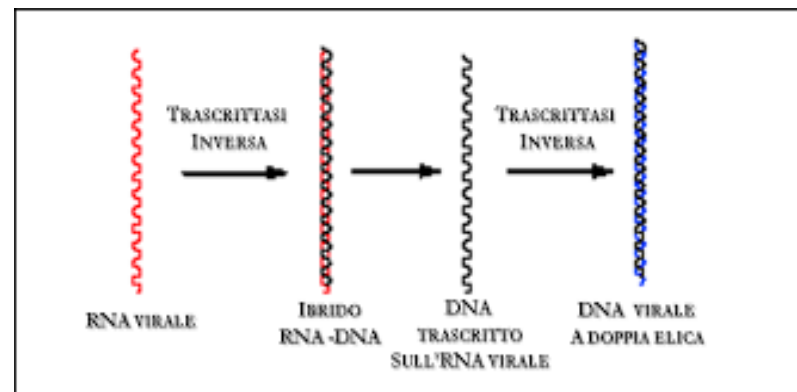
**la diagnosi di infezioni batteriche e virali,
le diagnosi cliniche di malattie causate da mutazioni,
la diagnosi prenatale per l'emofilia,
il controllo dell'efficacia di terapie anti-tumorali,
la determinazione del sesso,
gli studi di evoluzione molecolare.**

RT-PCR

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

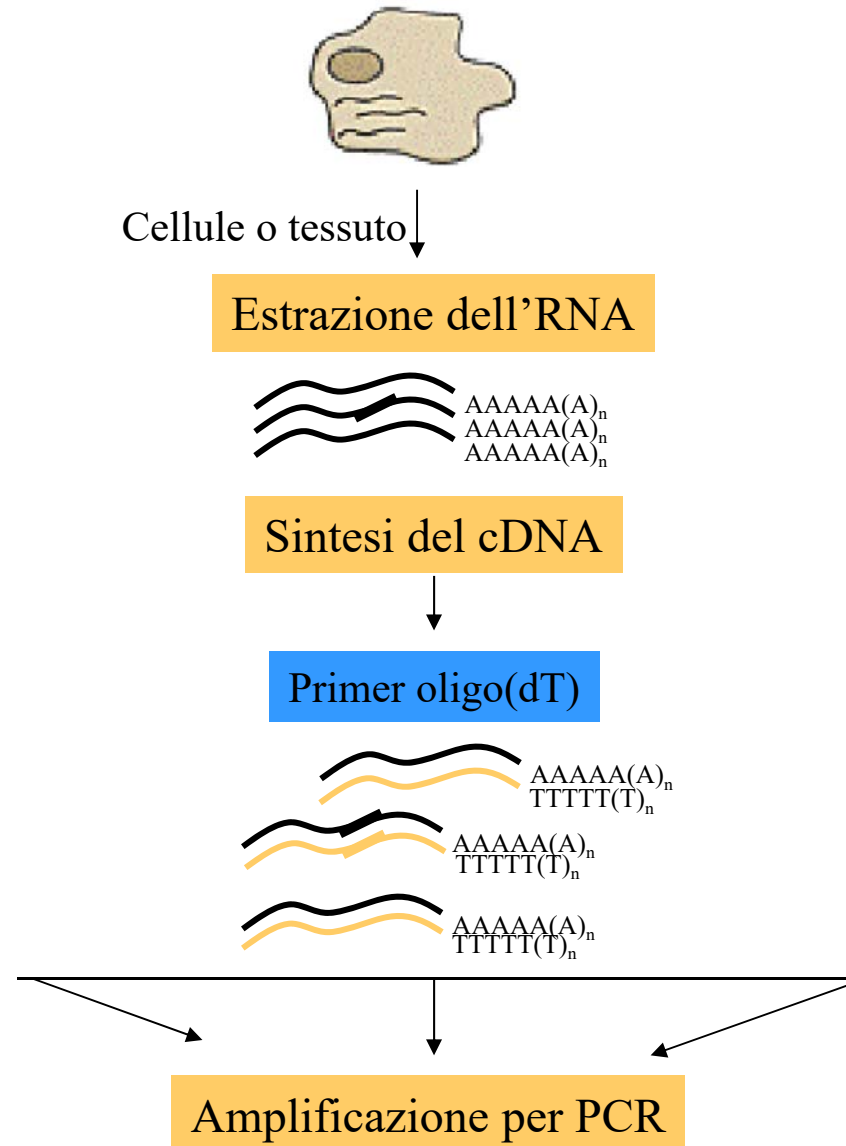
La tecnica della RT-PCR è una variante della tecnica della PCR che consente di amplificare una molecola di DNA partendo da un insieme di RNA totali estratti da un tipo cellulare;

la RT-PCR viene sfruttata in laboratorio per studiare l'espressione genica, essa prevede lo svolgimento di due fasi: retrotrascrizione dell'RNA, amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase.



Clonaggio basato sulla RT-PCR

(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)



Real-Time PCR

La Real-Time PCR è una tecnica molto sensibile che permette l'amplificazione e la quantificazione di una specifica sequenza di acido nucleico.

La rivelazione del prodotto di PCR avviene in tempo reale. La quantificazione di DNA, cDNA o RNA ha luogo determinando il ciclo al quale il prodotto di PCR può essere rivelato per la prima volta.

E' quindi differente dalla PCR "classica", dove la rivelazione avviene a saturazione, cioè dopo un elevato numero di cicli, non permettendo la quantificazione del prodotto.

La quantificazione del prodotto avviene attraverso la fluorescenza misurata per ogni ciclo di PCR. La quantità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto amplificato.

Real-Time PCR

Le tecnologie Real-Time comprendono sistemi di amplificazione in grado di ottenere simultaneamente nella stessa provetta sia il processo di amplificazione sia quello di rivelazione dell'amplificato;

si avvalgono di particolari strumenti che uniscono un termocicizzatore a un fluorimetro

che permettono di monitorare in tempo reale la quantità di prodotto che si sta formando nella fase esponenziale di amplificazione

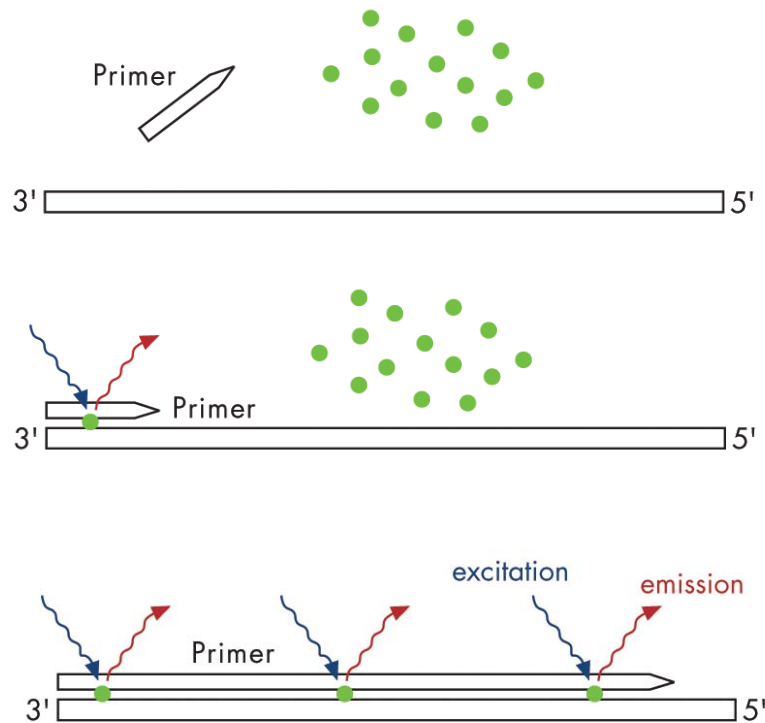
e di ottenere una stima della concentrazione del DNA di partenza (PCR quantitativa);

la rivelazione del DNA amplificato avviene tramite l'utilizzo di sonde specifiche per i frammenti da amplificare che generano segnali fluorescenti.

Real-Time PCR

SYBR Green

É un colorante fluorescente che lega il DNA a doppio filamento. L'eccitazione massima è a 494nm, mentre l'emissione massima è a 521nm; è utilizzato sempre più spesso come alternativa al bromuro di etidio.

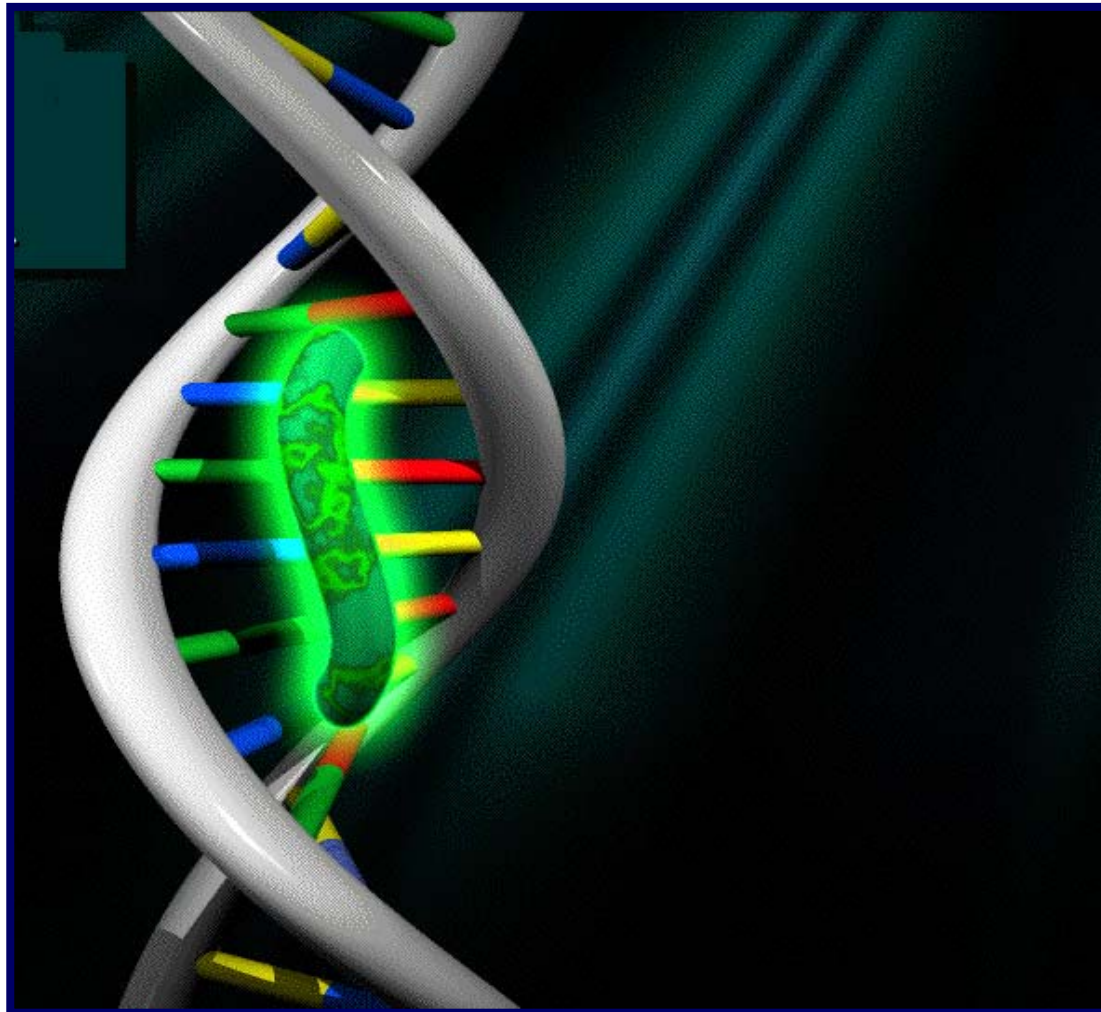


La rivelazione avviene nel passaggio di estensione della PCR,

l'intensità del segnale aumenta nei cicli successivi, a causa dell'accumularsi dei prodotti della PCR.

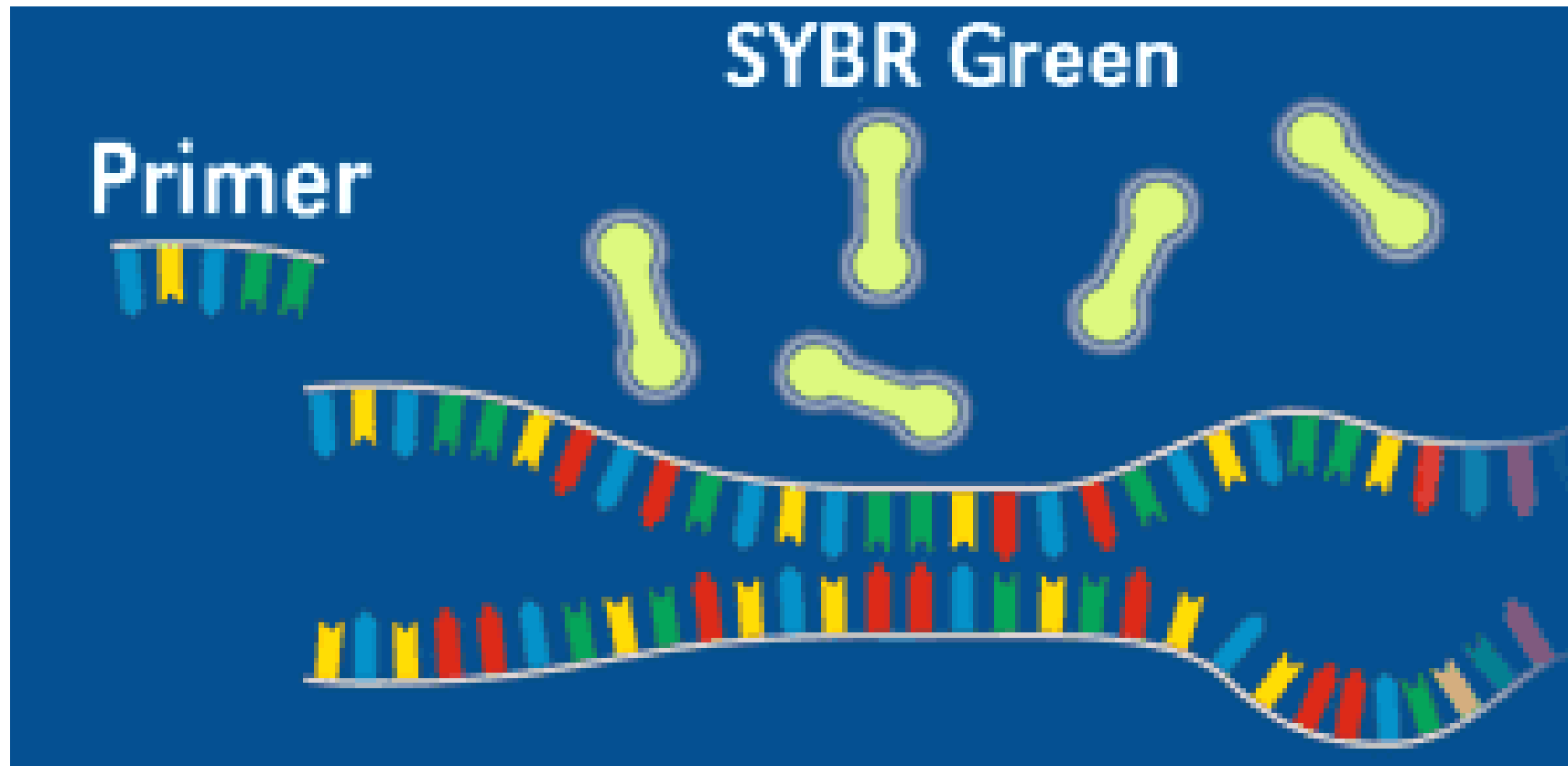
SYBR Green: principio

Si utilizza una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA in modo non dipendente dalla sequenza.



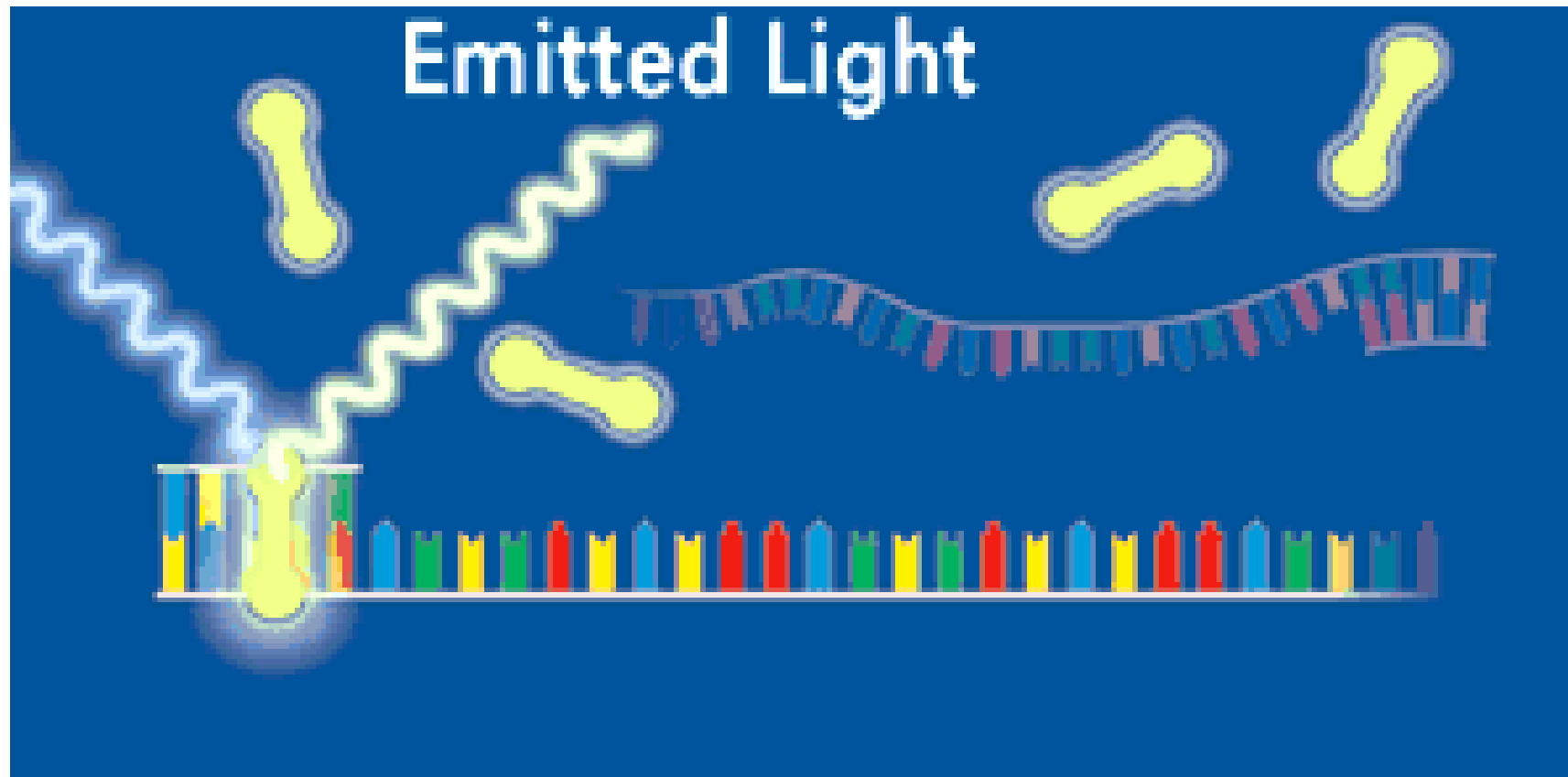
SYBR Green: principio

All'inizio del processo di amplificazione la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primer e la molecola fluorescente.



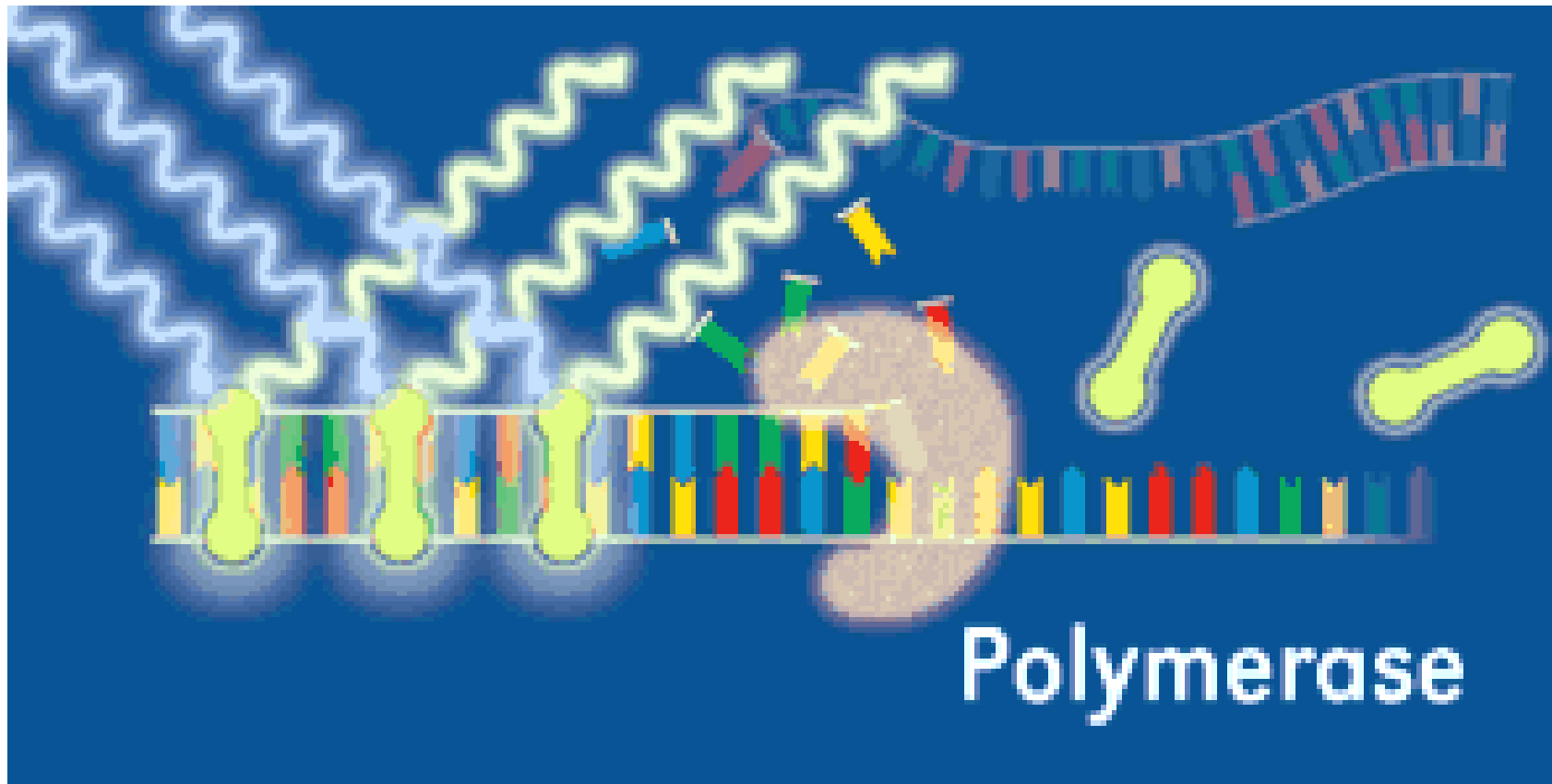
SYBR Green: principio

Dopo l'annealing dei primers si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica.



SYBR Green: principio

Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone, il prodotto della PCR.



SYBR Green

- Denaturazione: **nessuna fluorescenza**
- Annealing: **si sviluppa la fluorescenza**
- Estensione: **aumenta la fluorescenza con l'accumulo dell' amplificato**
- Lettura della fluorescenza: **in fase di annealing e in fase di estensione.**

Real-Time PCR

SYBR Green

Vantaggi

Costo minore
Analisi di numerosi target

Svantaggi

Prodotti non specifici e dimeri di primer possono contribuire al segnale fluorescente.

Real-Time PCR

L'utilizzo di sonde fluorescenti rivelatrici è il più accurato e il più affidabile dei metodi, ma anche il più costoso,

esso utilizza una sonda di DNA per quantificare solamente il DNA contenente la sequenza della sonda;

risultato: incremento significativo della specificità,

invece i coloranti fluorescenti (es. il SYBR Green) rivelano l'amplificazione di qualsiasi frammento di DNA.

Real-Time PCR

Si utilizzano marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR;

così la misurazione della fluorescenza dà in tempo reale la quantità dello specifico prodotto di PCR.

Real-Time PCR

Sonde specifiche marcate con fluorocromi



Sono un metodo di rivelazione altamente specifico e sensibile. La sonda deve essere disegnata in una porzione del DNA target compresa fra due normali primers.



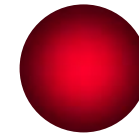
Prodotti aspecifici della PCR non vengono rivelati, quindi si ha un aumento della specificità.
Per ogni target bisogna disegnare una sonda fluorigenica specifica, che comporta maggiori costi rispetto ai coloranti fluorescenti.

Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi

Taq Polymerase



PROBE



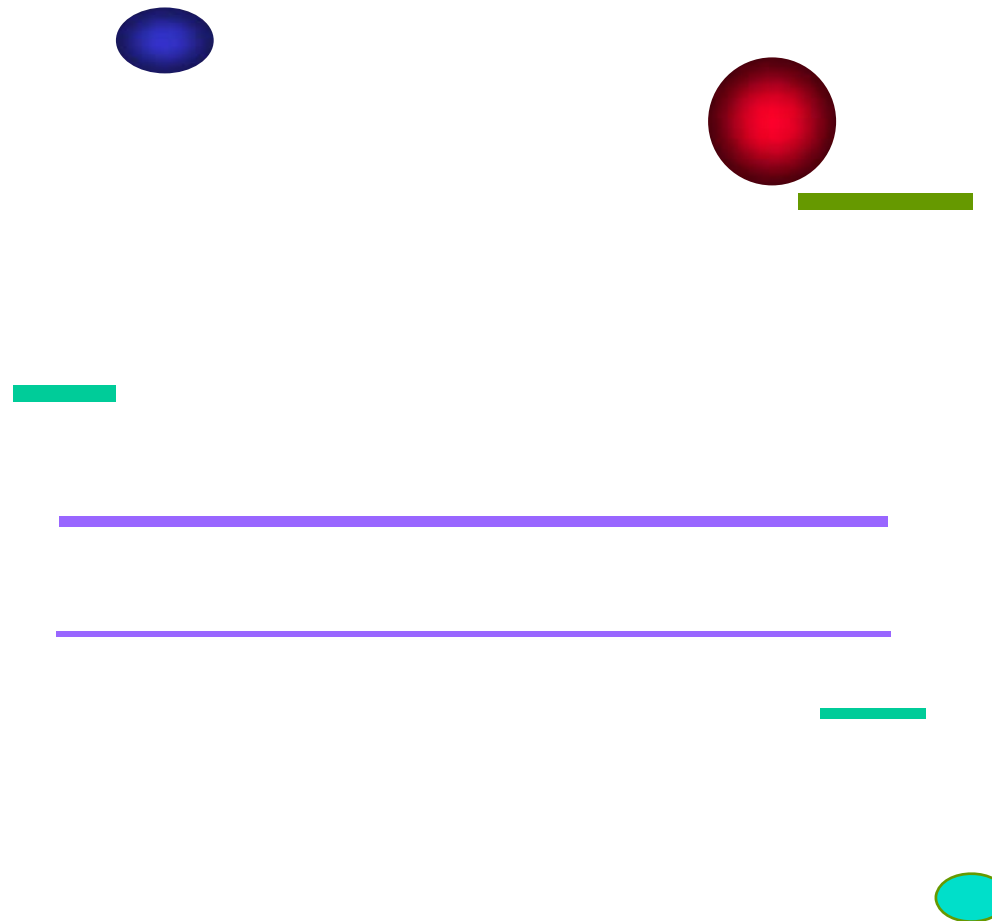
PRIMERS



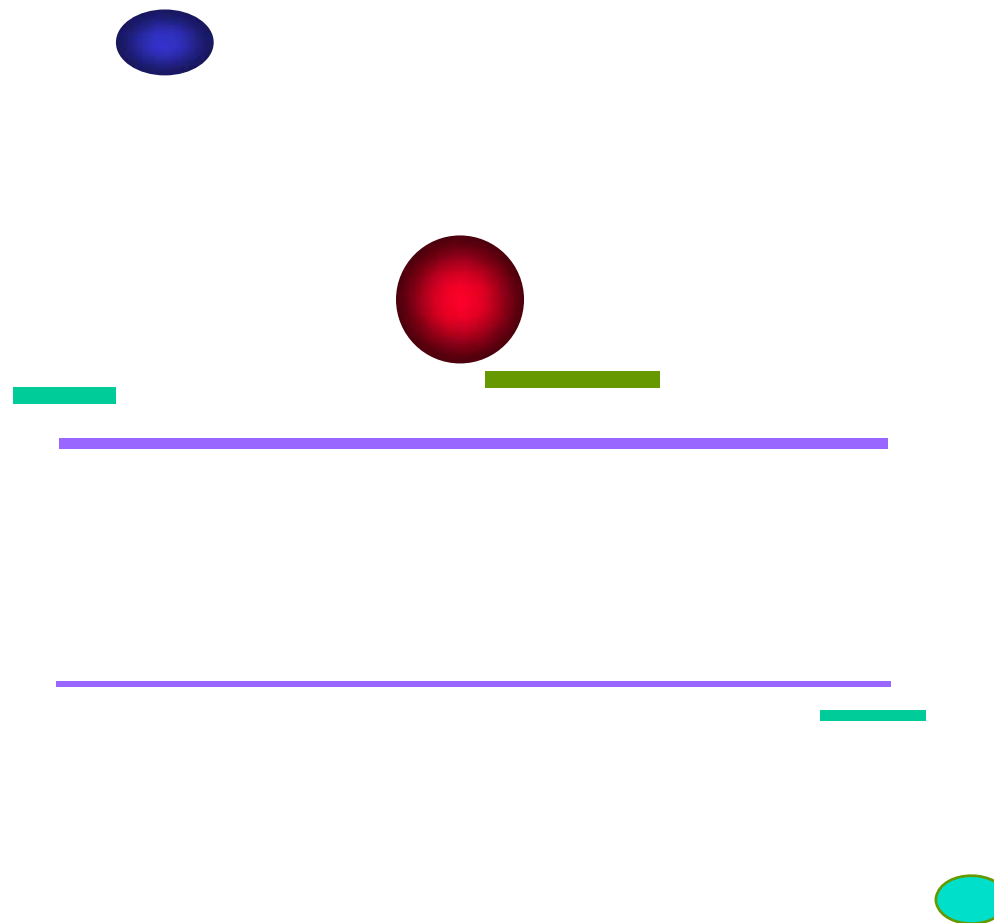
Template



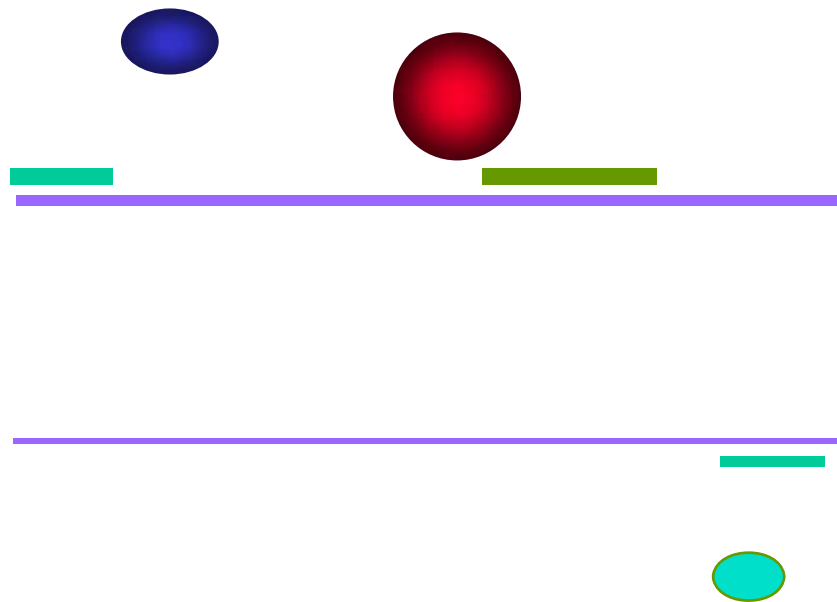
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



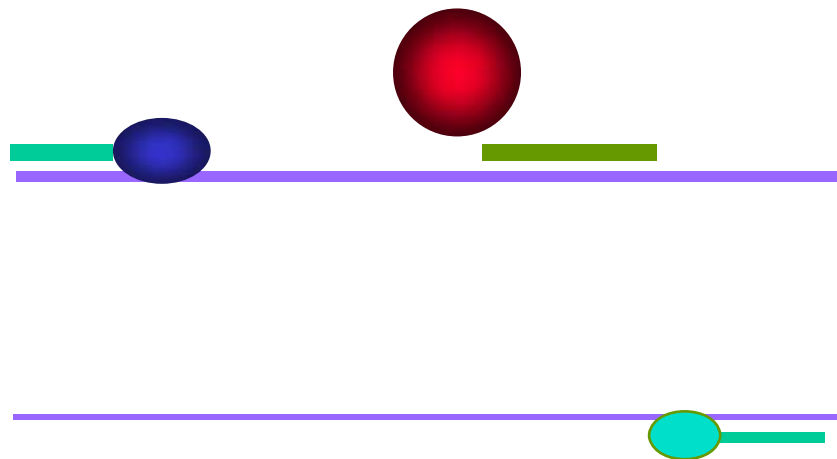
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



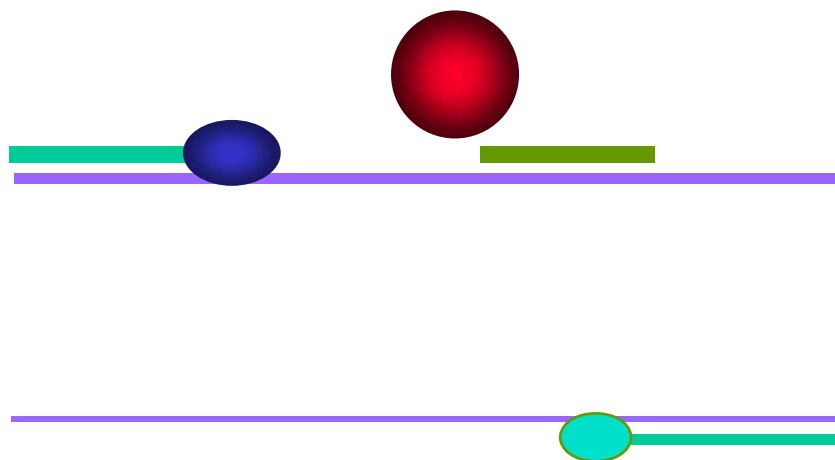
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



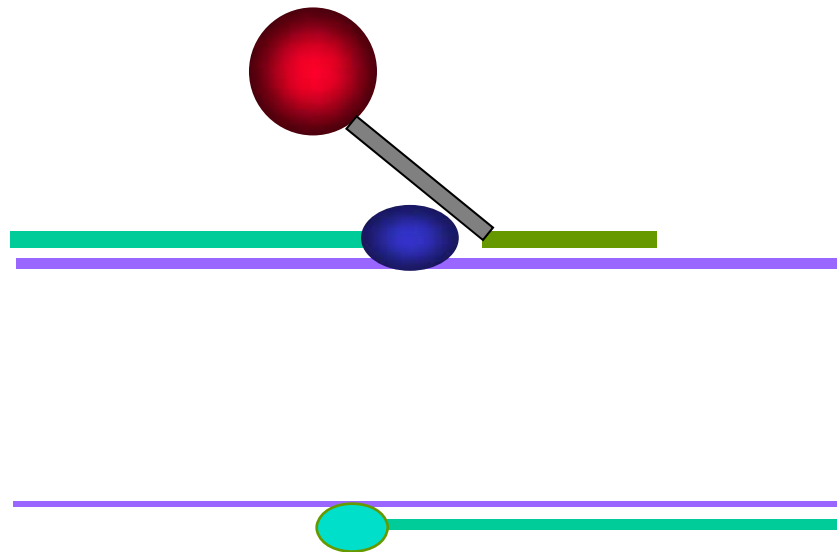
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



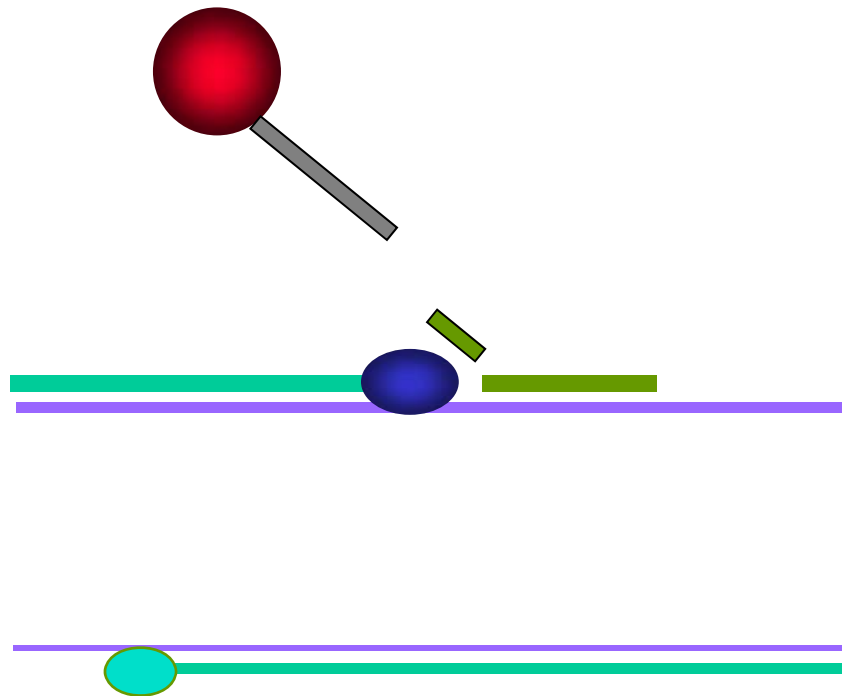
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



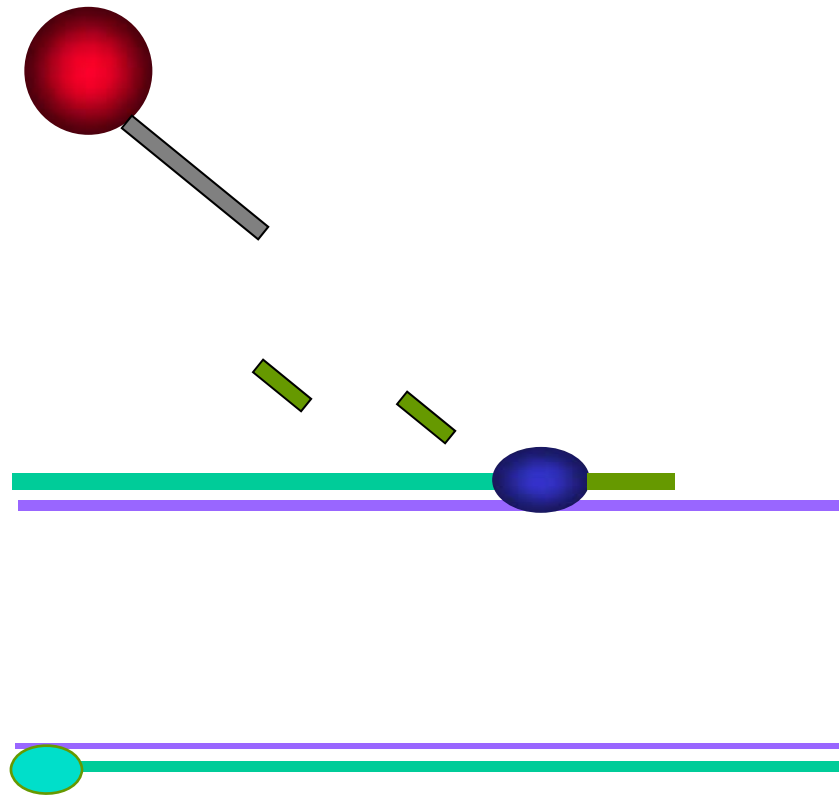
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



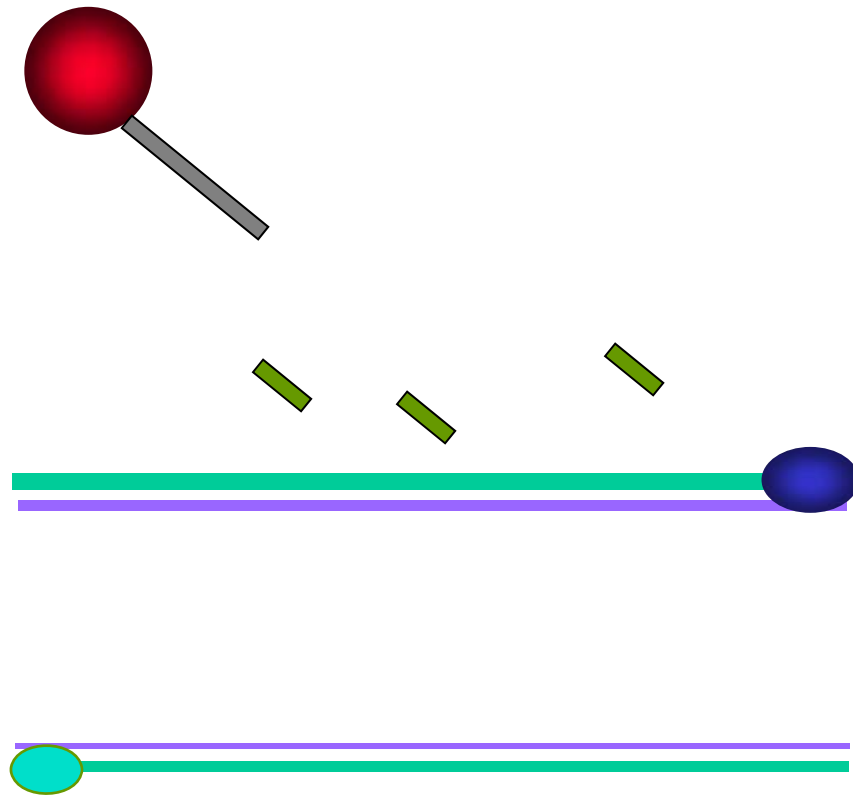
5' Nuclease Assay



5' Nuclease Assay



5' Nuclease Assay

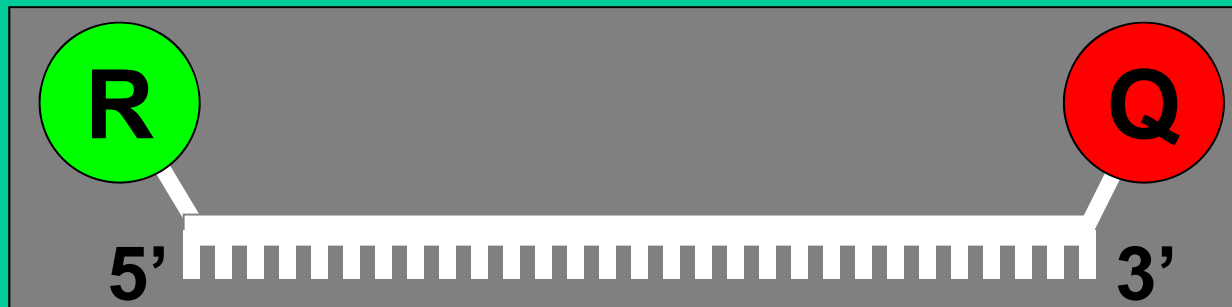


Sonde Fluorogeniche TaqMan

La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rivelazione e alla conseguente quantificazione di un "reporter" fluorescente, il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

5' REPORTER (R): fluorocromo ad **alta** energia che emette fluorescenza,
3' QUENCHER (Q): fluorocromo a **bassa** energia che spegne la fluorescenza del reporter.



Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q.

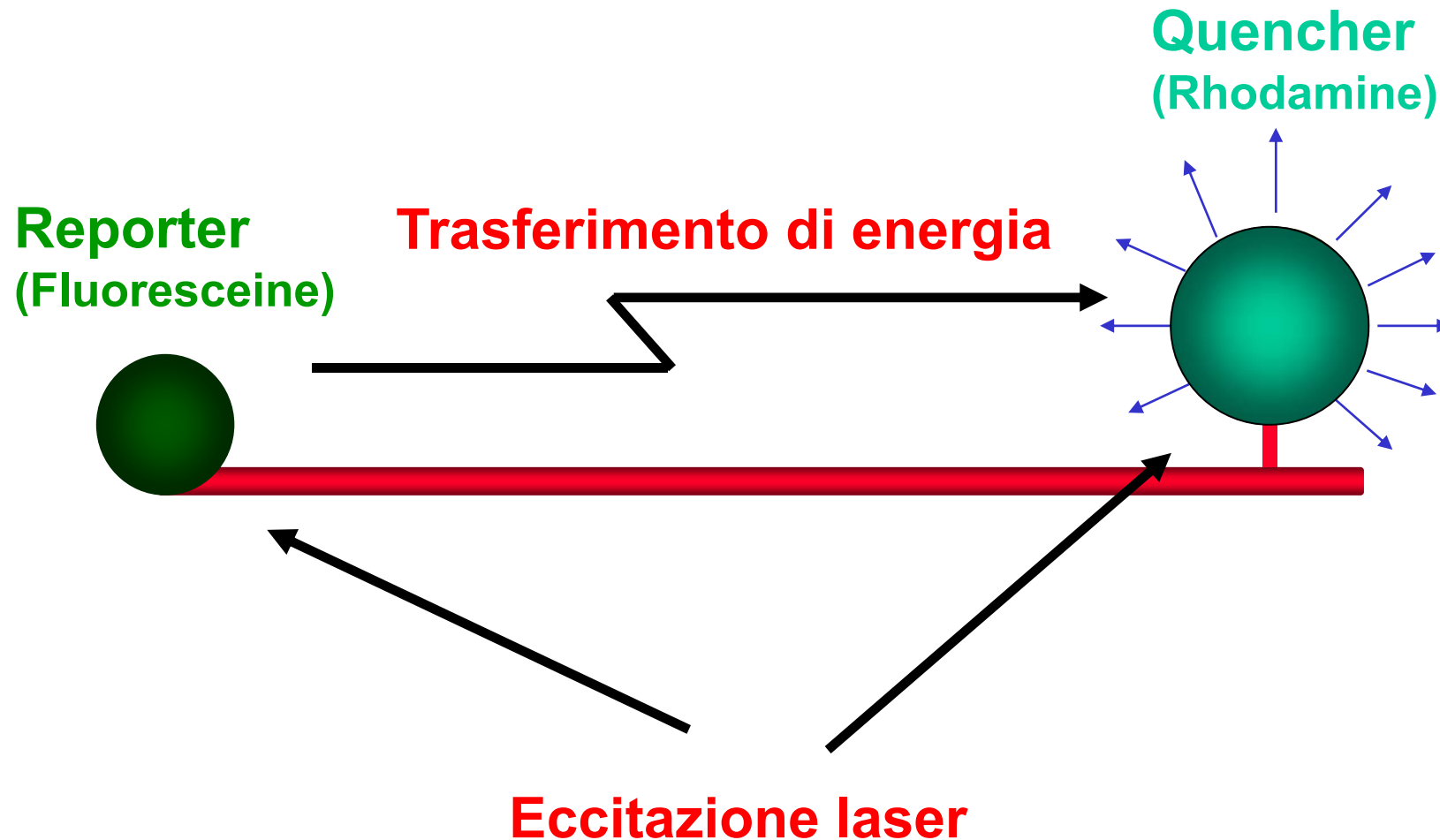
Sonde Fluorogeniche TaqMan

Viene disegnata la sonda gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due primer;

tale sonda, generalmente lunga 20-30 paia di basi, contiene un colorante fluorescente (Reporter), solitamente di colore verde, all'estremità 5' ed un colorante spegnitore (Quencher), di colore rosso, all'estremità 3',

in condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal quencher a bassa energia.

Sonde Fluorogeniche TaqMan



La distanza tra fluoroforo e quencher è tale da bloccare l'emissione di fluorescenza.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

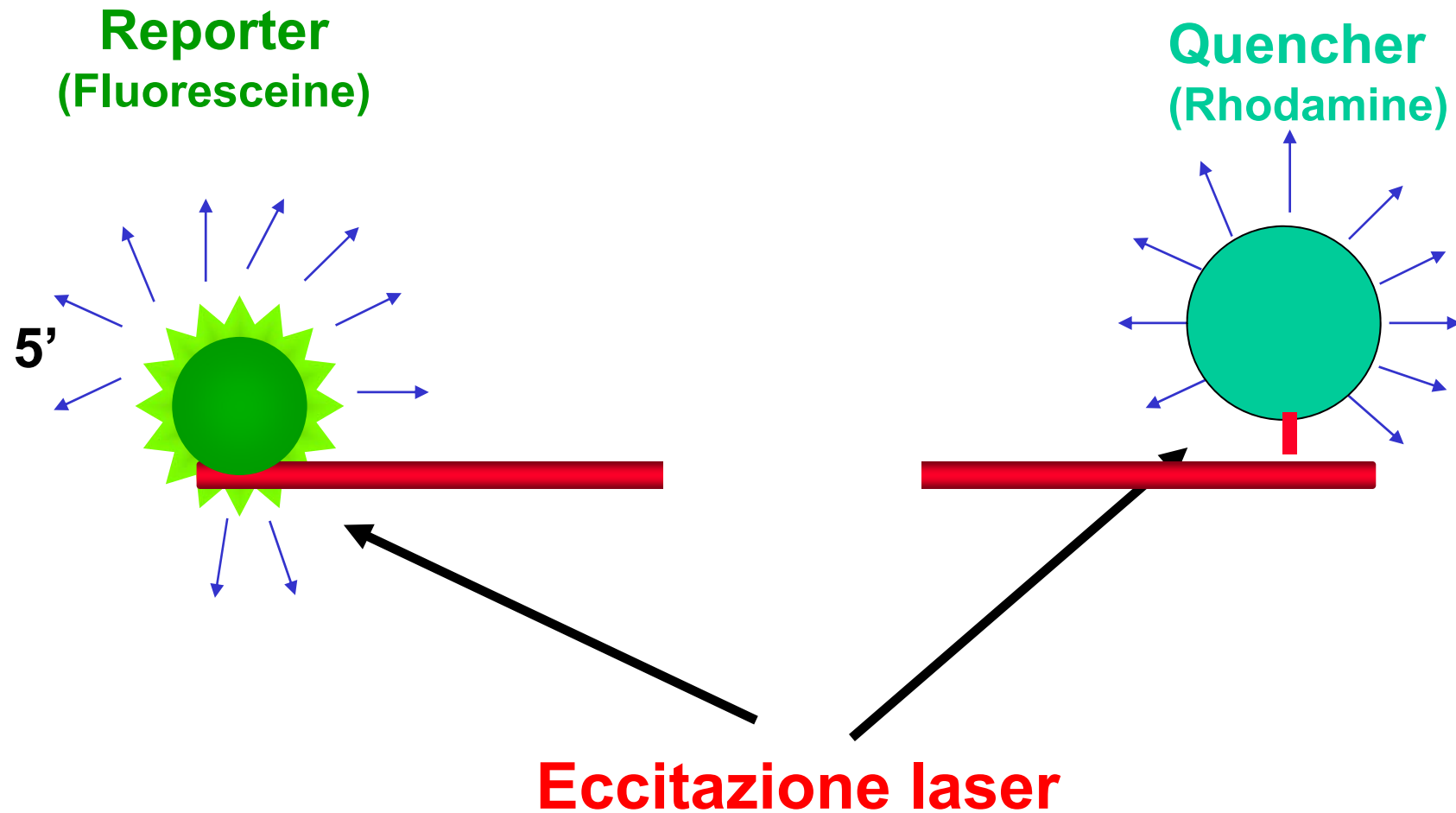
Fino a quando la sonda resta intatta, la vicinanza tra reporter fluorescente e quencher annulla l'emissione del segnale di fluorescenza, perché c'è un trasferimento di energia dal primo al secondo,

quando la DNA-polimerasi incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla;

l'allontanamento tra il reporter e il quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi a emettere fluorescenza.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

Sonda tagliata



Si libera una molecola di reporter per ogni copia di DNA duplicata.

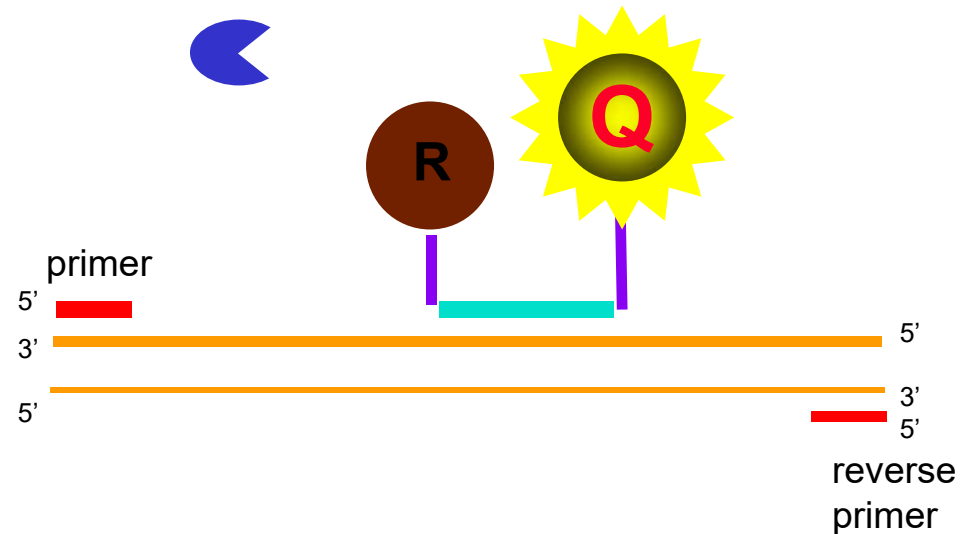
Sonde Fluorogeniche TaqMan

L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del reporter,

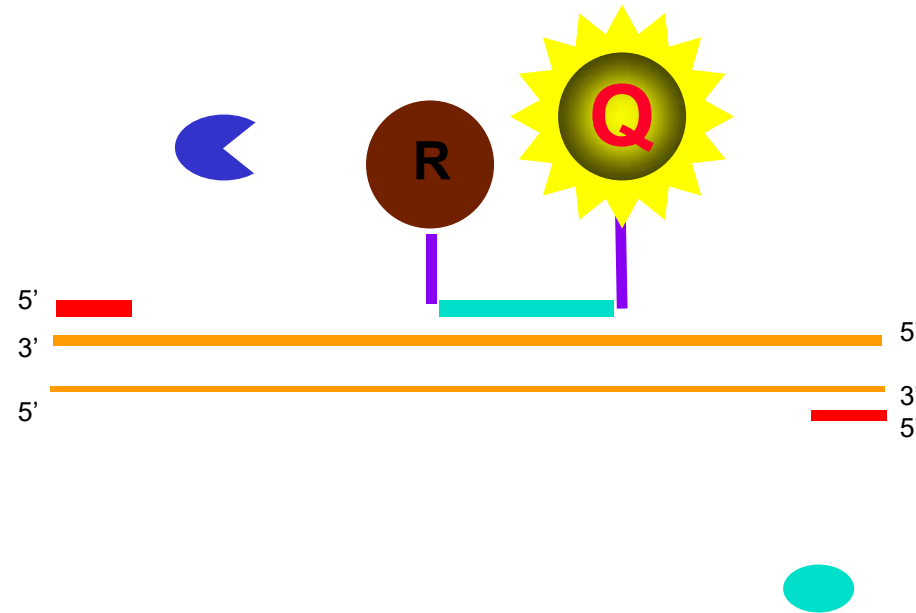
è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale, nella quale il primo incremento significativo di prodotti neo-sintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione;

infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza.

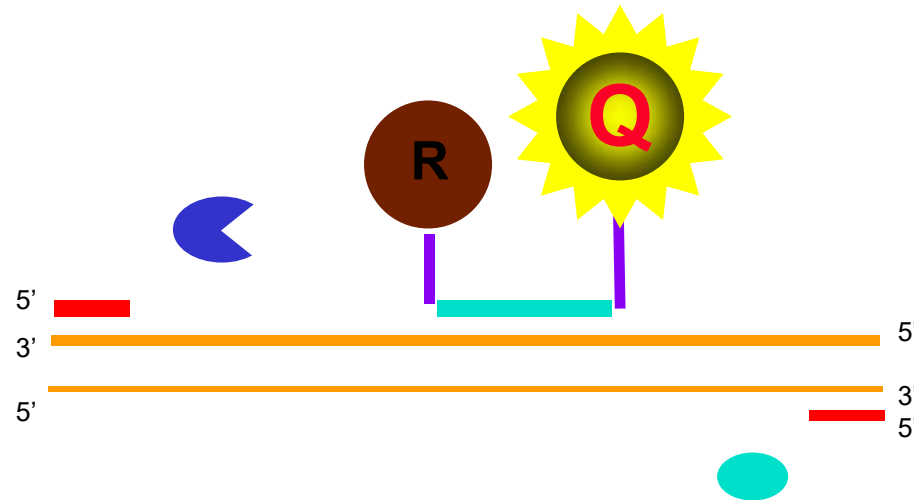
Sonde Fluorogeniche TaqMan



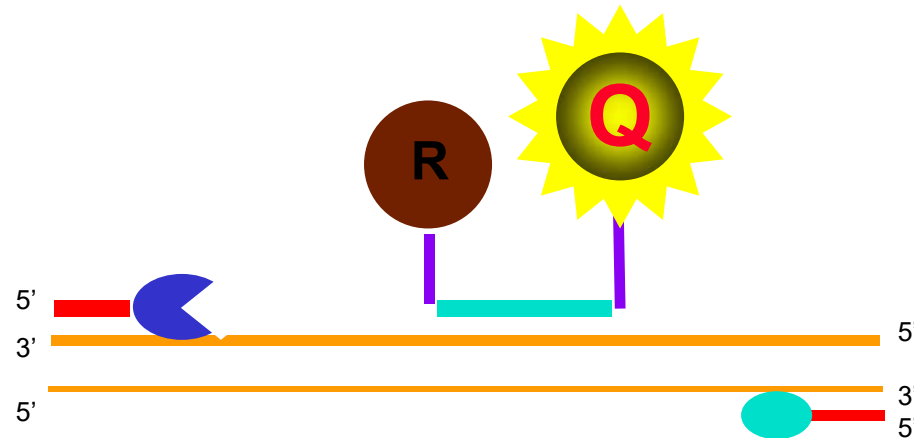
Sonde Fluorogeniche TaqMan



Sonde Fluorogeniche TaqMan



Sonde Fluorogeniche TaqMan



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione



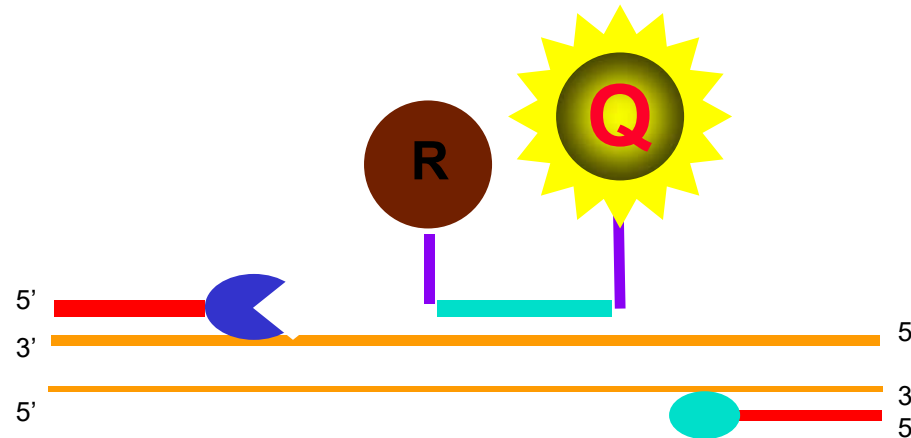
Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter

Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione



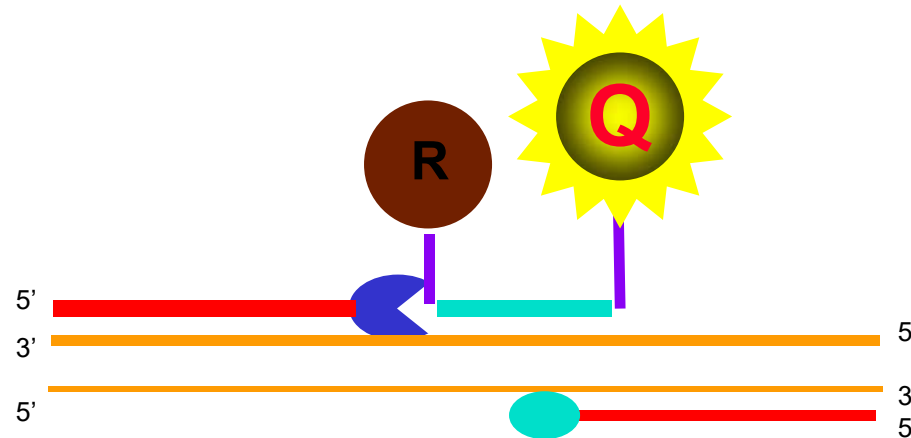
Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter

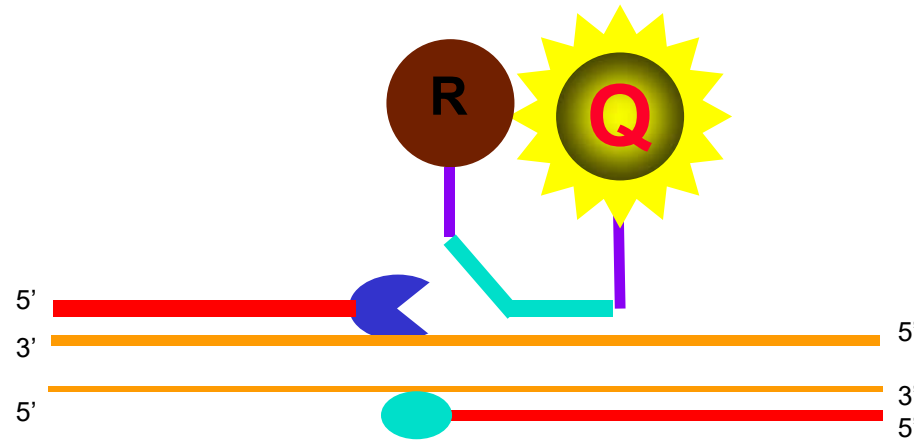
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Spiazzamento del probe

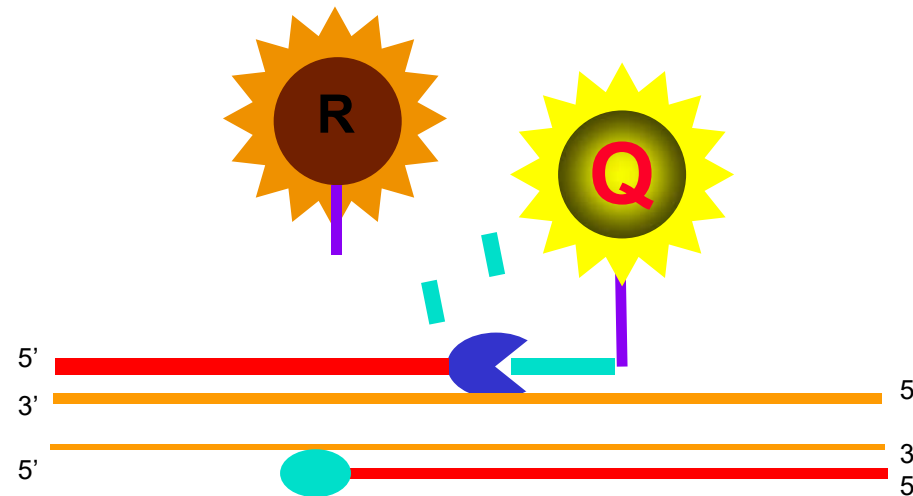
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

R = Reporter
Q = Quencher

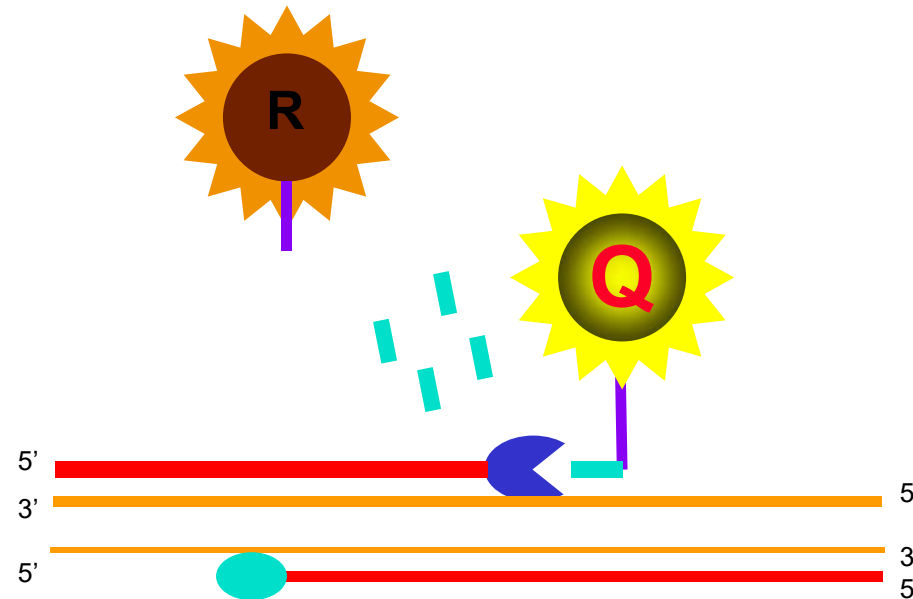


Durante l'estensione del primer la Taq polimerasi incontra la sonda ibridata che le sbarrava la strada e quindi la taglia utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, liberandosi la strada e portando così a termine la copiatura del frammento.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

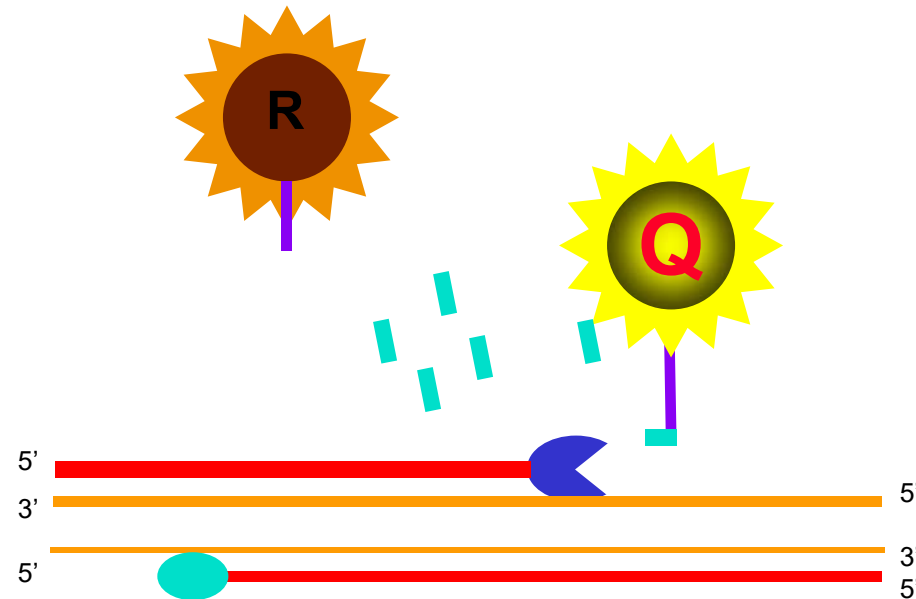
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

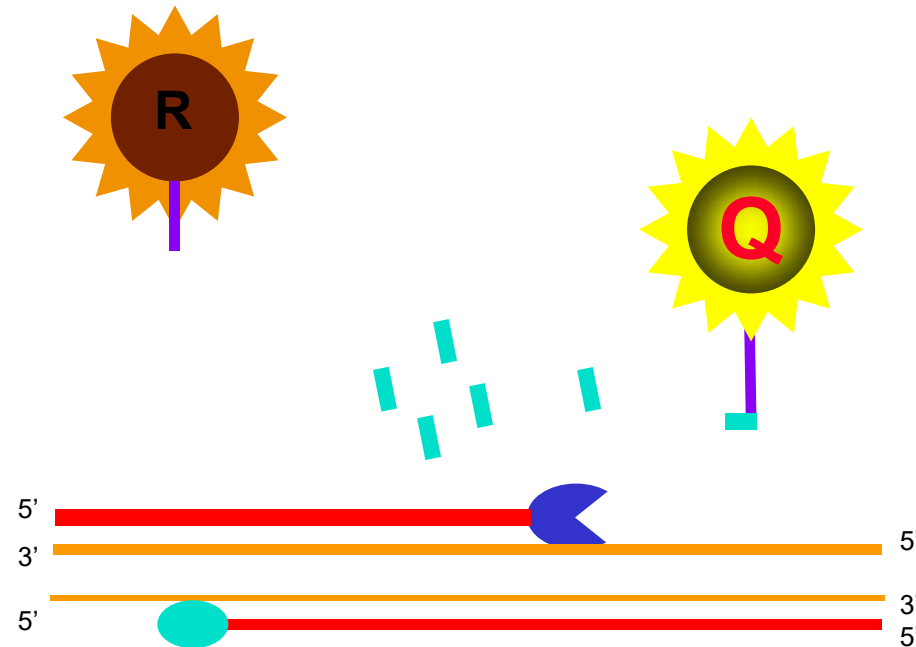
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

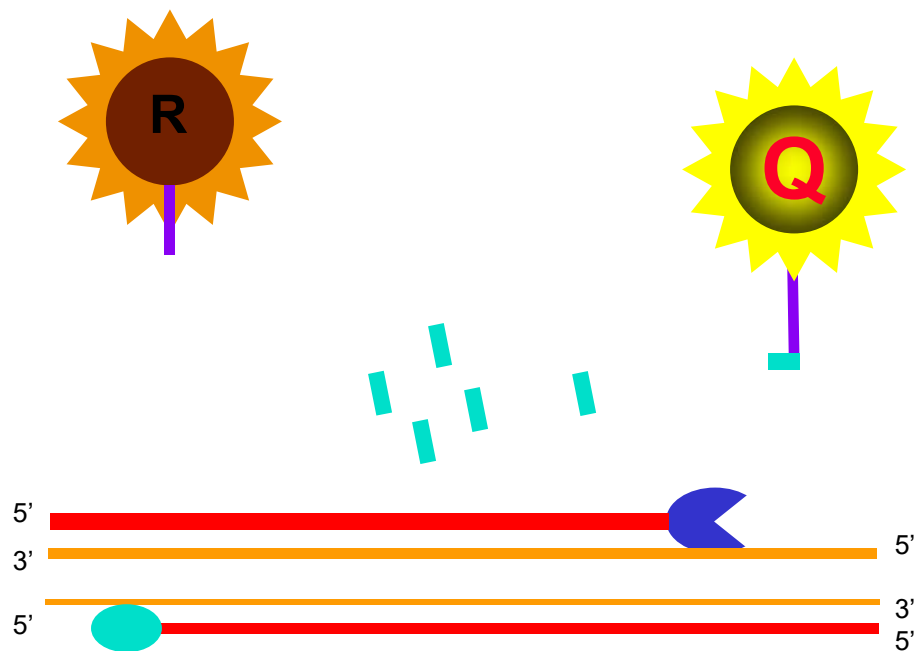
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

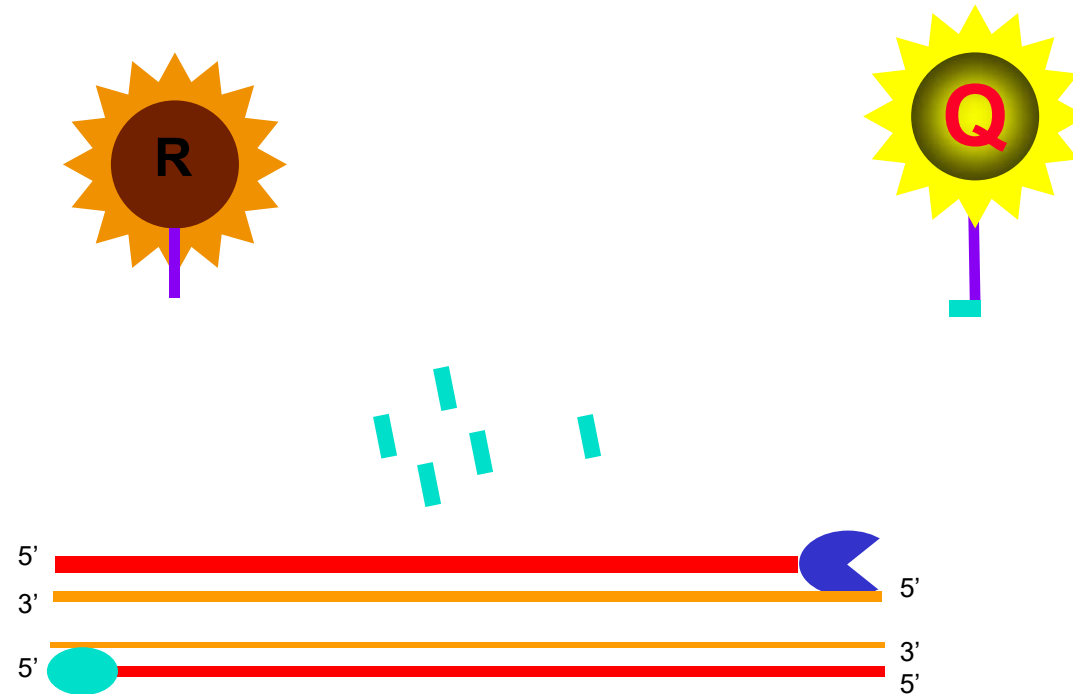
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Fine polimerizzazione

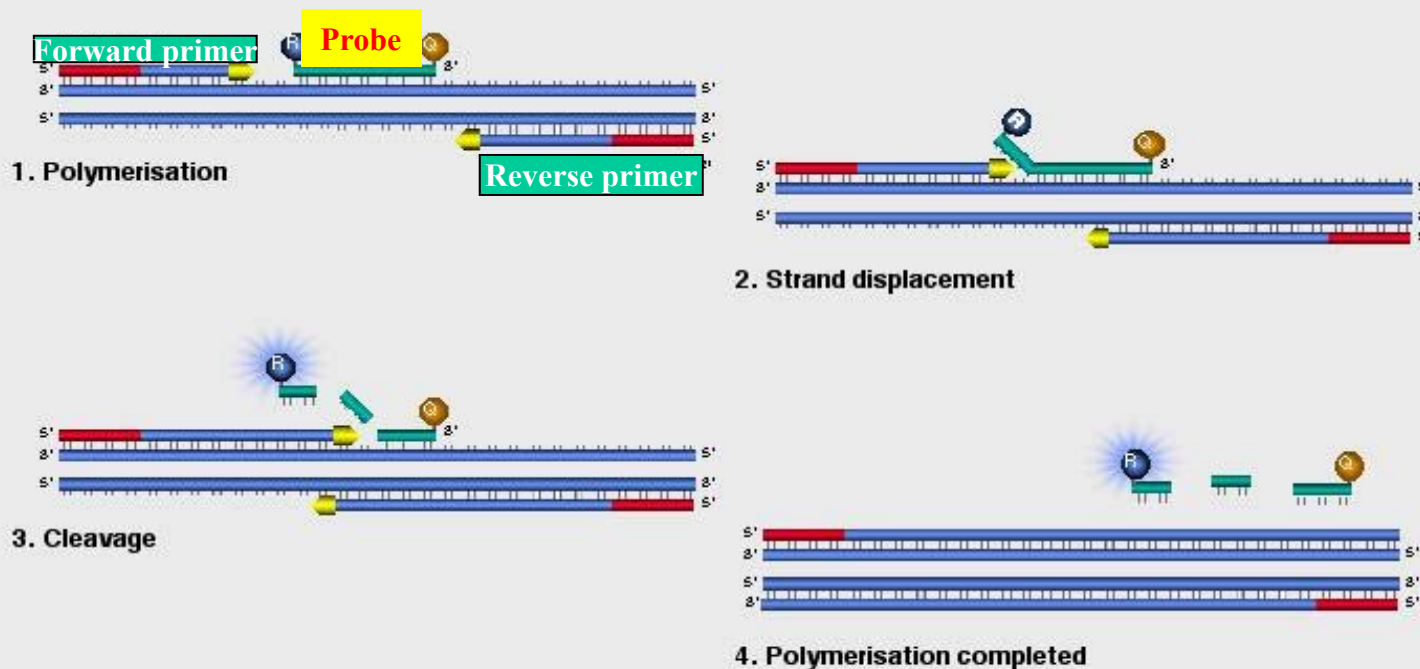
R = Reporter
Q = Quencher



Ogni volta che una sonda viene tagliata dalla Taq polimerasi si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dal detector.

L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati

Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan[®] chemistry)



R = Reporter
Q = Quencher

Sonde Fluorogeniche TaqMan

- Denaturazione: **nessuna fluorescenza**
- Annealing: **nessuna fluorescenza**
- Estensione: **la sonda è idrolizzata e si libera fluorescenza**
- Lettura della fluorescenza: **in fase di estensione.**

Sonda Taq Man (Riassunto)

Nel saggio una sonda fluorogenica complementare alla sequenza del DNA bersaglio viene aggiunta alla miscela di PCR.

Durante l'amplificazione la sonda si ibrida al template ed essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi.

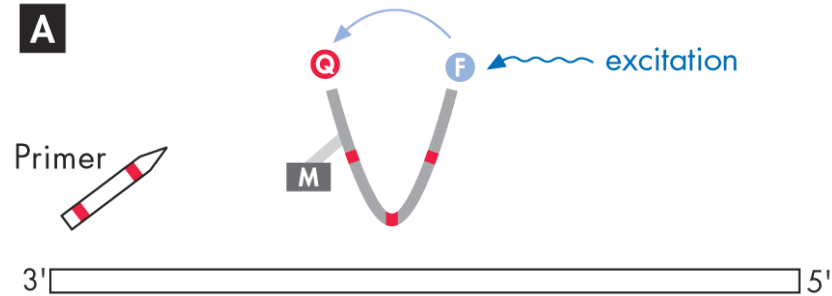
Durante l'estensione del primer la Taq incontra la sonda ibridata che le sbarrava la strada e la taglia utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, liberandosi la strada e portando così a termine la copiatura del frammento.

Ogni volta che una sonda viene tagliata dalla Taq polimerasi, si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dal detector.

La sonda taqMan è specifica, ne consegue l'impossibilità che siano rivelati prodotti amplificati aspecifici.

Sonde Fluorogeniche QuantiProbe

A



F Fluorophore

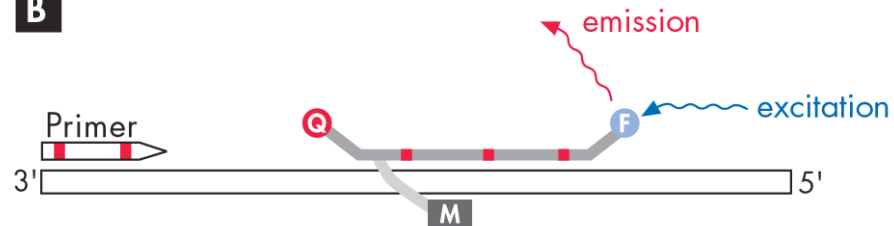
Q Quencher

M MGB → **Minor Groove Binding:**
previene l'idrolisi del
QuantiProbe

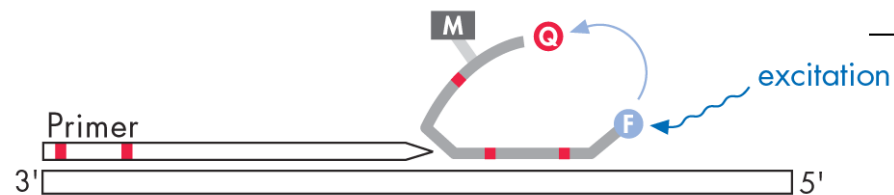
■ Superbases

Basi modificate che
permettono una maggiore
efficienza di annealing

B



C



Il probe non viene
idrolizzato dalla Taq a
causa della presenza del
MGB.

Sonde Fluorogeniche QuantiProbe

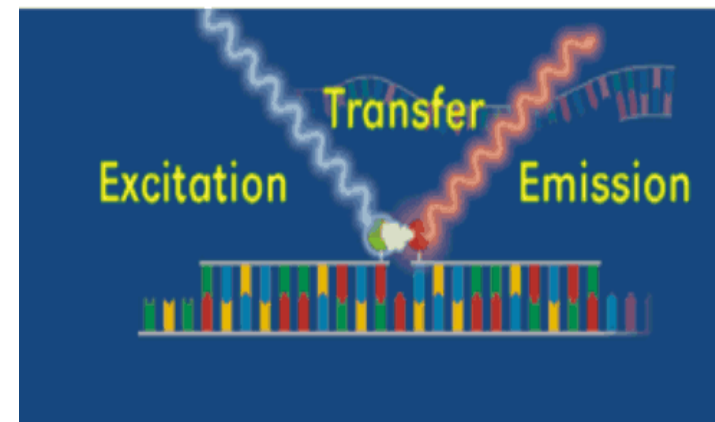
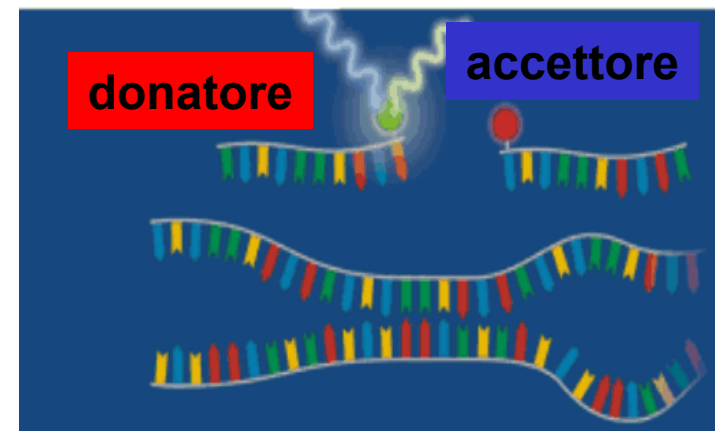
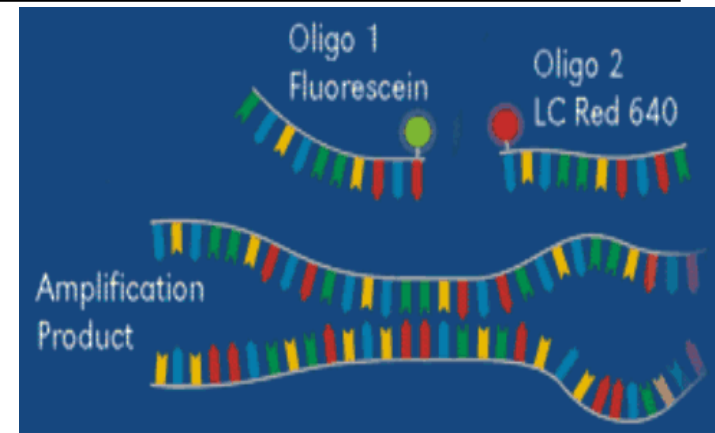
- Denaturazione: **nessuna fluorescenza**
- Annealing: **si sviluppa la fluorescenza**
- Estensione: **la sonda si dissocia dal target**
- Lettura della fluorescenza: **in fase di annealing.**

Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Esse sono simili alle sonde TaqMan, infatti si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate; ci sono però due sonde ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore).

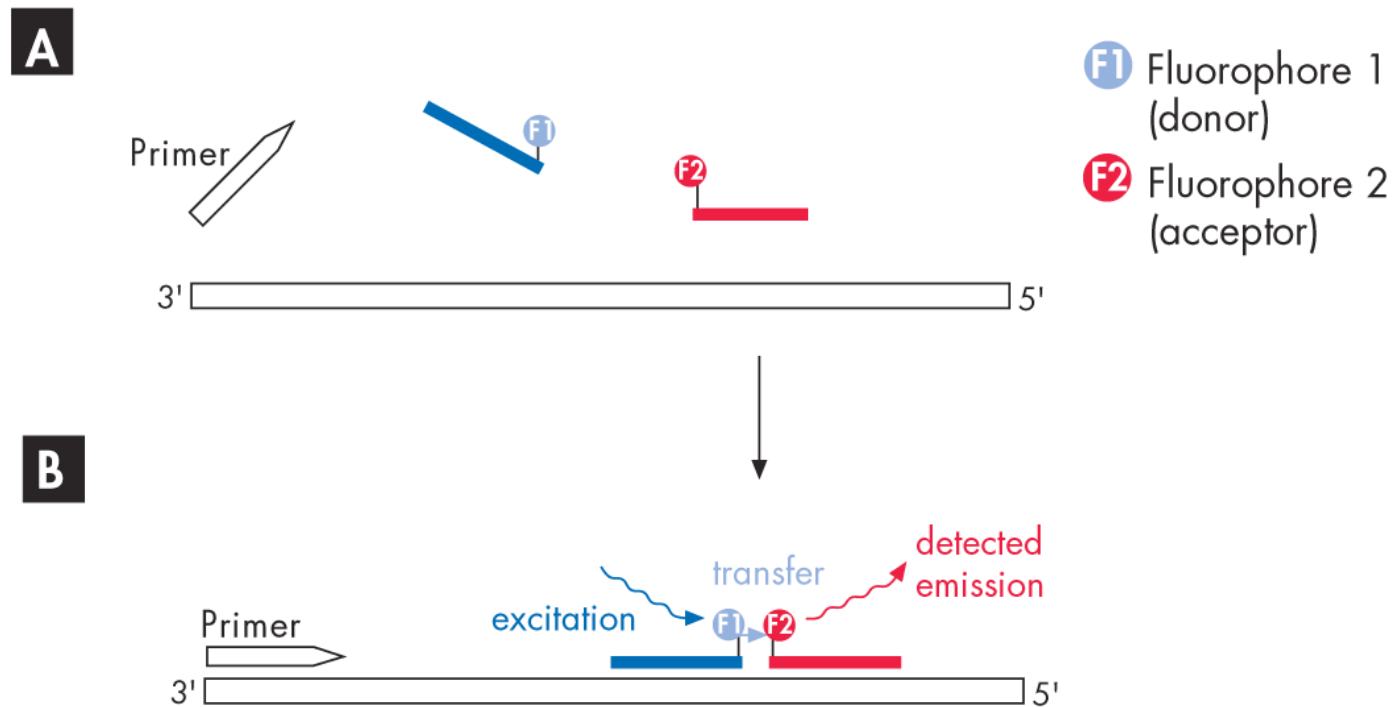
Quando le sonde non sono legate alle sequenze target, il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato.

Durante lo step di annealing PCR, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore, permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato.



Sonde Fluorogeniche FRET

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

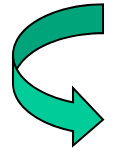


Sonde Fluorogeniche FRET

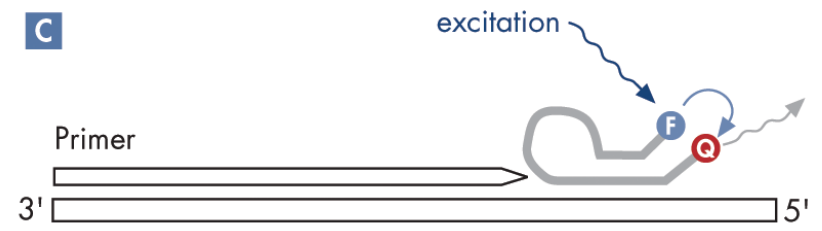
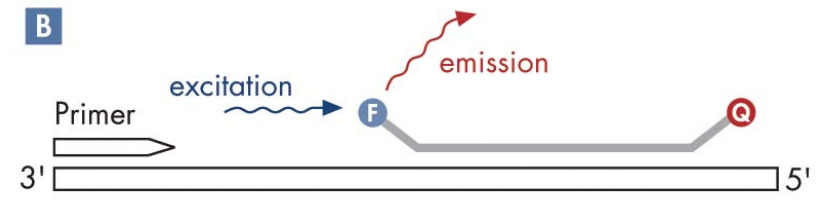
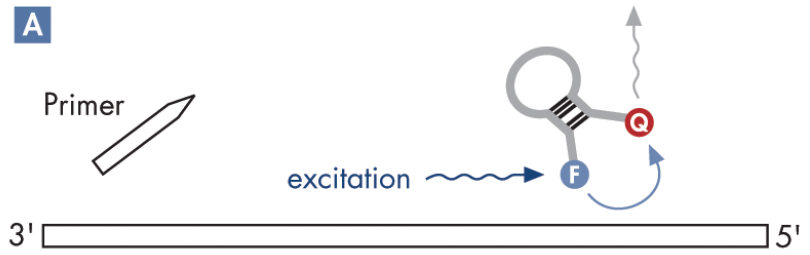
- Denaturazione: **nessuna fluorescenza**
- Annealing: **si sviluppa la fluorescenza se le due sonde ibridizzano alle sequenze target**
- Estensione: **le sonde sono idrolizzate**
- Lettura della fluorescenza: **in fase di annealing.**

Sonde Fluorogeniche Molecular Beacons

F Fluorophore **Q** Quencher

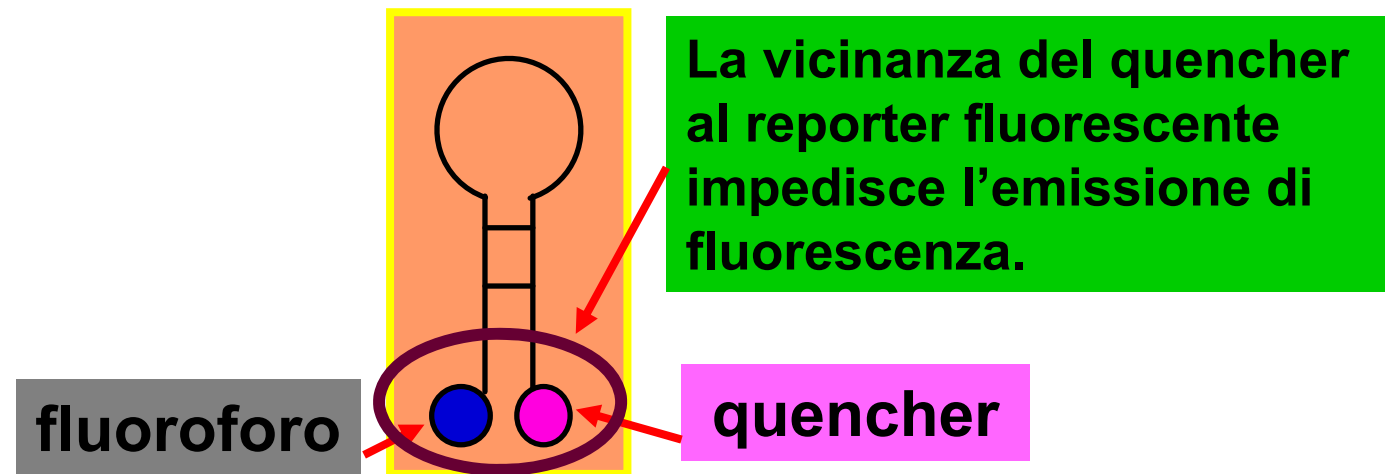


Sono sonde marcate con un fluorocromo al 5' e un quencher al 3'.
Le estremità del probe sono complementari, per cui in soluzione formano un'ansa a forma di stelo, che mantiene il fluoroforo e il quencher strettamente vicini.



Sonde Fluorogeniche Molecular Beacons

I "molecular beacons" contengono un fluoroforo e un quencher non fluorescente alle estremità opposte di un oligonucleotide, che sono disegnate in modo da essere complementari tra loro formando una struttura stem-loop,



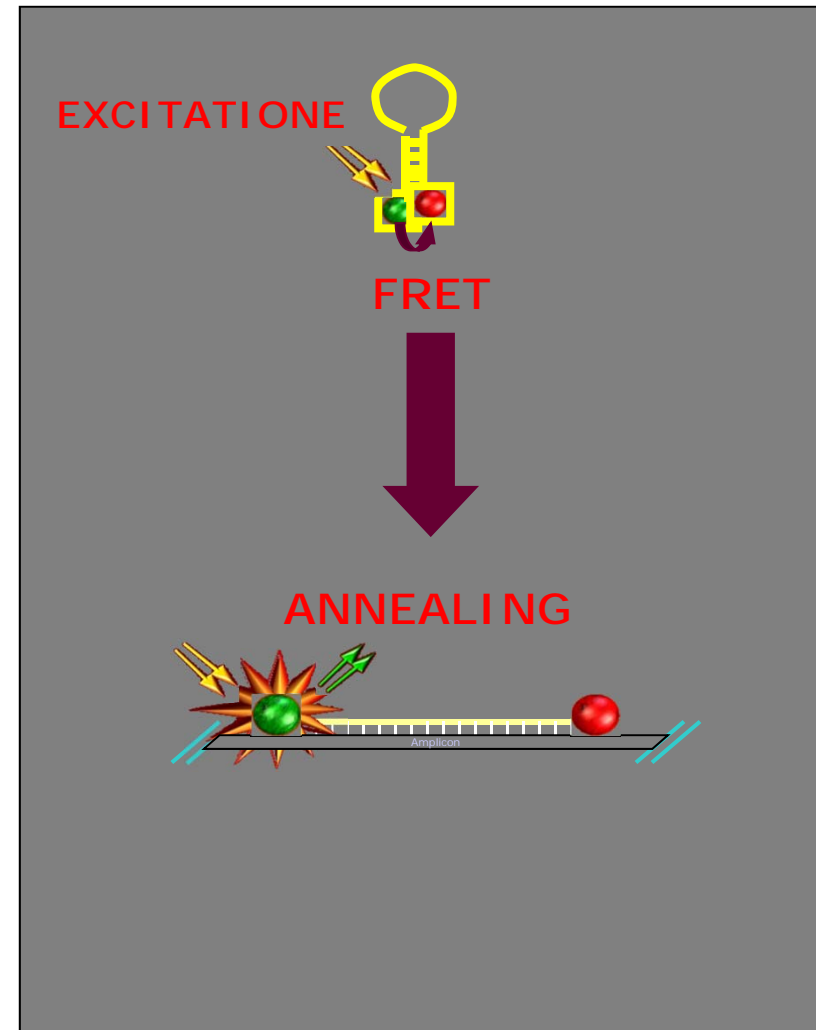
il loop è complementare ad una sequenza all'interno del prodotto amplificato; in assenza della sequenza bersaglio, la sonda rimane chiusa e il quencher blocca l'emissione del vicino fluoroforo.

Sonde Fluorogeniche Molecular Beacons

Durante lo step di annealing PCR la sonda ibridizza alla sua sequenza target: ciò separa il colorante fluorescente dal quencher, producendo un segnale fluorescente,

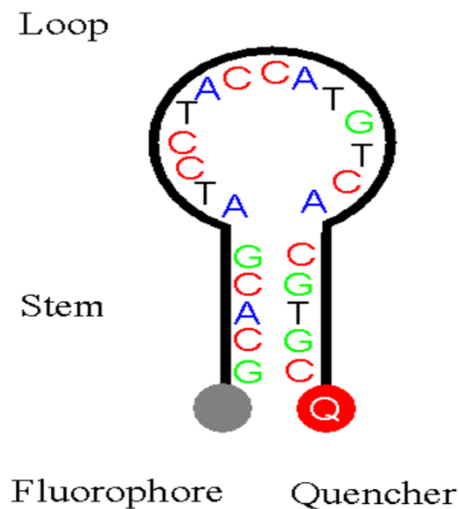
la quantità di fluorescenza prodotta a ogni ciclo dipende dalla quantità di prodotto specifico in quel dato momento;

a differenza delle sonde TaqMan, le molecular beacons non vengono distrutte durante la reazione di amplificazione, per cui possono reibridizzarsi durante il successivo ciclo.



Sonde Fluorogeniche Molecular Beacons

- Durante la denaturazione **non si ha fluorescenza**
 - Durante l'annealing **si sviluppa fluorescenza solo se la sonda ibridizza con il target specifico**
 - durante l'estensione **la sonda si dissocia dal target**
 - la lettura della fluorescenza avviene **nella fase di annealing**
- è sufficiente il mismatch (mancanza di corrispondenza) di una sola base per impedire l'ibridazione con il target.**



Sonde della Real-Time PCR

Table 1. Dyes Commonly Used for Quantitative, Real-Time PCR

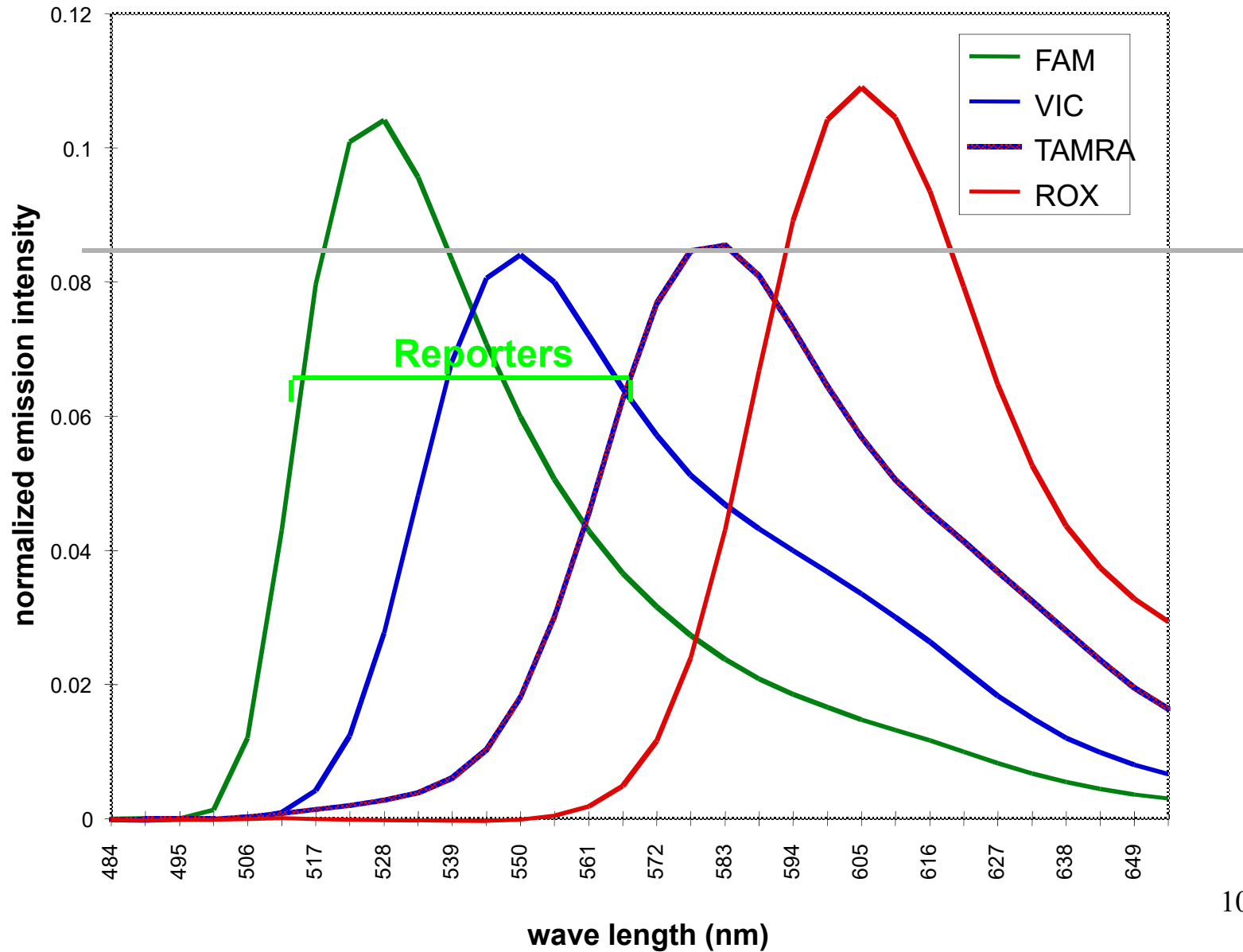
Dye	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)*
Fluorescein	490	513
Oregon Green	492	517
FAM	494	518
SYBR Green I	494	521
TET	521	538
JOE	520	548
VIC	538	552
Yakima Yellow™	526	552
HEX	535	553
Cy [®] 3	552	570
TAMRA	560	582
Cy3.5	588	604
ROX	587	607
Texas Red	596	615
LightCycler-Red 640 (LC640)	625	640
Cy5	643	667
Cy5.5	683	707

* Emission spectra may vary depending on the buffer conditions.

La possibilità di avere diversi coloranti fluorescenti legati alle sonde permette di effettuare Real-Time PCR multiplex, in modo da analizzare più geni in un campione.

E' necessario scegliere il colorante in funzione dei loro spettri di emissione e assorbimento, in modo che siano sufficientemente distinti l'uno dall'altro.

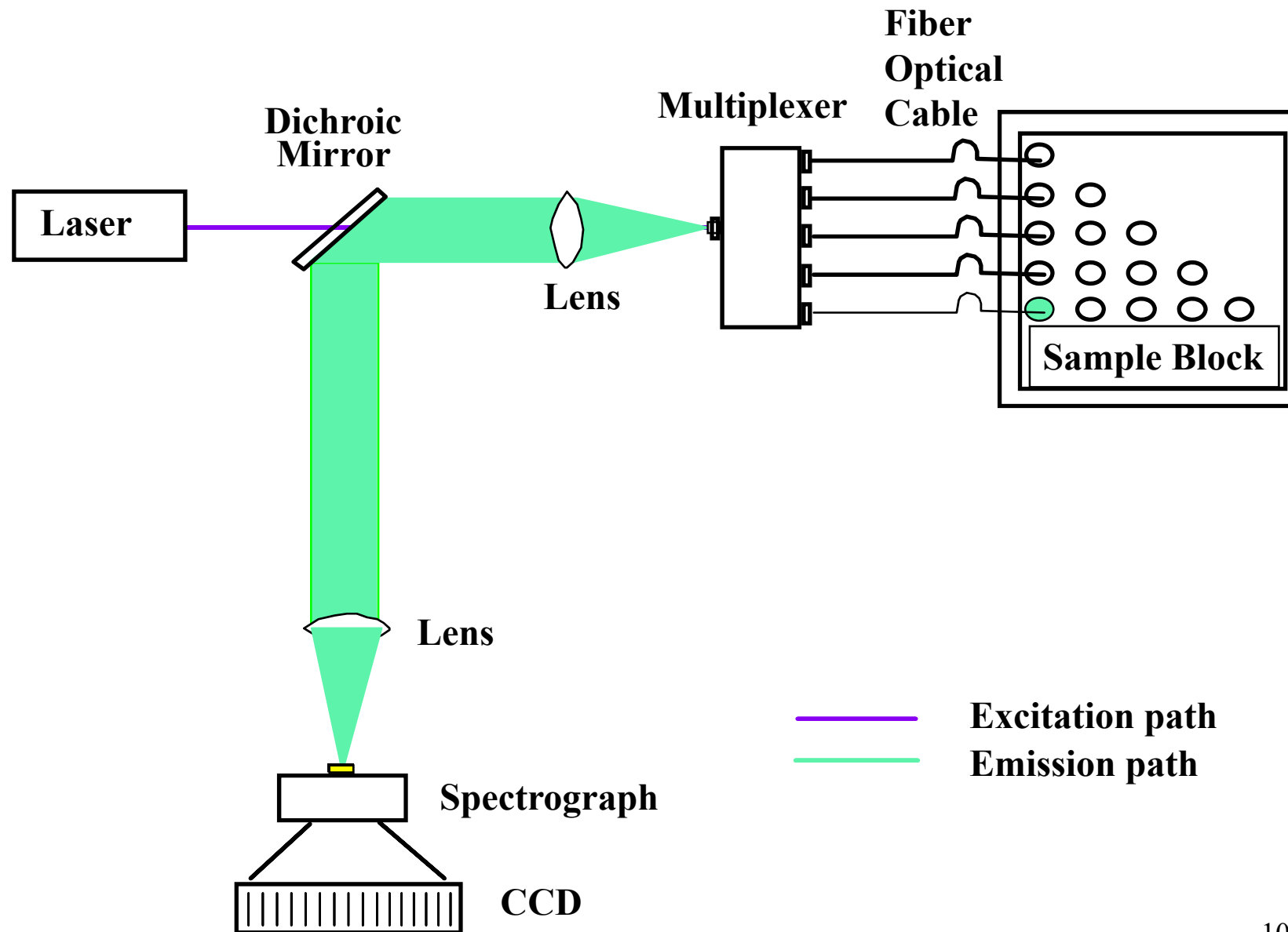
Sonde Fluorogeniche TaqMan



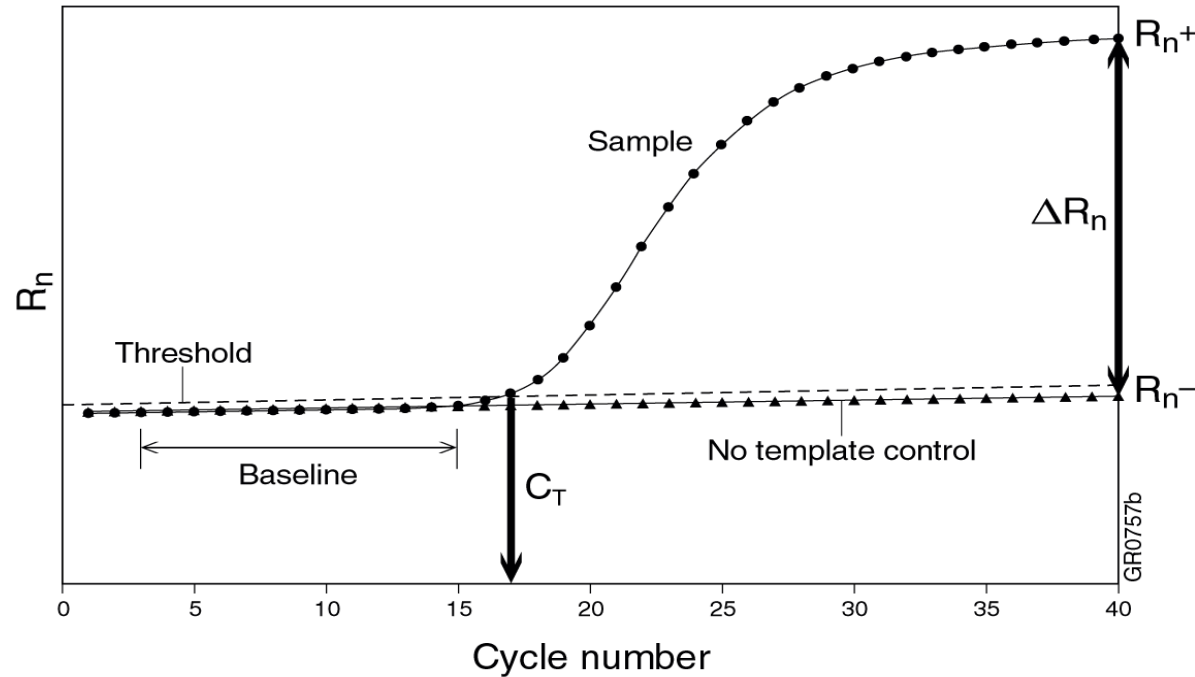
Real-Time PCR: Strumentazione



Real-Time PCR: Strumentazione



Interpretazione dei Risultati



Linea di base (baseline): valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato

Linea soglia (Threshold): è scelta dall'operatore in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale

Ciclo soglia: è il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione comincia ad aumentare velocemente; è maggiore rispetto a quello della linea soglia

Interpretazione dei Risultati

- Nella miscela di reazione è presente un colorante chiamato Passive Reference. Funziona da standard interno della reazione, che permette di normalizzare le variazioni del segnale fluorescente dovuto a cambiamenti della concentrazione o del volume.
- Il valore che si misura è il rapporto dell'intensità di emissione del colorante reporter con quella del riferimento (R_n , Reporter Normalizzato).

$$R_n^+ = \frac{\text{Emission Intensity of Reporter}}{\text{Emission Intensity of Passive Reference}}$$

PCR with template

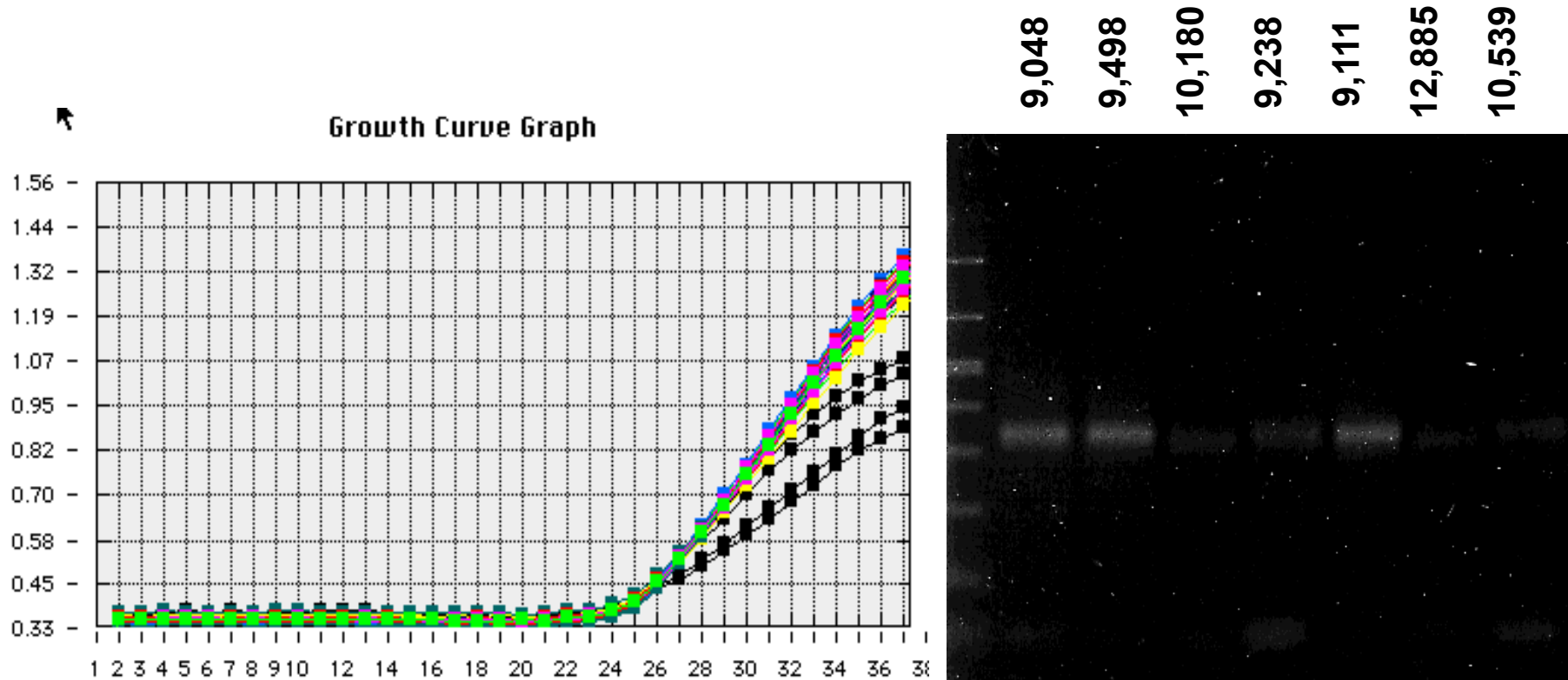
$$R_n^- = \frac{\text{Emission Intensity of Reporter}}{\text{Emission Intensity of Passive Reference}}$$

PCR without template or early cycles of a real-time reaction

- R_n^+ è il valore di una reazione che comprende il template;
- R_n^- è il valore del campione che non reagisce (miscela senza template).

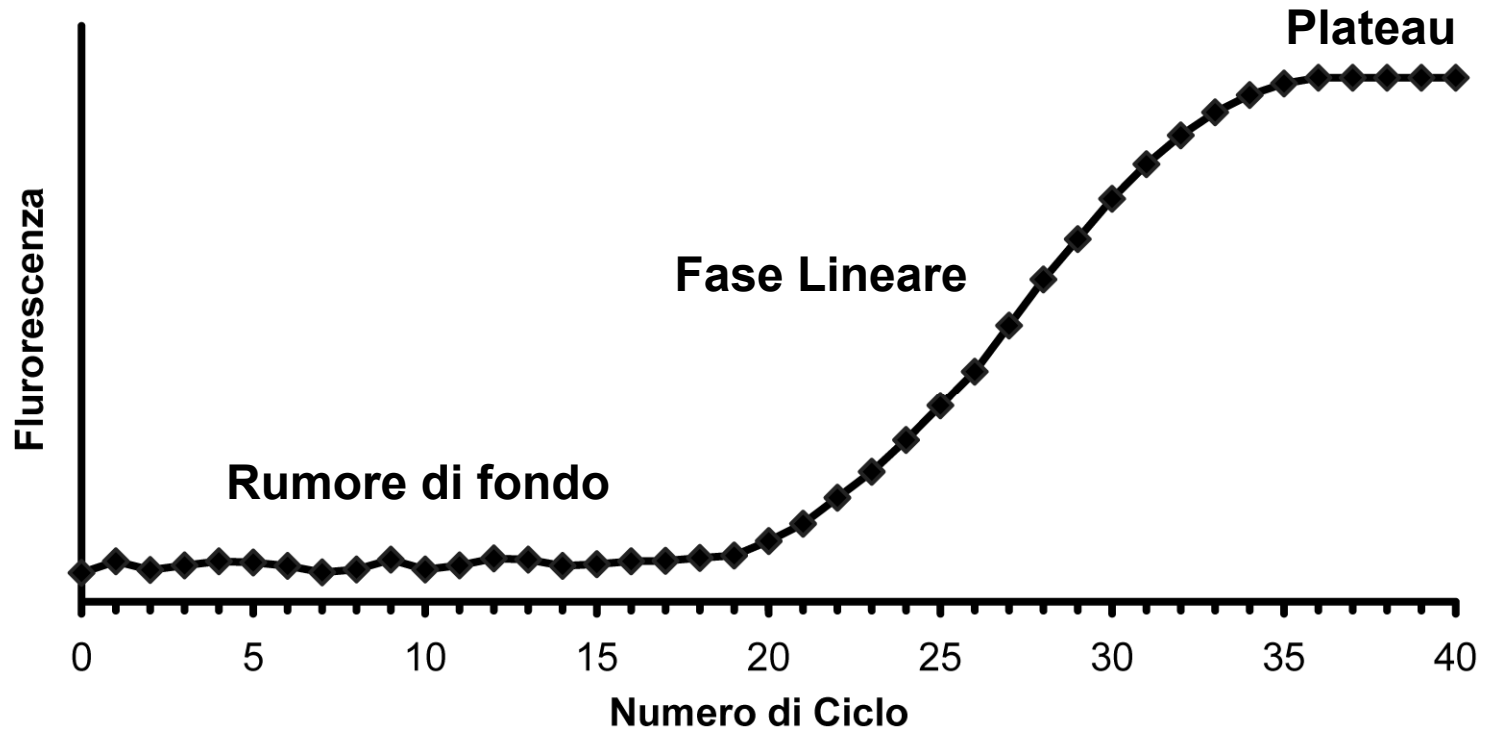
$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

Real-Time PCR



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui CT (Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale

Real-Time PCR



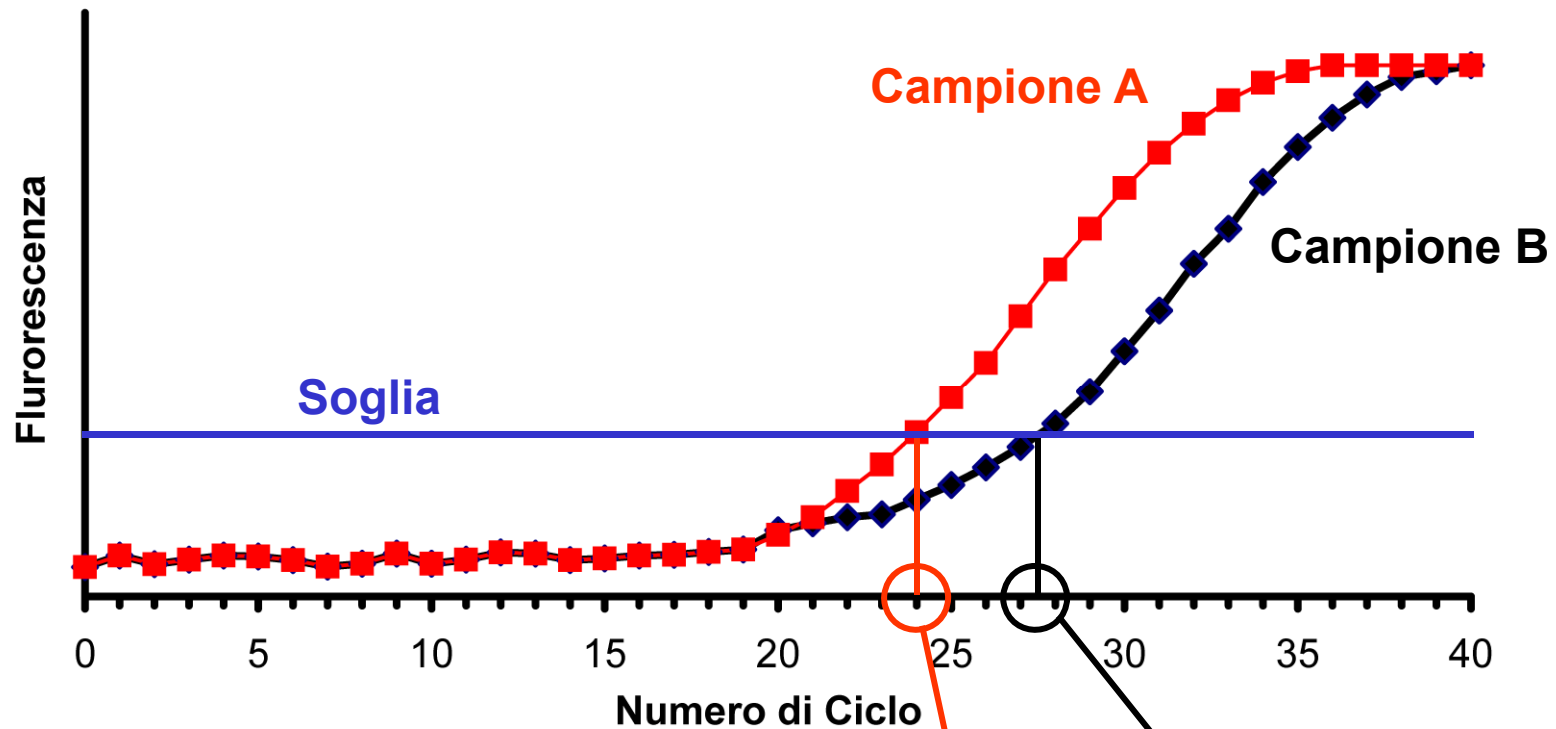
Real-Time PCR

In una reazione tipica il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione,

poiché sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoideo,

nei cicli finali i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi.

Real-Time PCR



Ciclo Soglia Campione A: 24
Ciclo Soglia Campione B: 27.5

Ciclo Soglia Campione A
Ciclo Soglia Campione B

Più piccolo è il valore di ciclo soglia, maggiore sarà la quantità di DNA target iniziale presente nel campione.

Real-Time PCR

Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct),

il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare,

la pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR;

la quantità iniziale di DNA è inversamente proporzionale al numero di cicli necessario per la rivelazione (Ciclo soglia, Ct).

Applicazioni della PCR Quantitativa

Espressione Genica: cambiamenti nei livelli di mRNA
Terapia Farmacologica: effetto dei farmaci sull'mRNA
Prodotti transgenici: geni aggiunti alla linea germinale
**Danno al DNA: effetto di sostanze chimiche e radiazioni
sull'integrità del DNA**
Controllo di Qualità: presenza di campioni non voluti
Quantizzazione di Patogeni: presenza di virus e batteri.

Quantificazione con Real-Time PCR

La Real-Time PCR permette la quantificazione di un campione di acido nucleico (DNA, RNA, cDNA).

La quantificazione relativa del trascritto di mRNA determina il cambiamento dell'espressione di un gene rispetto ad un altro gene (calibratore), o rispetto alla quantità presente in tessuti diversi.

Durante il saggio di RT-PCR il ciclo soglia del target è comparato direttamente con quello del calibratore, per cui si può assegnare una minore o una maggiore quantità di mRNA rispetto al calibratore.

La quantificazione assoluta del trascritto di mRNA permette la determinazione precisa della quantità di mRNA per cellula, per RNA totale o per massa di tessuto.

Quantificazione con Real-Time PCR

Per la quantificazione assoluta è necessaria una curva di calibrazione, usando ad es. come standard DNA plasmidico, la cui concentrazione sia nota;
si deve essere certi che l'efficienza della PCR sia la stessa per i campioni noti e per quelli incogniti.

Sono quindi richiesti:

- 1) standard a concentrazioni note
- 2) la creazione di una curva standard

Quantificazione con Real-Time PCR

La quantificazione assoluta determina il numero esatto di molecole di acido nucleico presente in un campione, é importante l'accuratezza.

Viene usata per:

1. la quantizzazione di virus,
2. i prodotti transgenici,
3. la terapia genica.

La quantificazione relativa permette una comparazione fra diversi target, é importante la precisione.

Viene usata per:

1. l'espressione genica,
2. la terapia farmacologica.

Prevenzione da Contaminazione

Esistono tre tipi di contaminazioni relativi alla PCR

1. **contaminazione da “carry-over”**: molecole di DNA provenienti da amplificazioni precedenti possono essere amplificate nuovamente,
2. **contaminazione crociata o “cross-contaminazione”**: durante l’allestimento della reazione un campione contamina gli altri,
3. **contaminazione nella fase di rivelazione**: un campione può contaminare un altro durante il caricamento sul gel di agarosio.

Prevenzione da Contaminazione

E' necessario, quanto più possibile, tenere separate l'area di preparazione della PCR da quella dove vengono analizzati i risultati o dove vengono preparati i campioni.

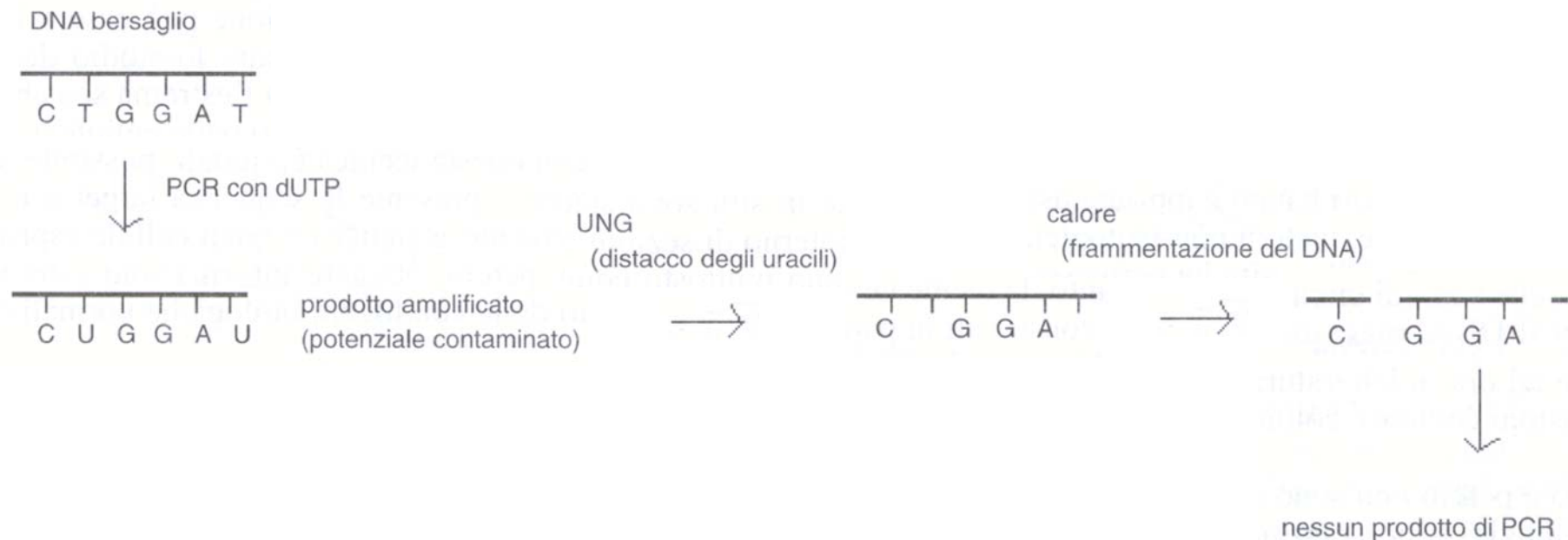
AREE PRE-PCR	(1) Preparazione del campione
	Separazione del siero Isolamento dei linfociti periferici Lisi cellulare Estrazione acido nucleico
	(2) Preparazione della reazione
	Preparazione del tampone Preparazione aliquote dei reagenti Allestimento della reazione
AREA POST-PCR	(3) Rivelazione del prodotto
	Elettroforesi su gel Analisi di restrizione Tecniche di ibridazione

Prevenzione da Contaminazione

Sono state sviluppate strategie per minimizzare il rischio di contaminazioni da carry-over.

L'inattivazione del DNA amplificato può avvenire durante l'allestimento di una nuova reazione.

Questa strategia è basata sul principio di riparazione del DNA presente nelle cellule.



UNG = uracile N-glicosilasi