

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.

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. Poichè il sistema non può essere controllato, non sono utilizzati in vitro.

Enzimi di tipo II



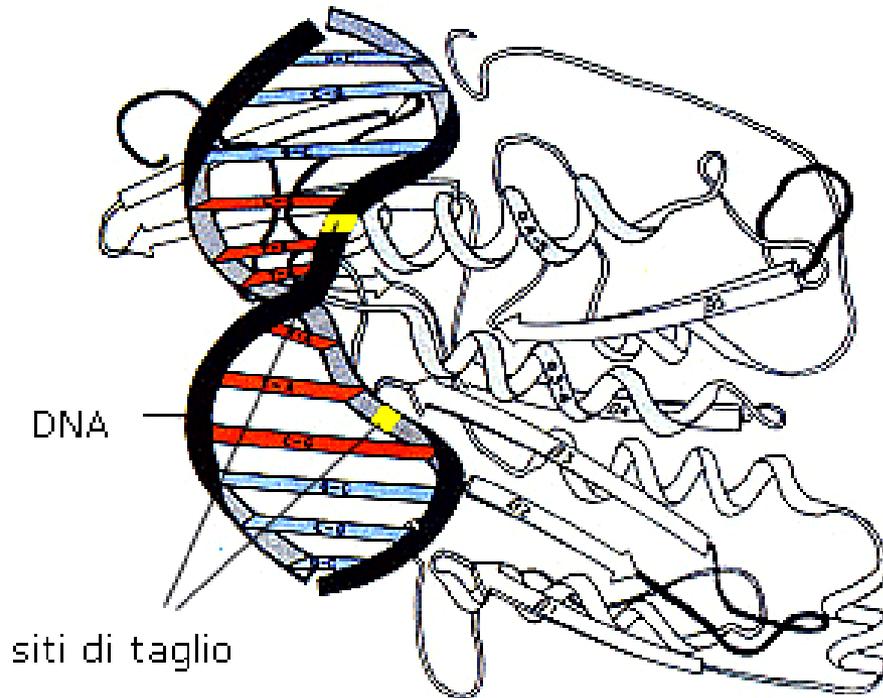
tagliano solamente nella sequenza di riconoscimento, con modalità differenti; non hanno associata un'attività metilasi.

Enzimi di Restrizione

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.



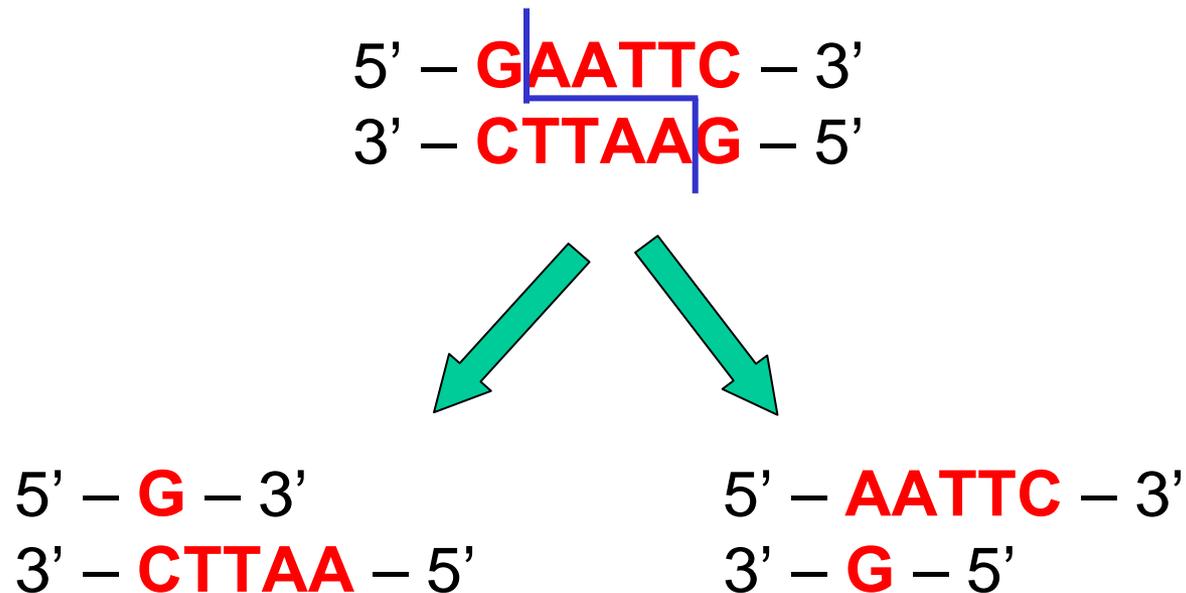
Le sequenze extra hanno il ruolo di:

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

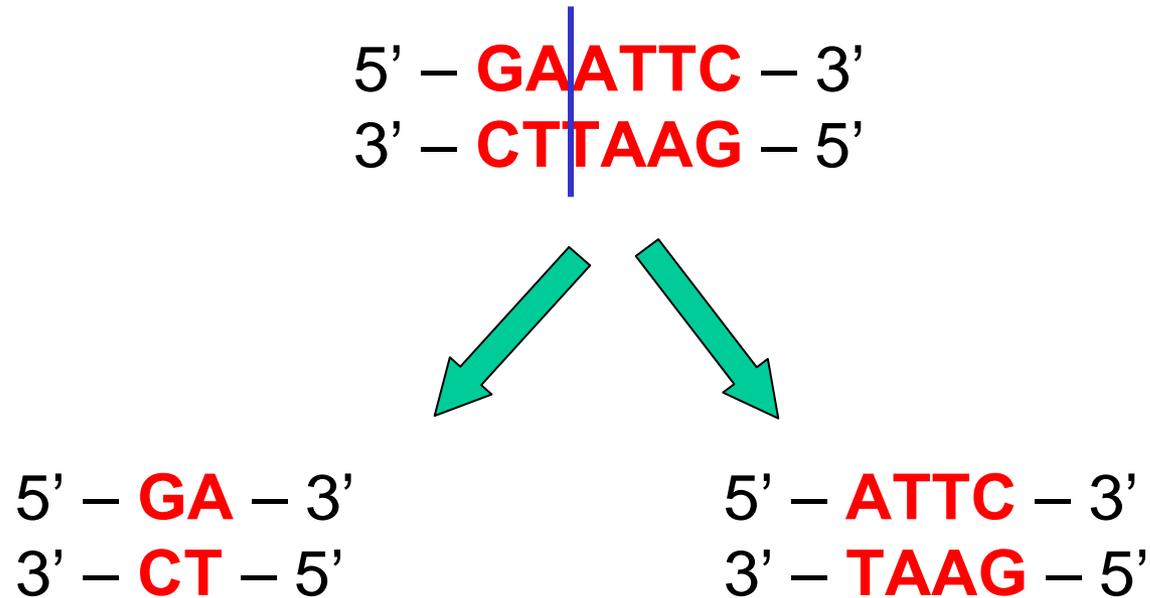
Esempio di enzima che genera estremità protruding (adesive).



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

Enzimi di Restrizione

Esempio di enzima che genera estremità blunt (smussate).



Enzimi di Restrizione

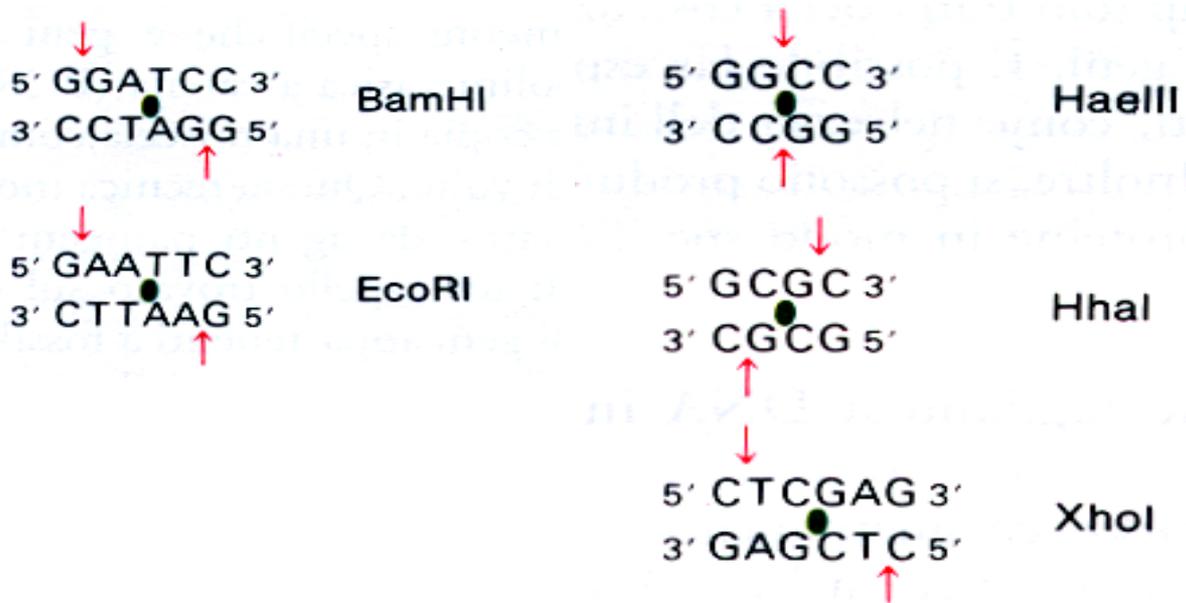
ISOCAUDAMERI: enzimi di restrizione che riconoscono siti diversi ma lasciano estremità compatibili. Non necessariamente quando si uniscono due frammenti creati con due enzimi isocaudameri si riforma uno dei due siti.

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.

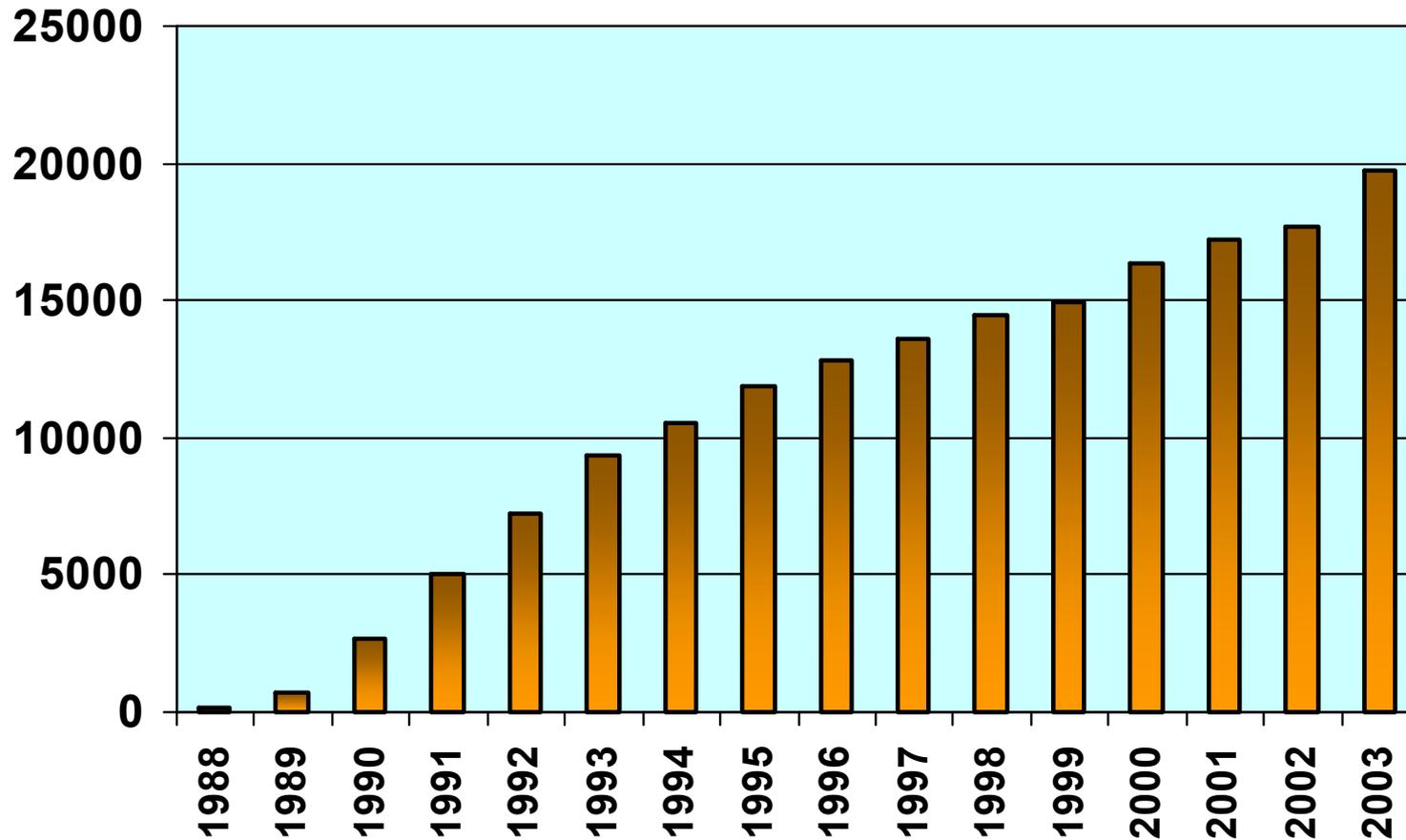
Enzimi di Restrizione

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.:

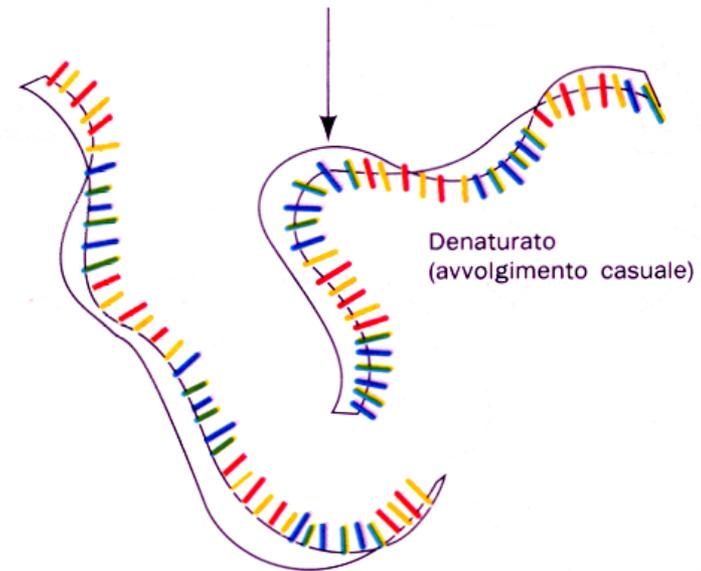
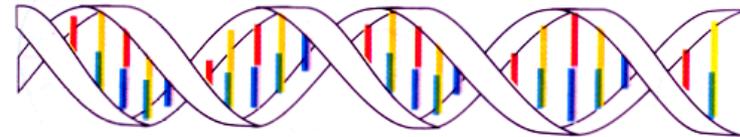
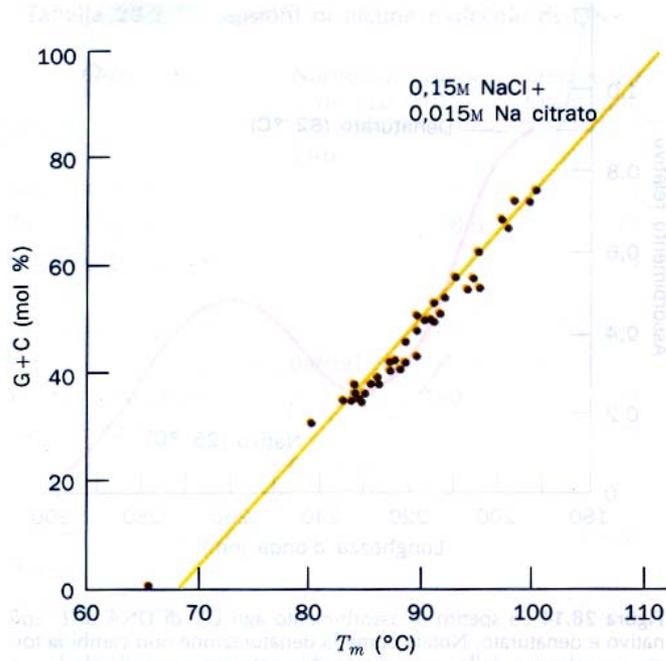
Eco per *E. coli*, Hin per *Haemophilus influenzae* e Hae per *H. aegyptius*, seguito dall'indicazione del ceppo e dal numero romano (se vi è più di un enzima di restrizione prodotto dallo stesso organismo).



Tecniche per la Diagnosi Molecolare



Tecniche per la Diagnosi Molecolare



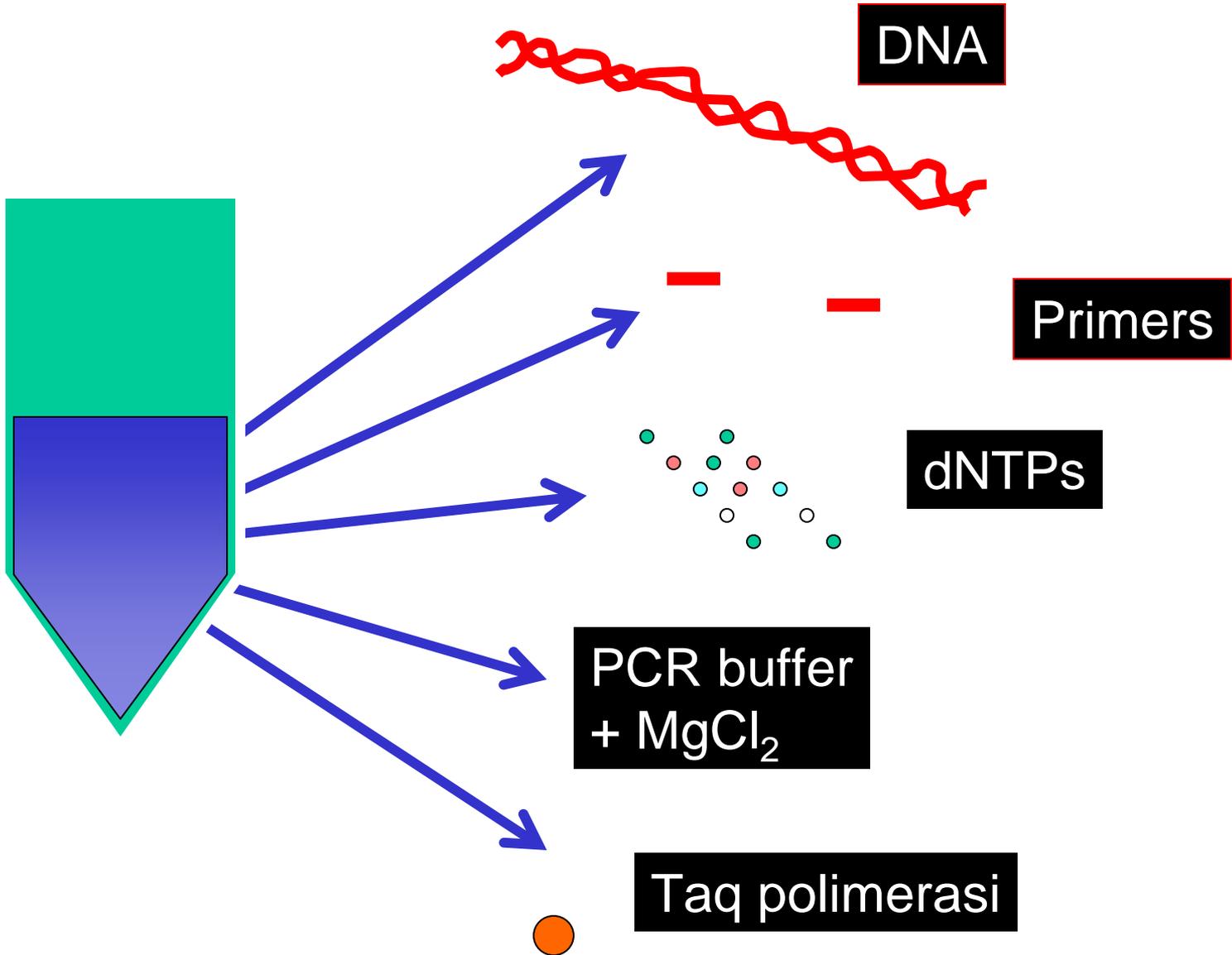
Tecniche per la Diagnosi Molecolare



PCR

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



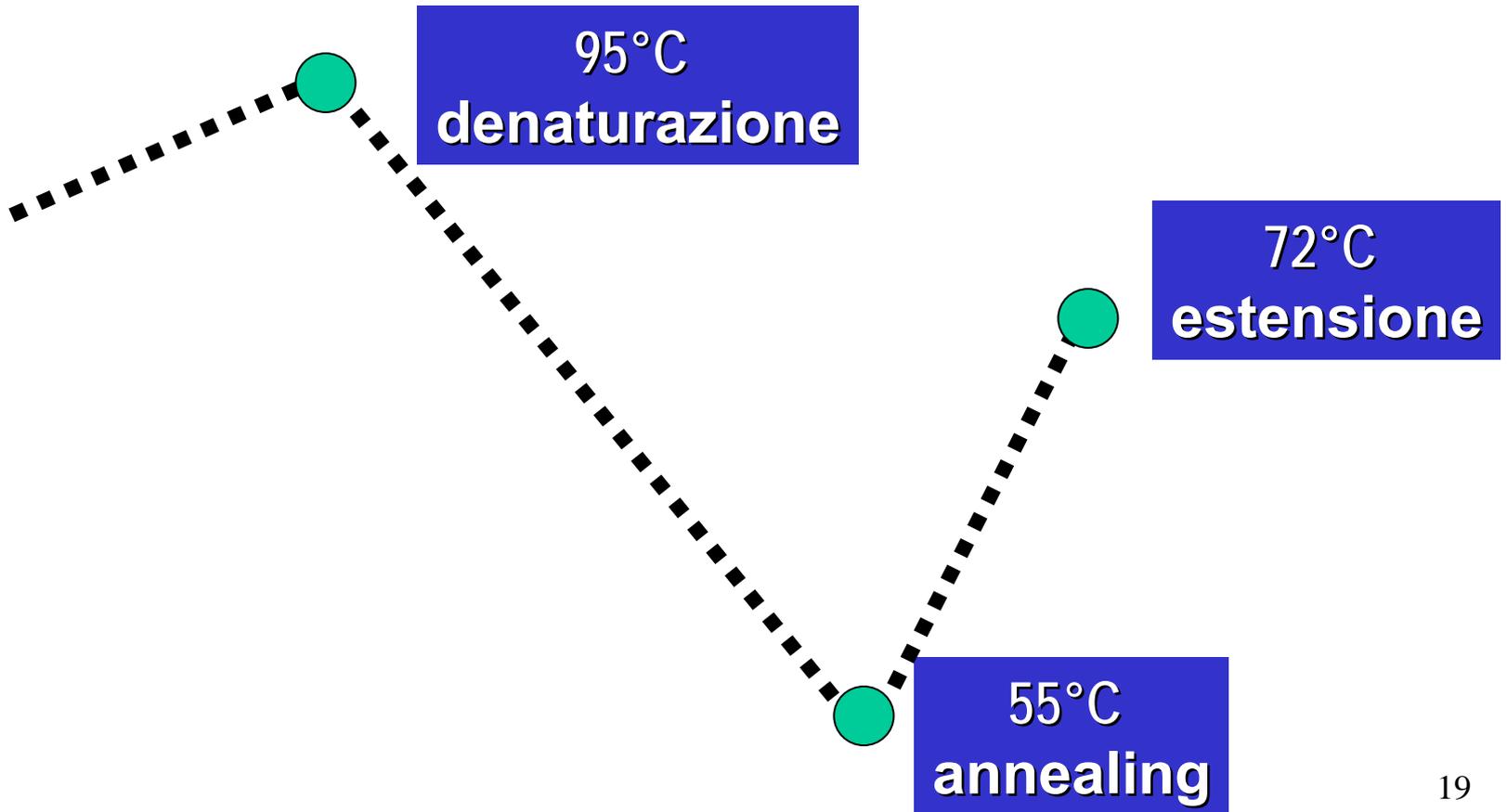
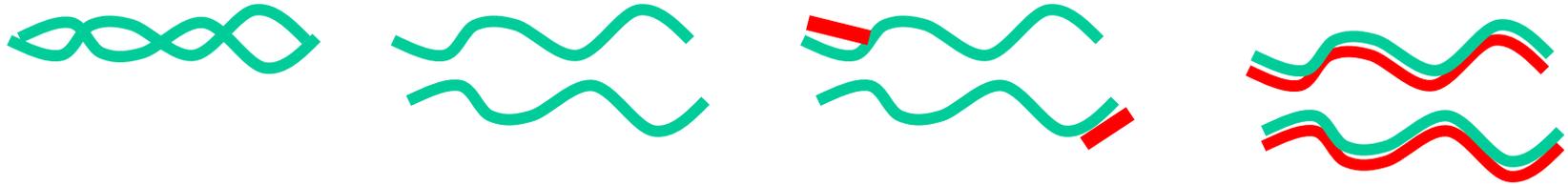
Materiali e Strumenti Necessari per Effettuare una PCR

- 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).

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.

Il principio della PCR



Le Fasi della PCR

Tre passaggi amplificati per 30 o 40 cicli:

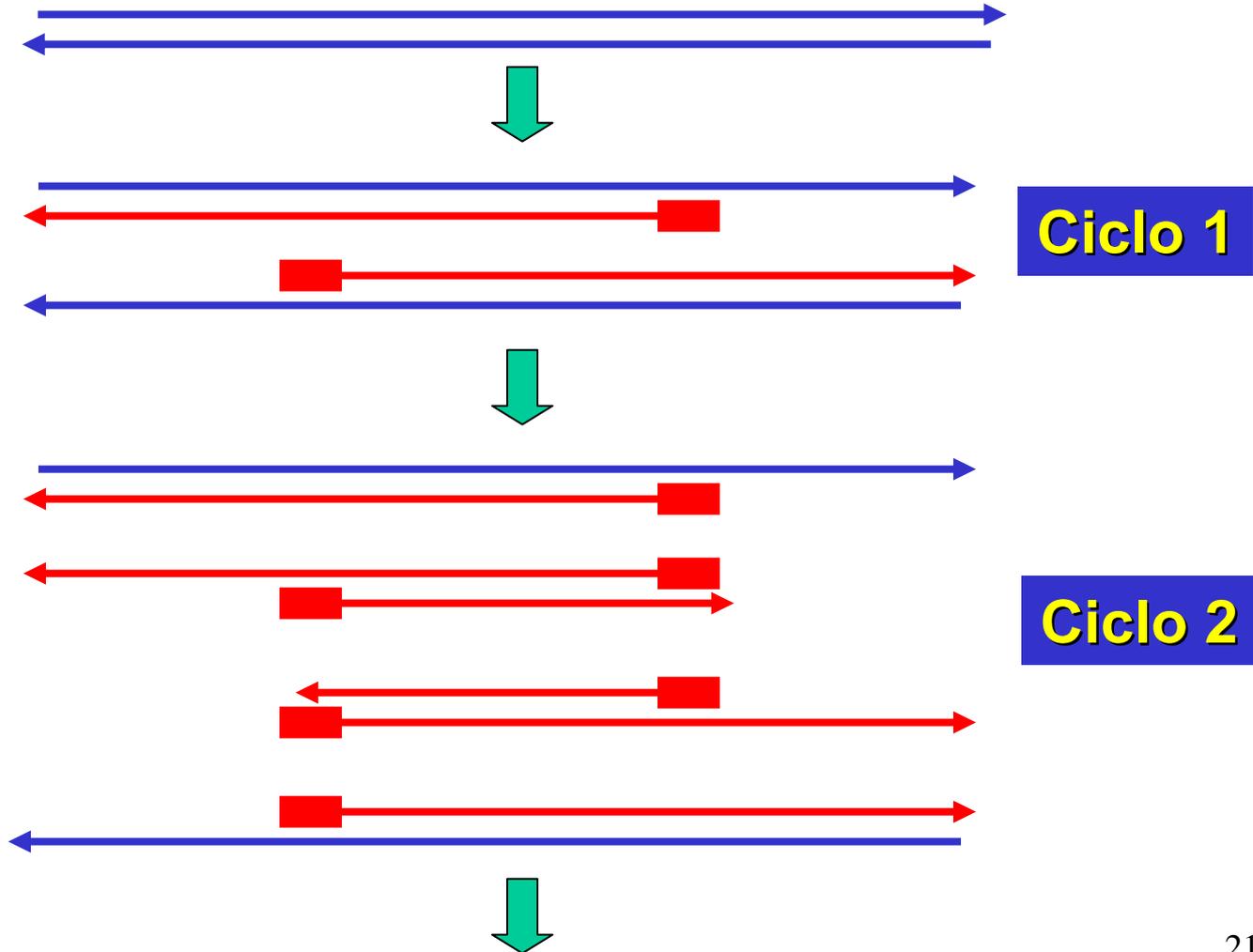
denaturazione a 95°C, 30 sec. - 1 min.

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

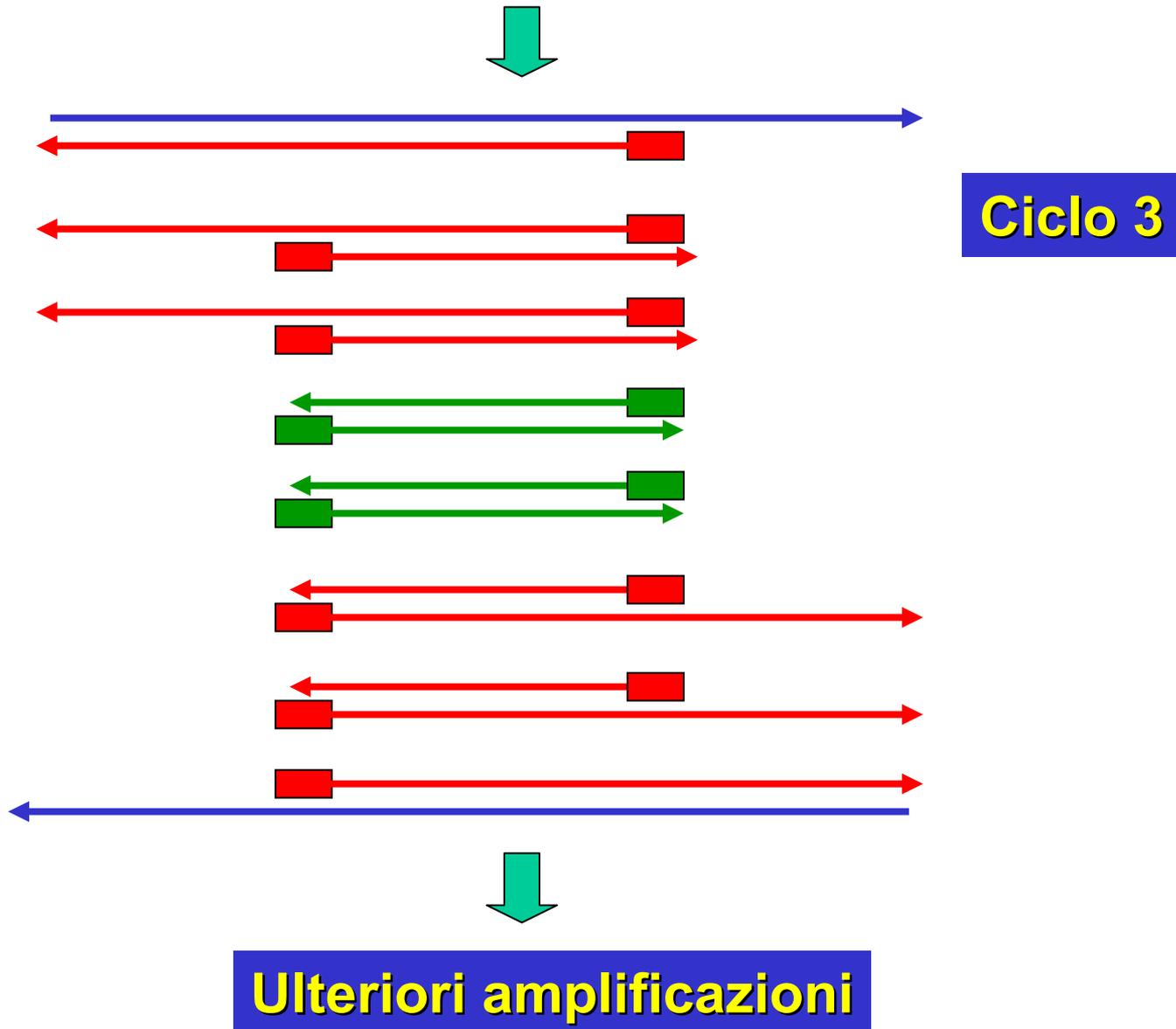
estensione a 72°C, 1-2 min.

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.: $E = 0.85$

$n = 30$

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

$$= N_0 \times 103.550.000$$

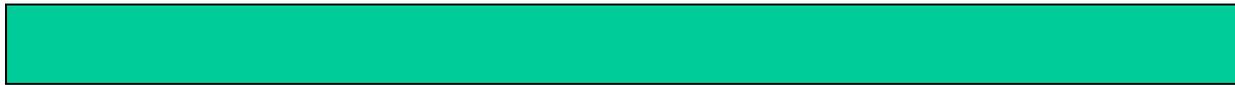
La Scelta dei Primer

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'

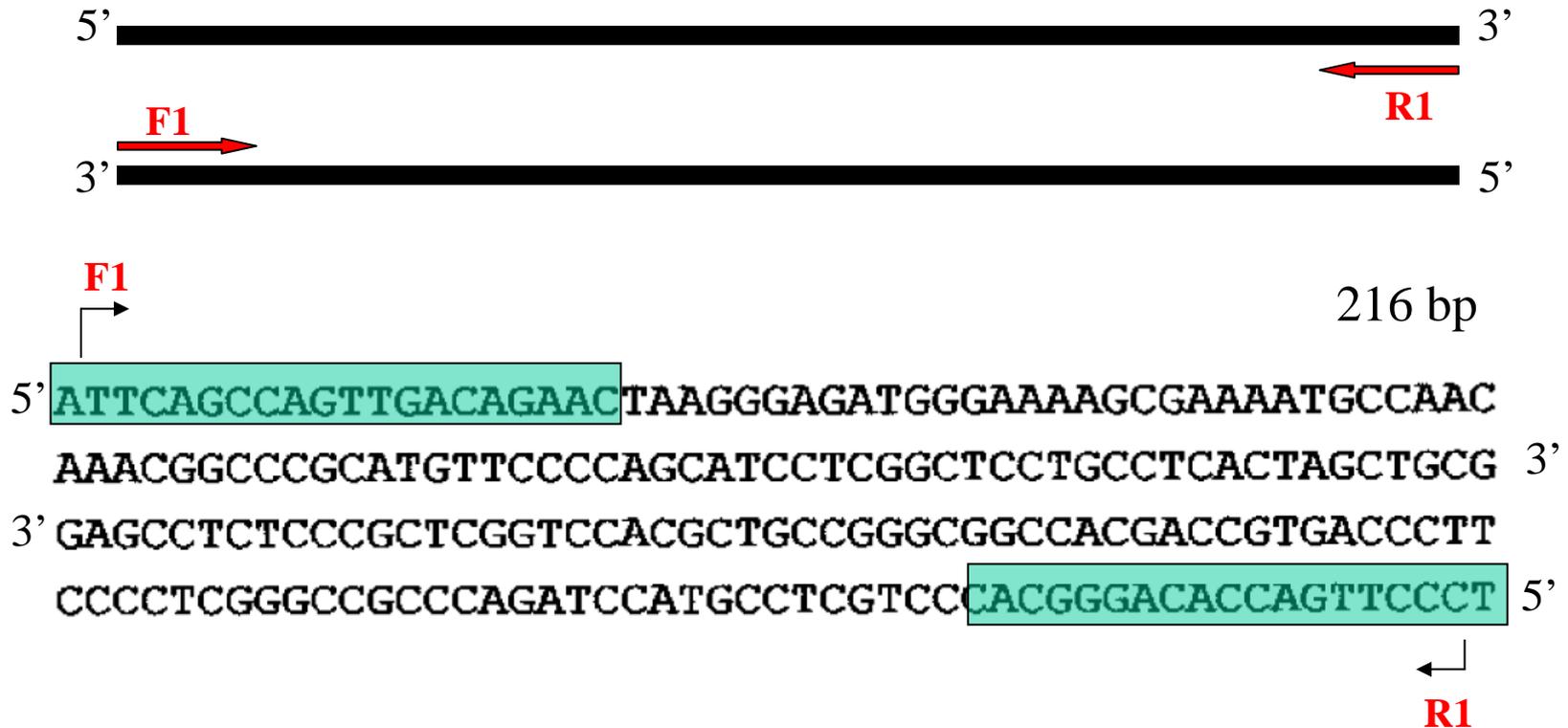
3'



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'-TCCCTTGACCACAGGGGCAC-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,

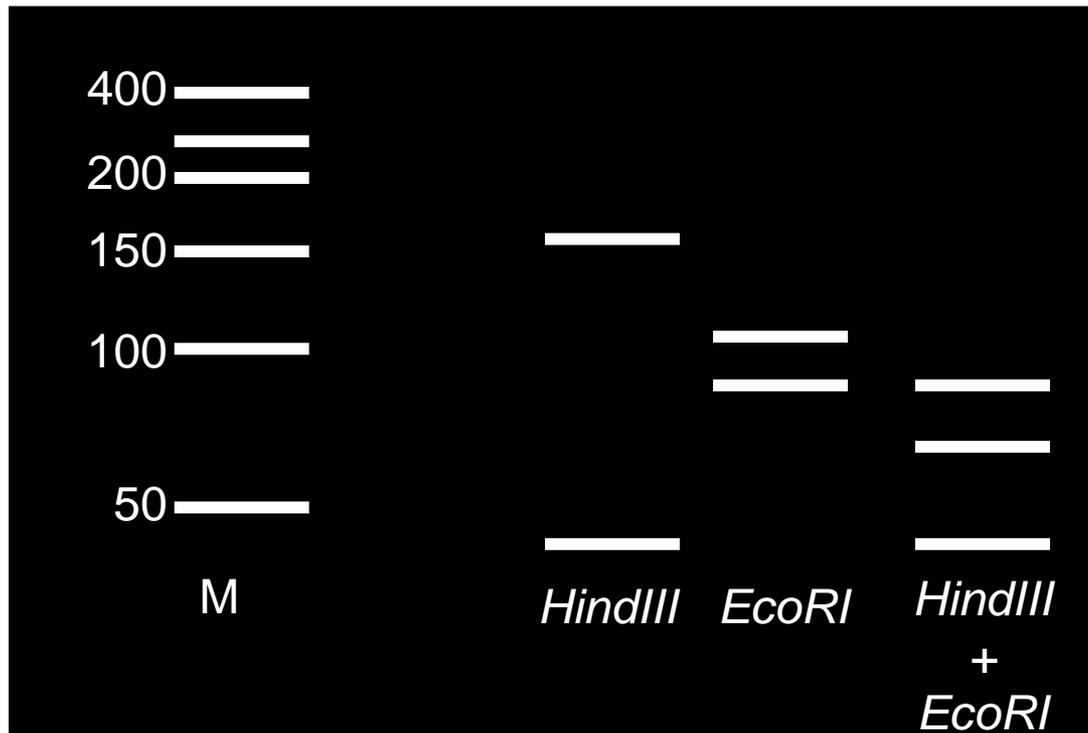
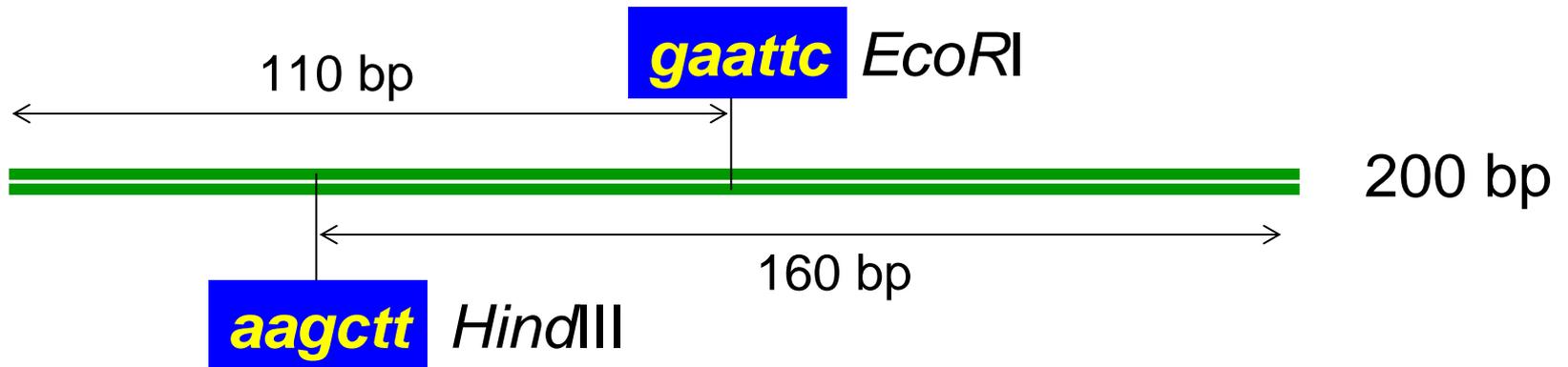
l'analisi di restrizione con specifiche endonucleasi,

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,

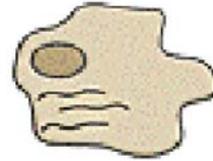
essa prevede lo svolgimento di due fasi:

retrotrascrizione dell'RNA,

amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase.

Clonaggio basato sulla RT-PCR

(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)



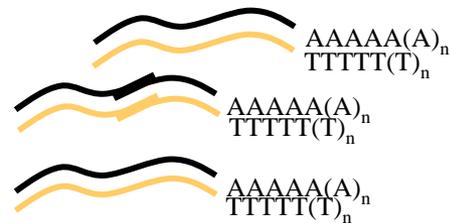
Cellule o tessuto ↓

Estrazione dell'RNA



Sintesi del cDNA

Primer oligo(dT)



Amplificazione per PCR

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.

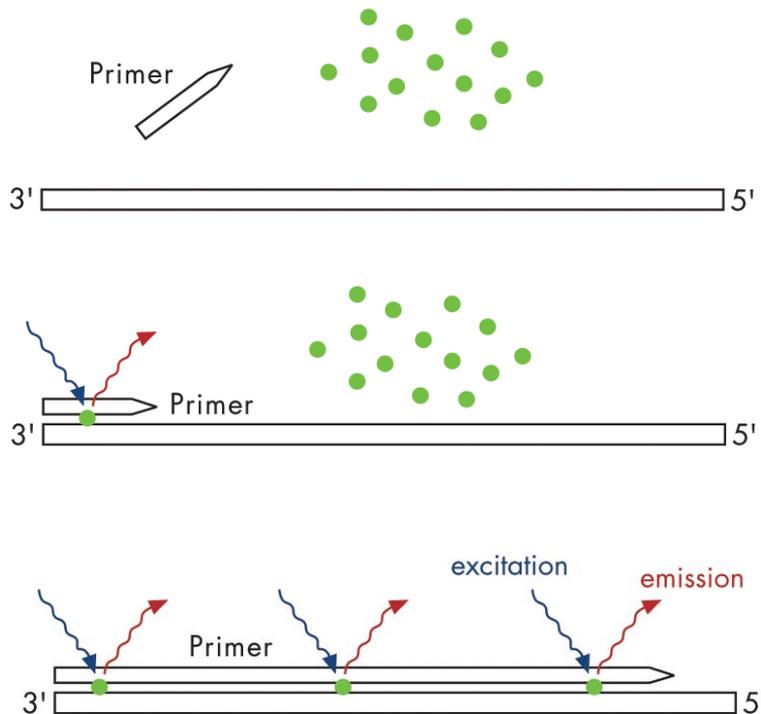
La quantificazione del prodotto avviene attraverso la fluorescenza misurata per ogni ciclo di PCR. La quantità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto amplificato.

Real-Time PCR

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.

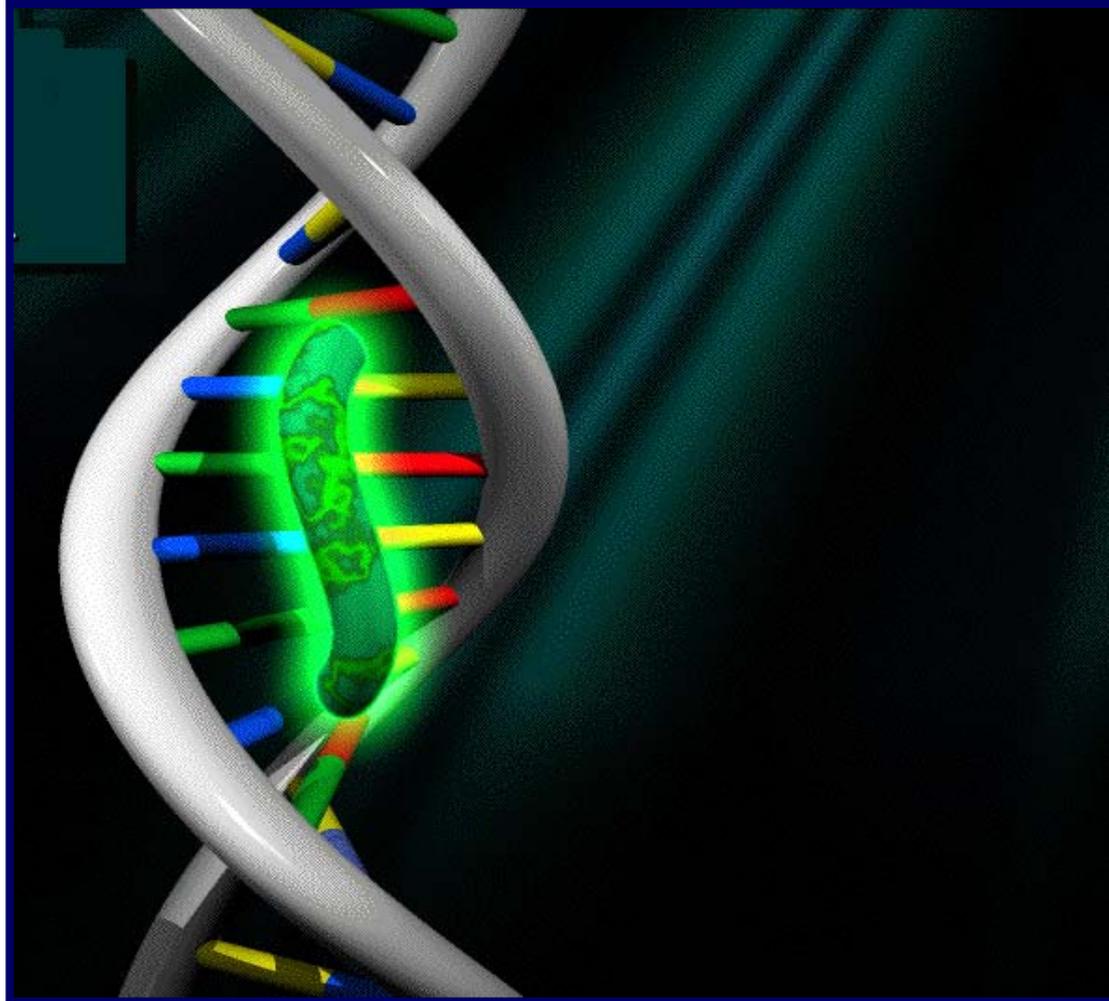


La rivelazione avviene nel passaggio di estensione della PCR,

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

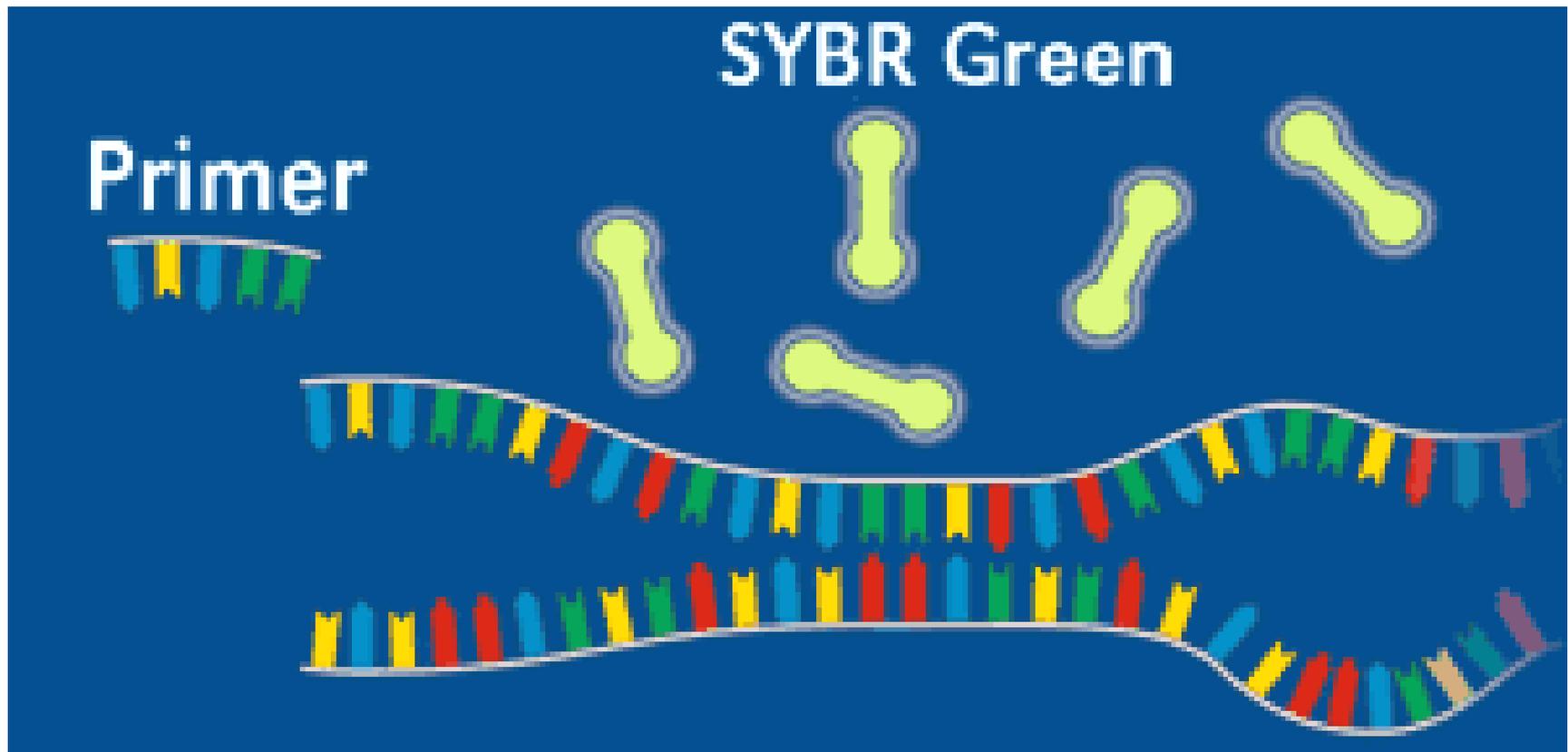
SYBR Green: principio

Si utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA.



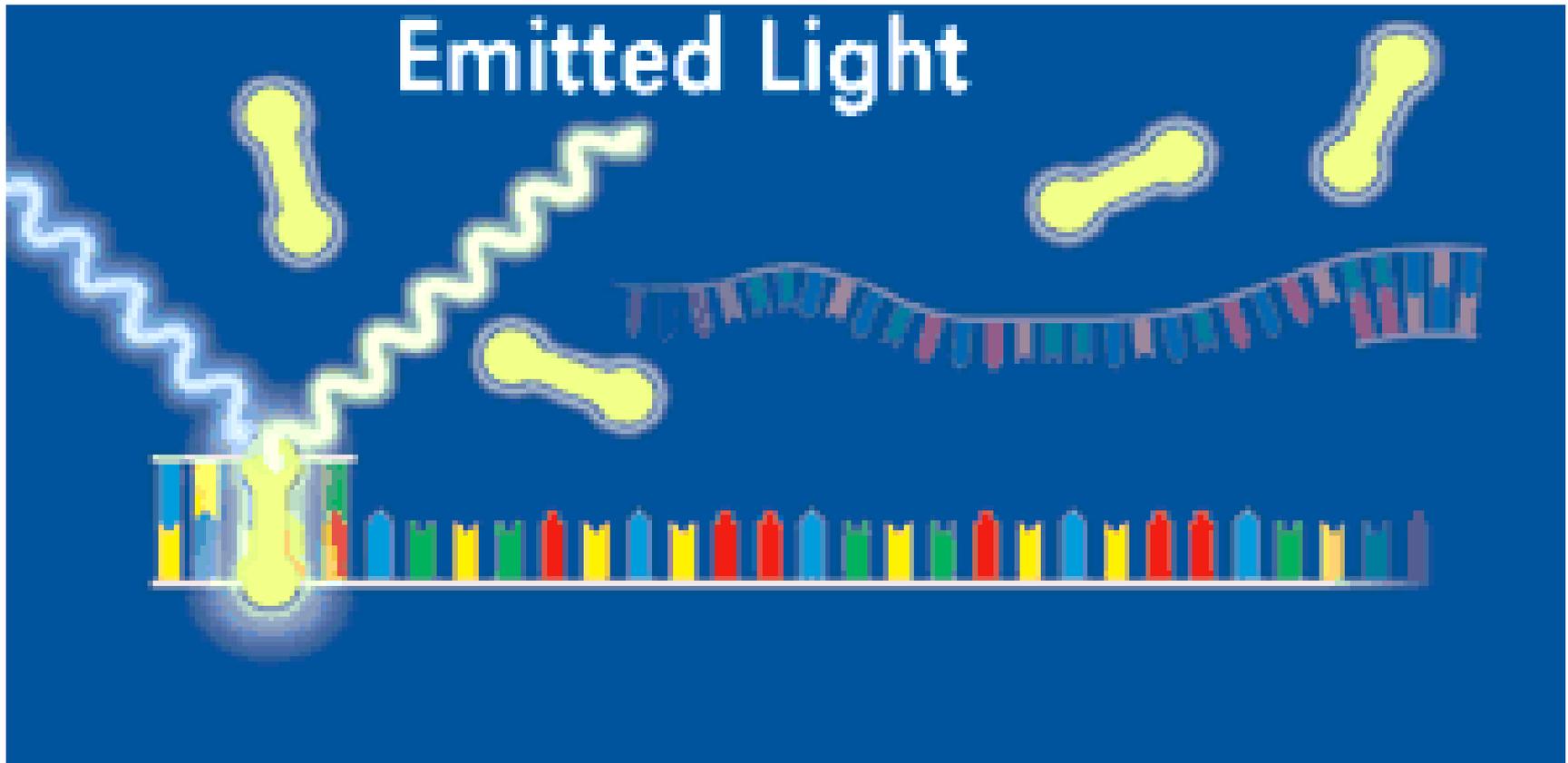
SYBR Green: principio

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



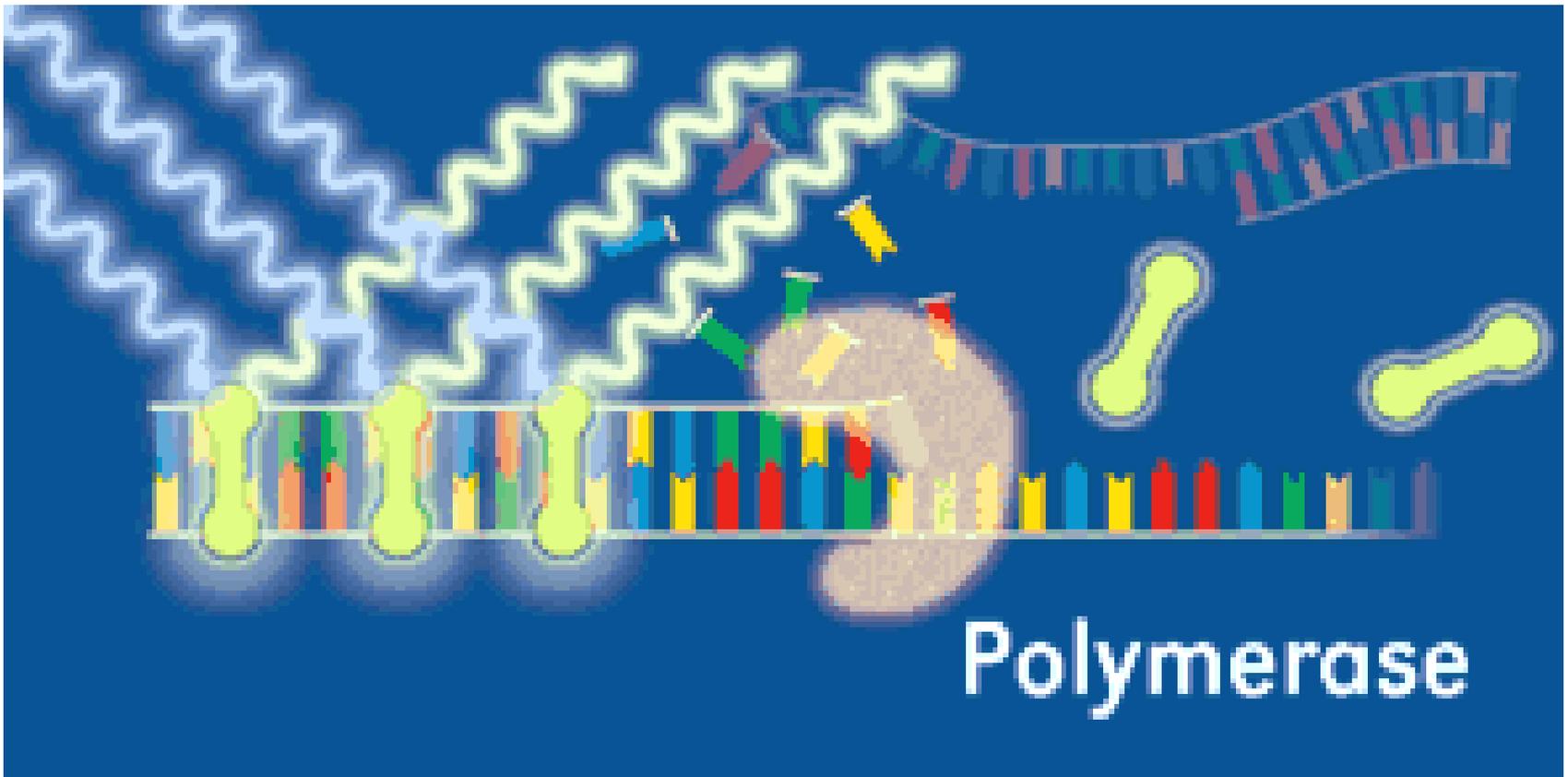
SYBR Green: principio

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).



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 ed 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,

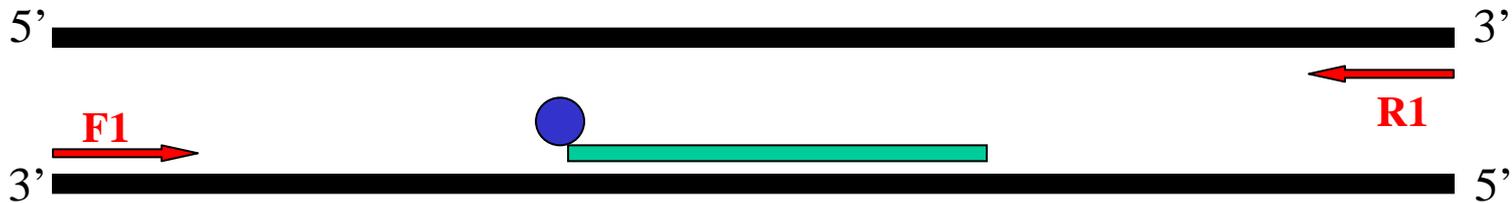
invece, i coloranti fluorescenti (es. il SYBR Green) rivelano l'amplificazione di qualsiasi frammento di DNA.

Real-Time PCR

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 (maggiori costi).

Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi

Taq Polymerase



PROBE



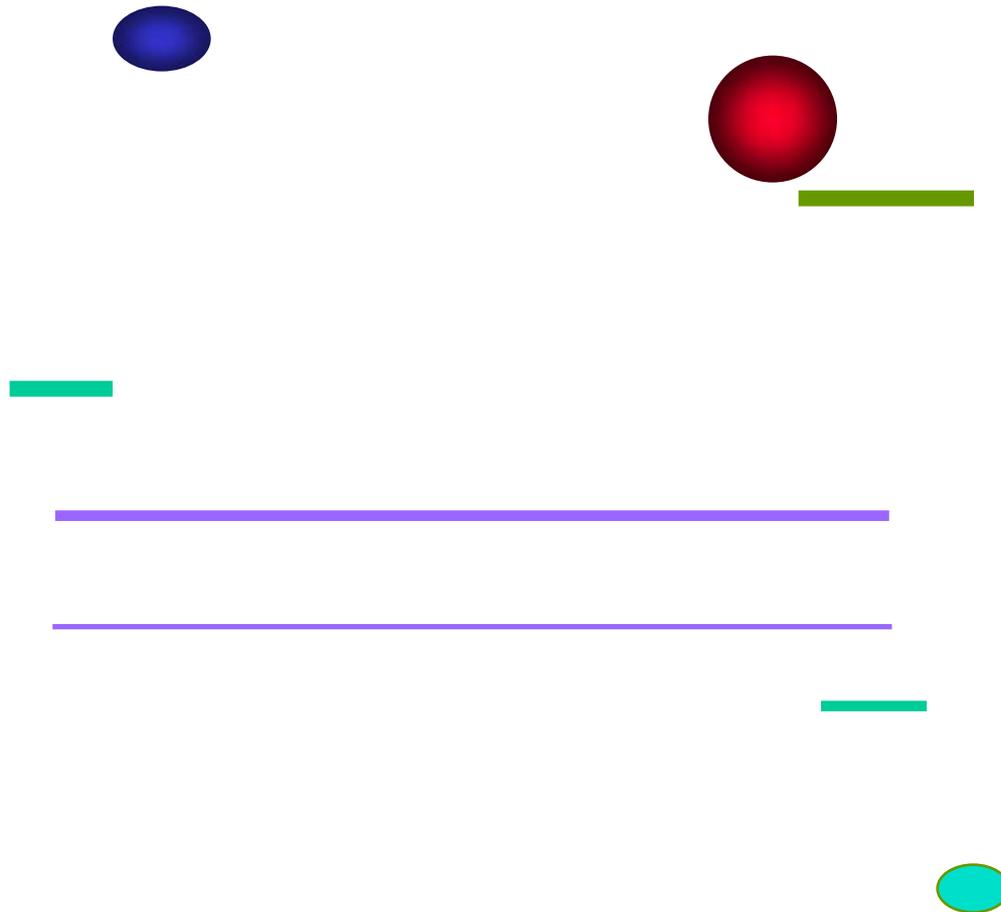
PRIMERS



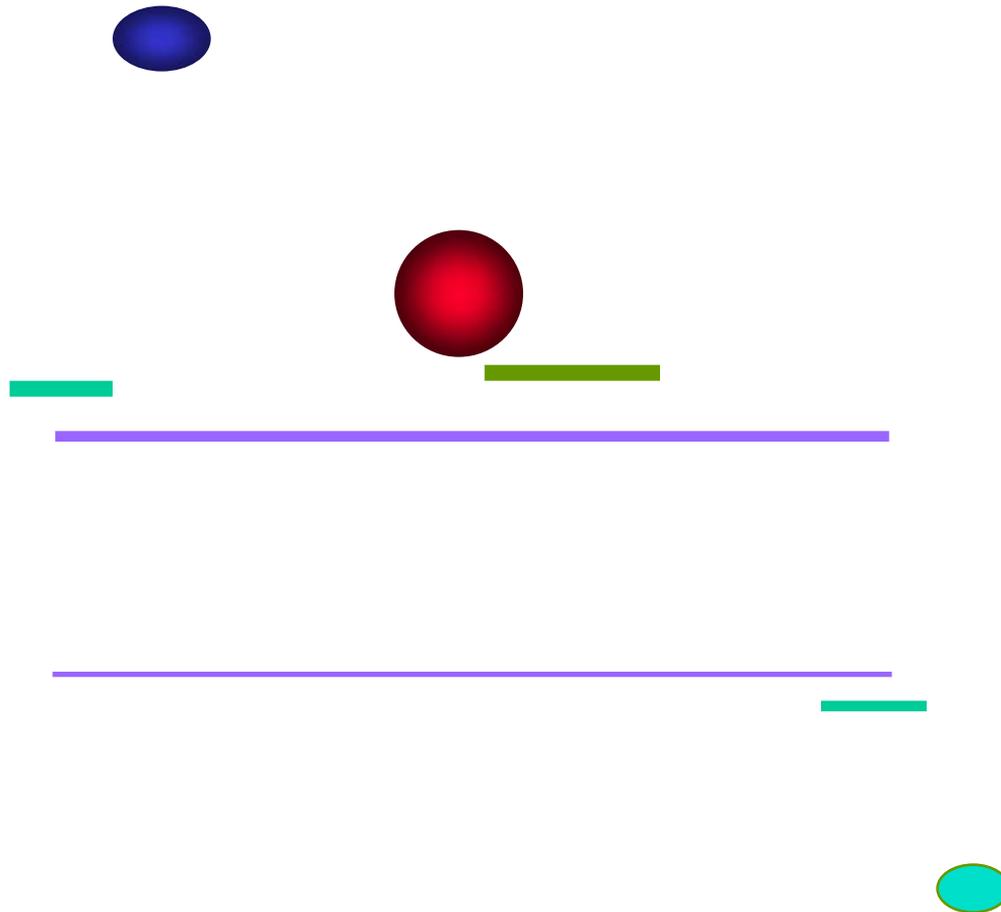
Template



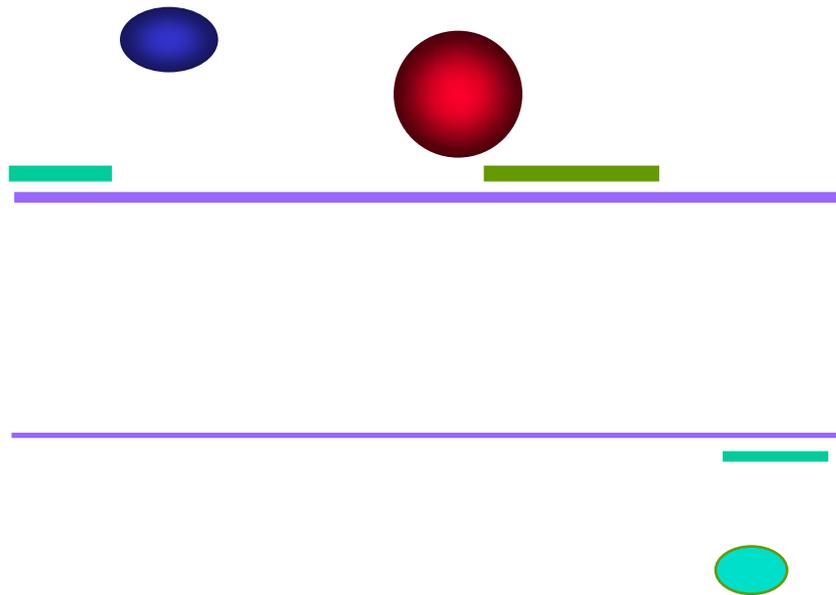
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



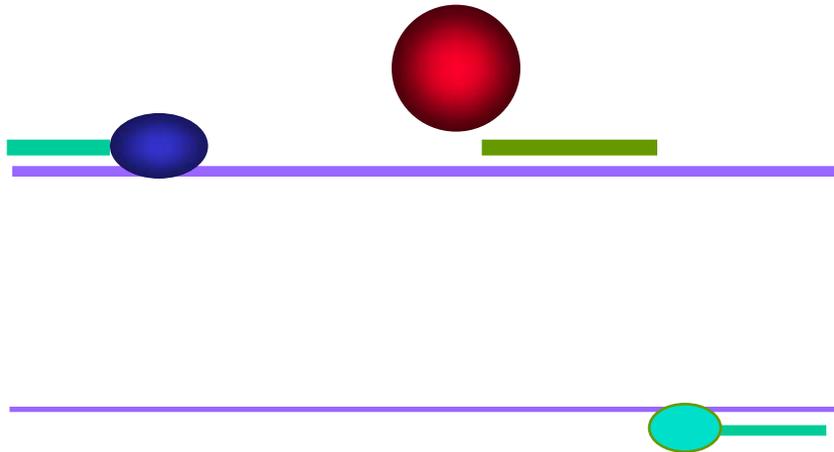
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



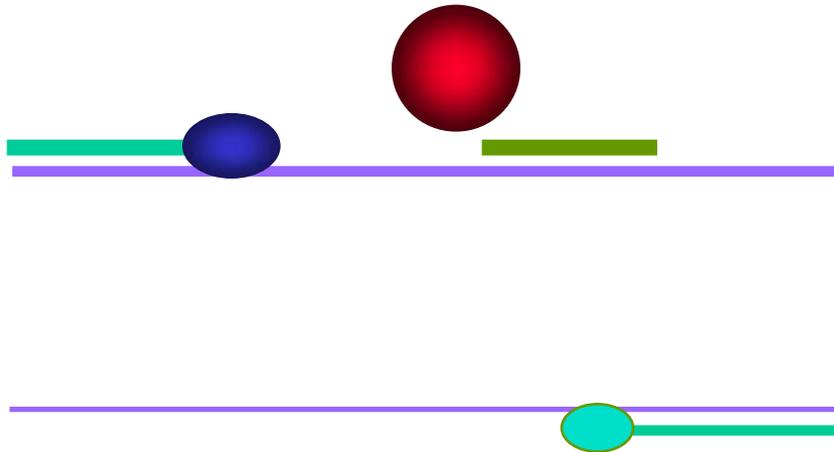
Sonde Specifiche marcate con Fluorocromi



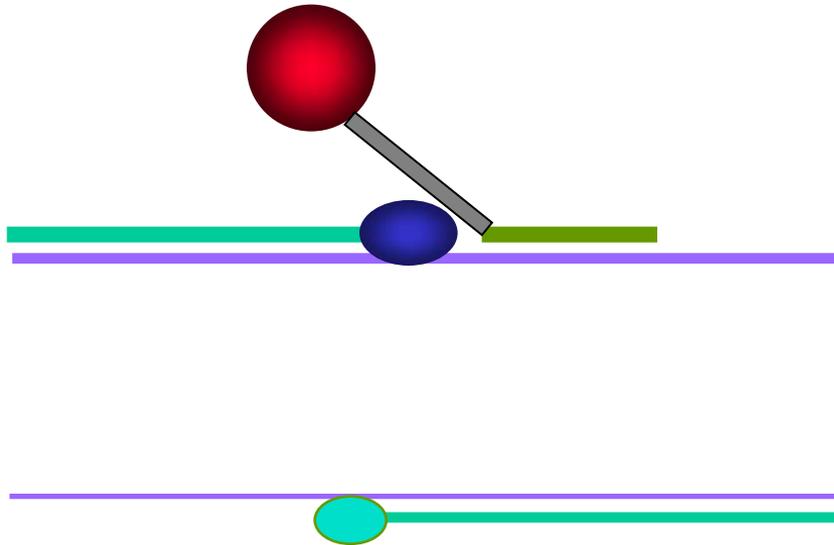
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



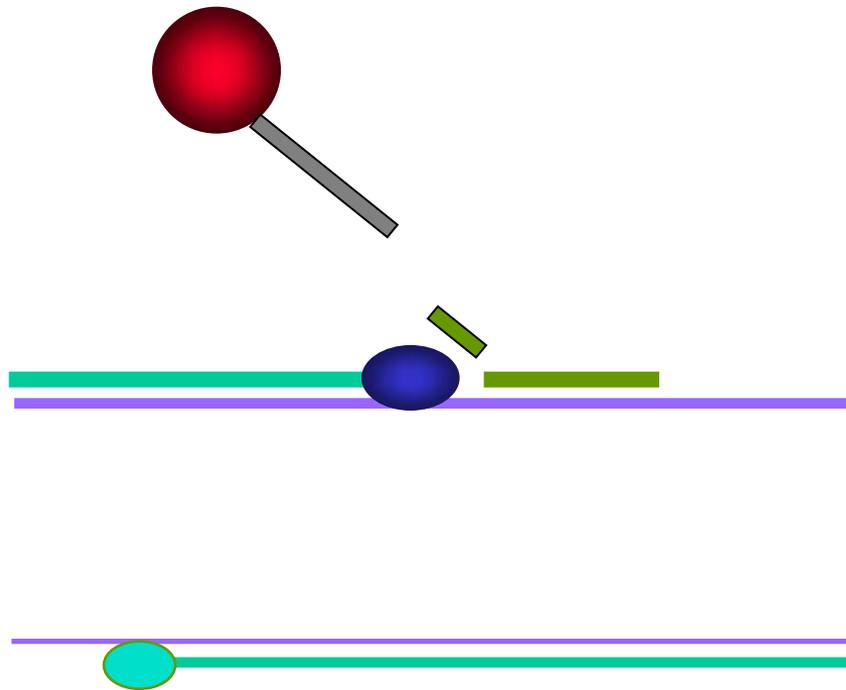
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



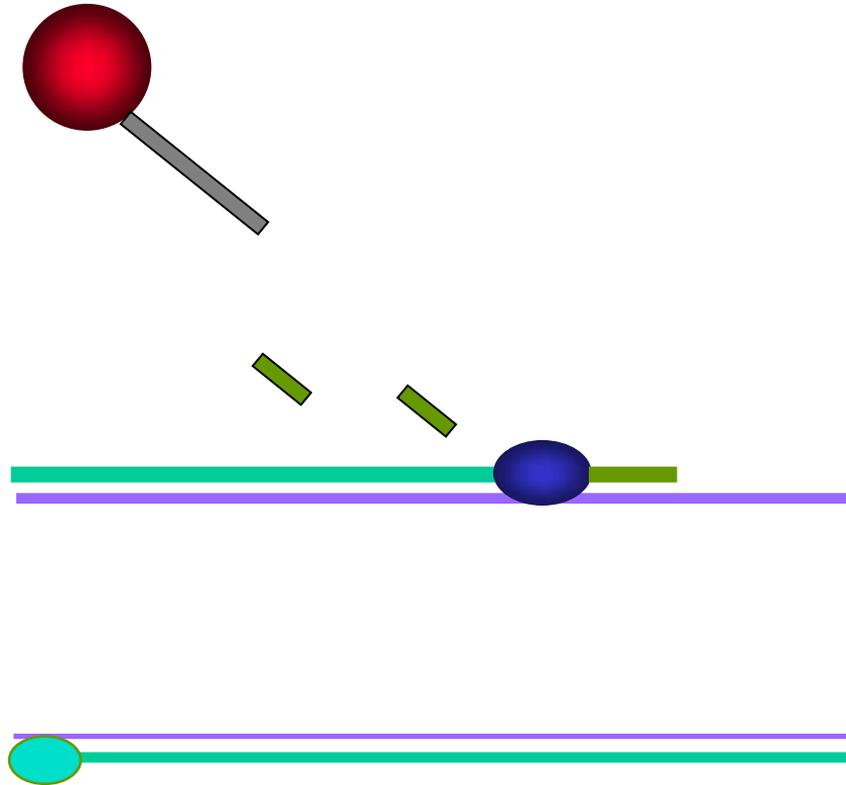
Sonde Specifiche Marcate con Fluorocromi



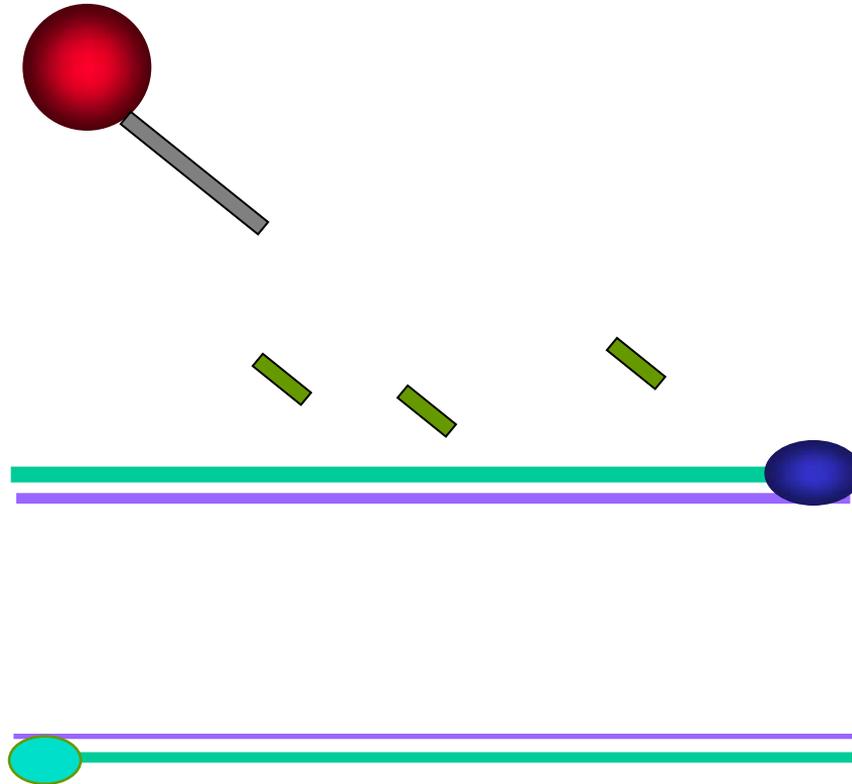
5' Nuclease Assay



5' Nuclease Assay



5' Nuclease Assay



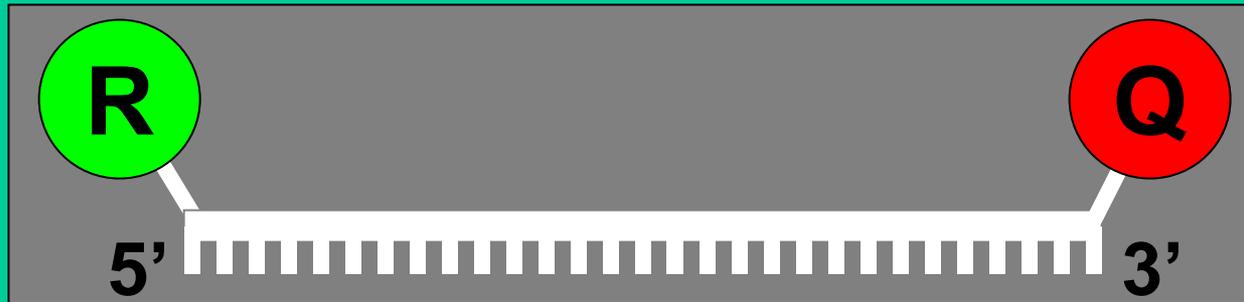
Sonde Fluorogeniche TaqMan

La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rivelazione ed 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.

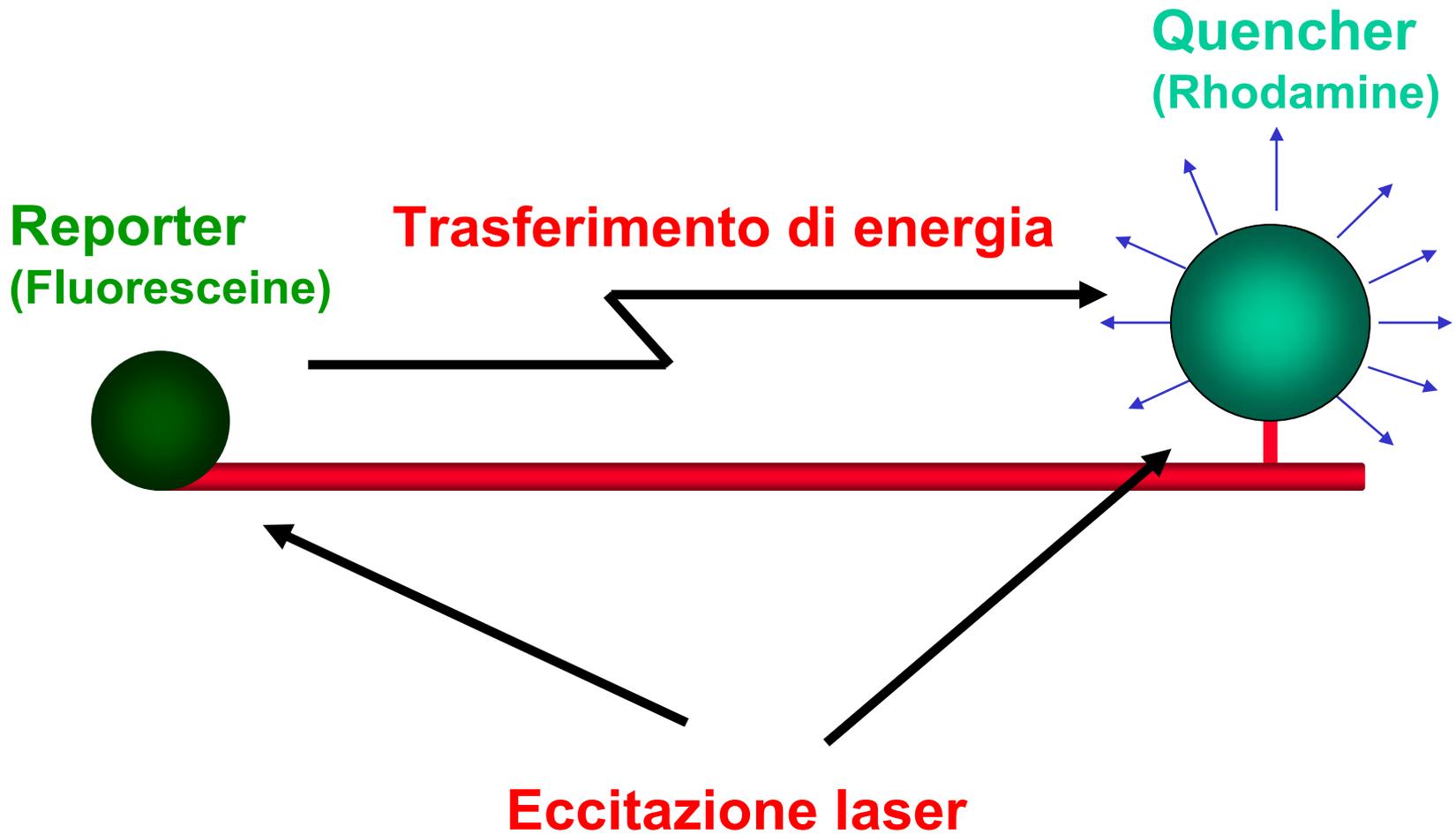
Sonde Fluorogeniche TaqMan

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



Sonde Fluorogeniche TaqMan

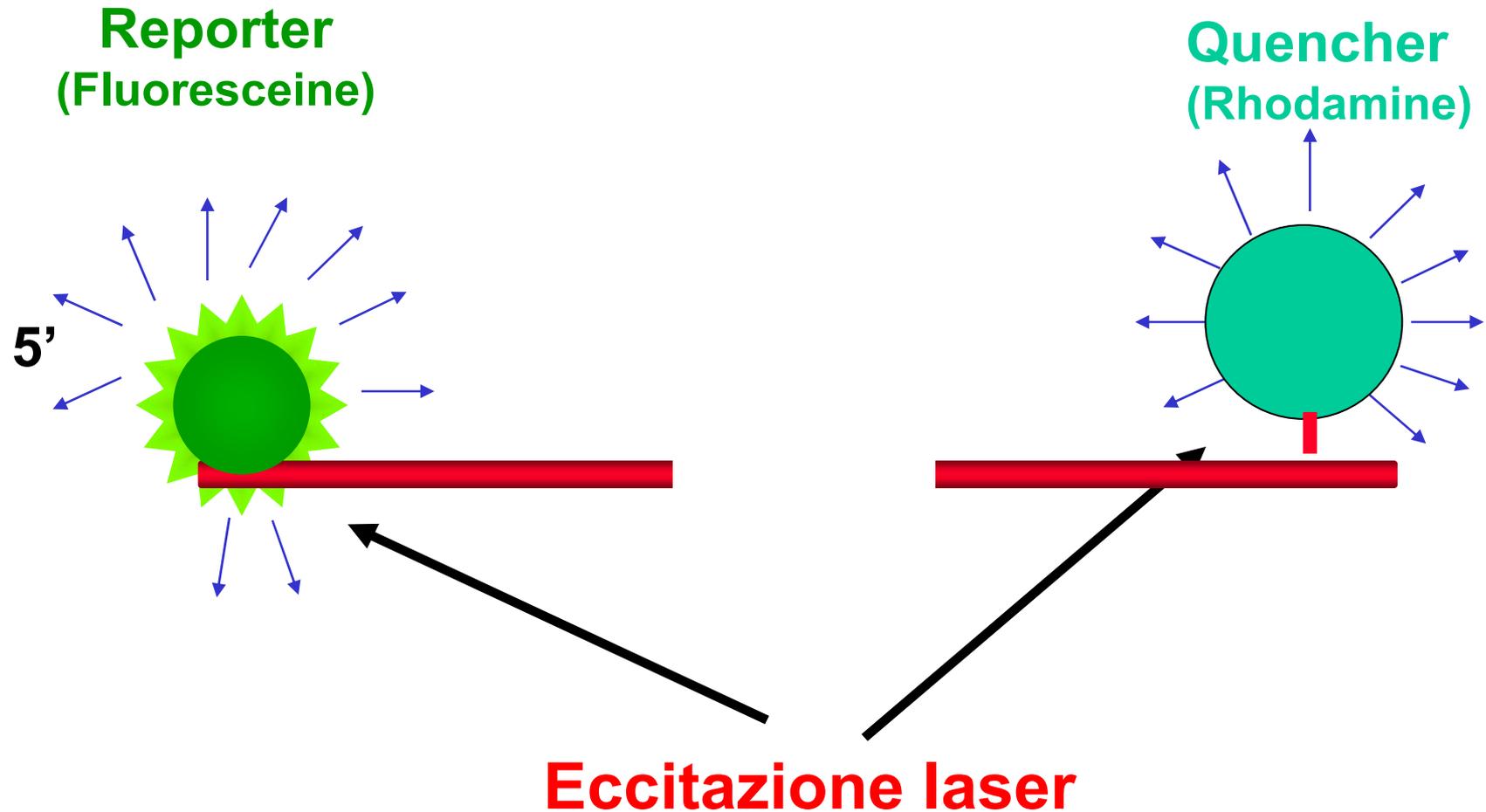
Fino a quando la sonda resta intatta, la vicinanza tra reporter fluorescente e quencher annulla l'emissione del segnale di fluorescenza, perché c'è un trasferimento di energia dal primo al secondo,

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 ed il quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza.

Sonda Fluorogeniche TaqMan

Sonda tagliata



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

Denaturazione

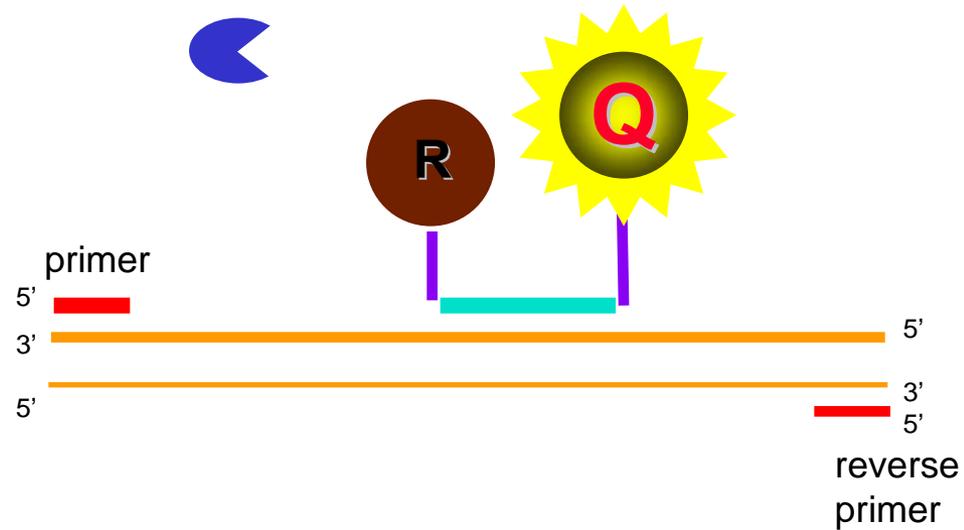


Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione

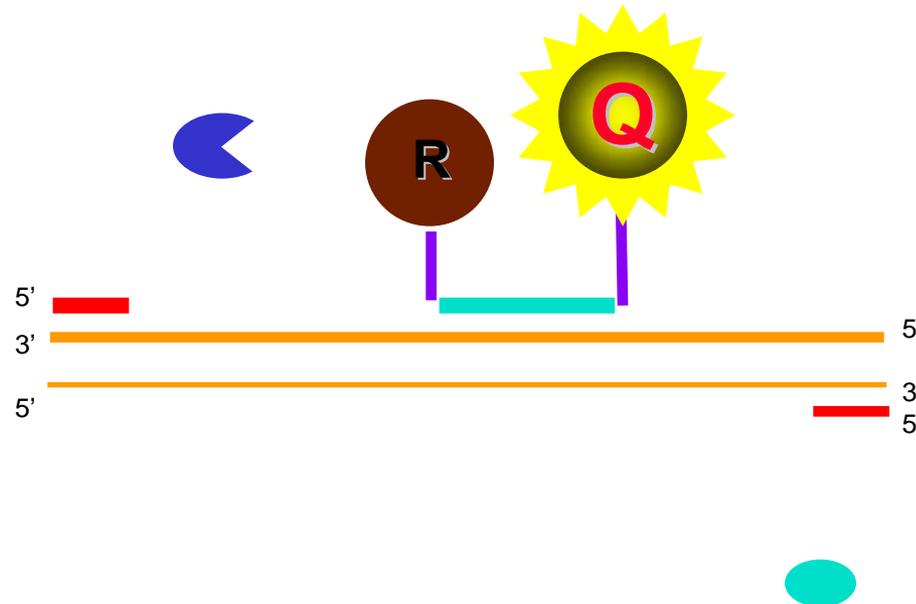


Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione

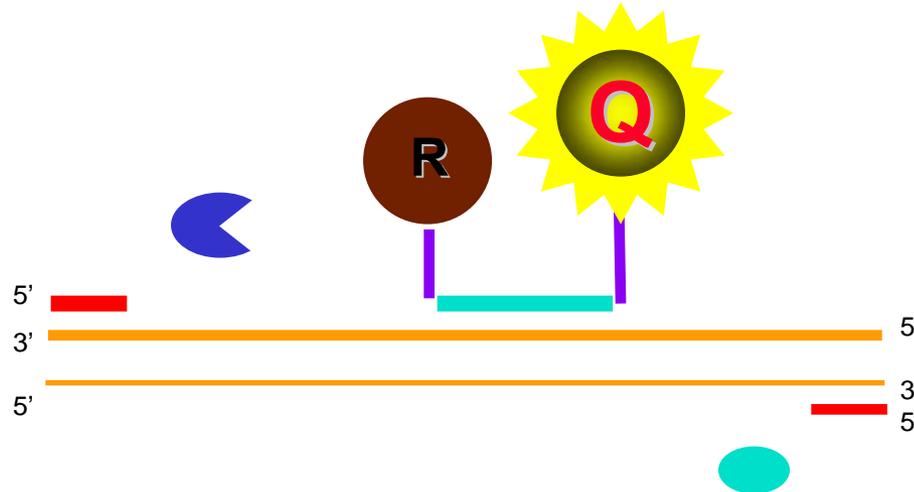


Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione

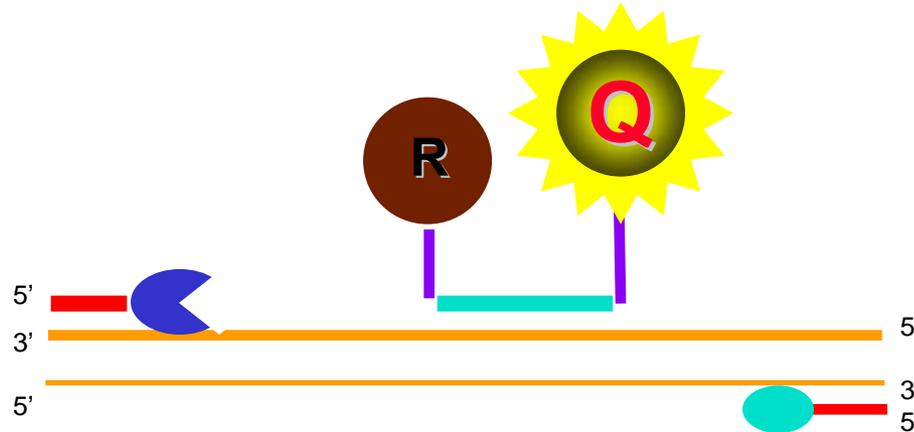


Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione

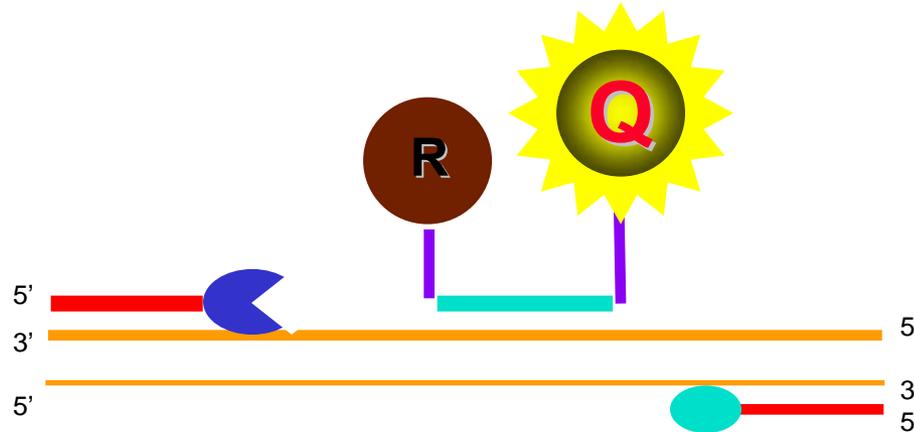


Annealing



Polimerizzazione

R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Denaturazione

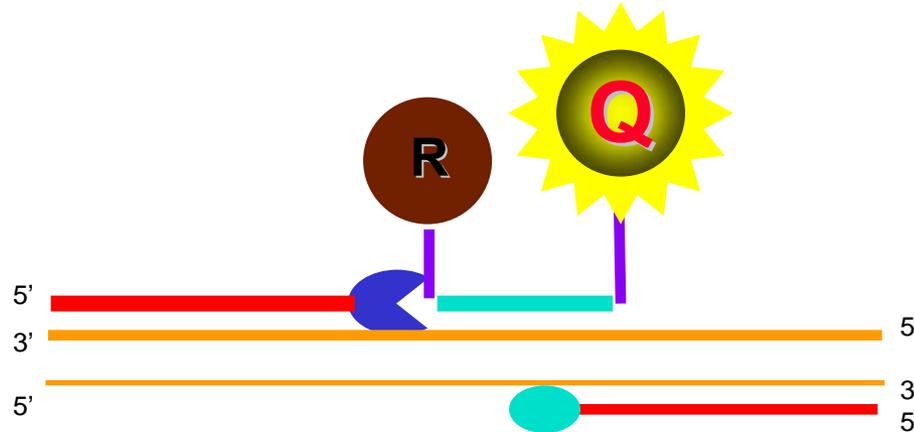


Annealing



Polimerizzazione

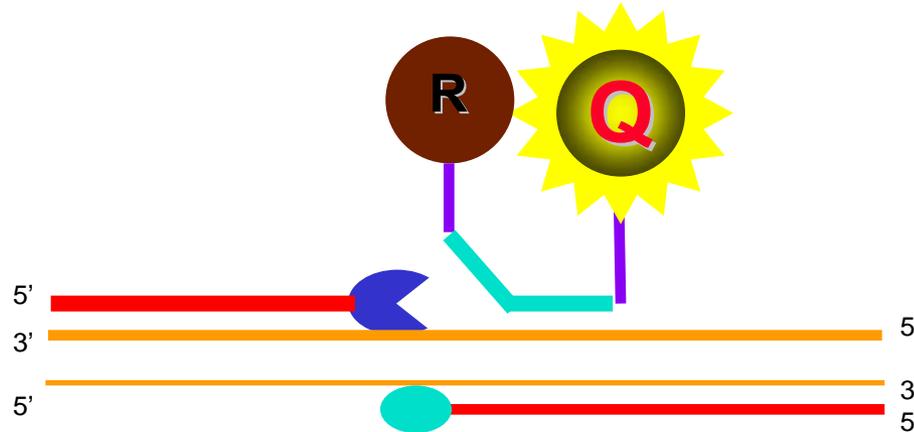
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Spiazzamento del probe

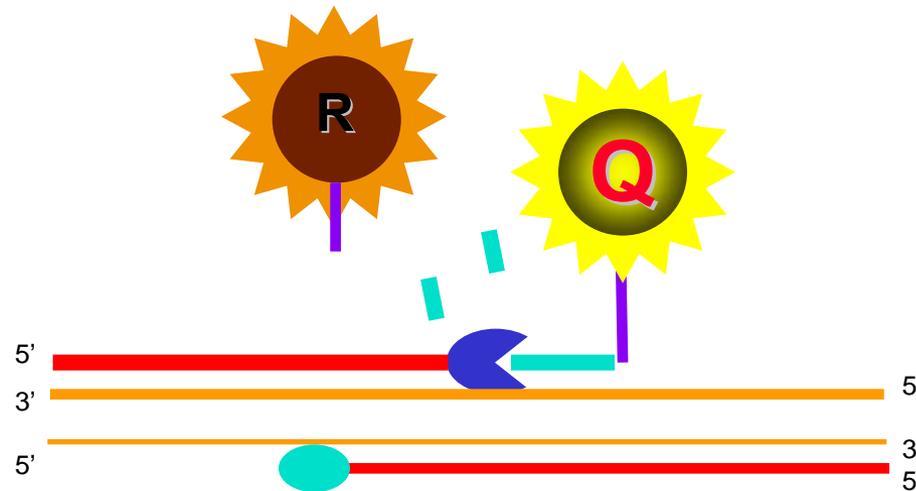
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

R = Reporter
Q = Quencher

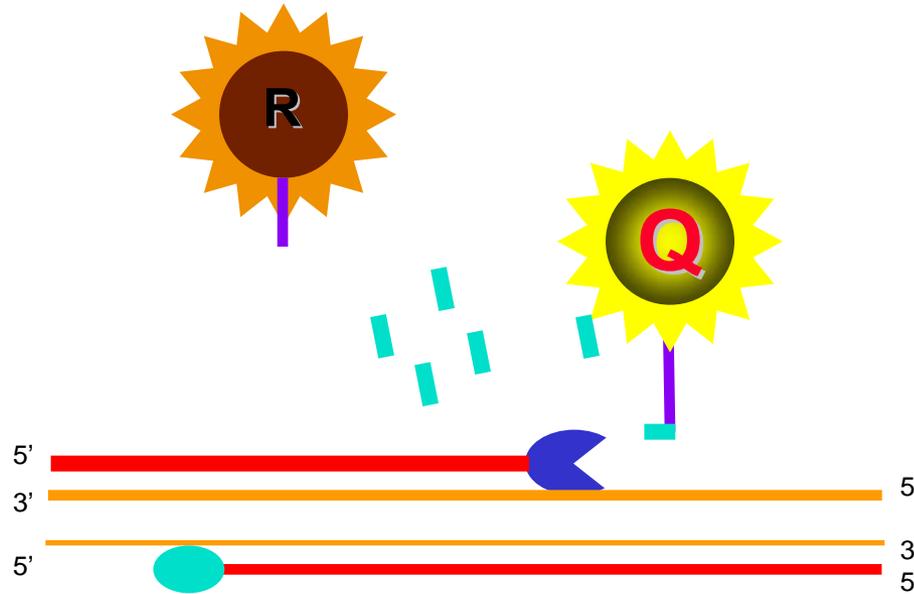


Durante l'estensione del primer, la Taq polimerasi incontra la sonda ibridata che le sbarrava la strada e quindi la taglia utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, liberandosi la strada e portando così a termine la copiatura del frammento.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

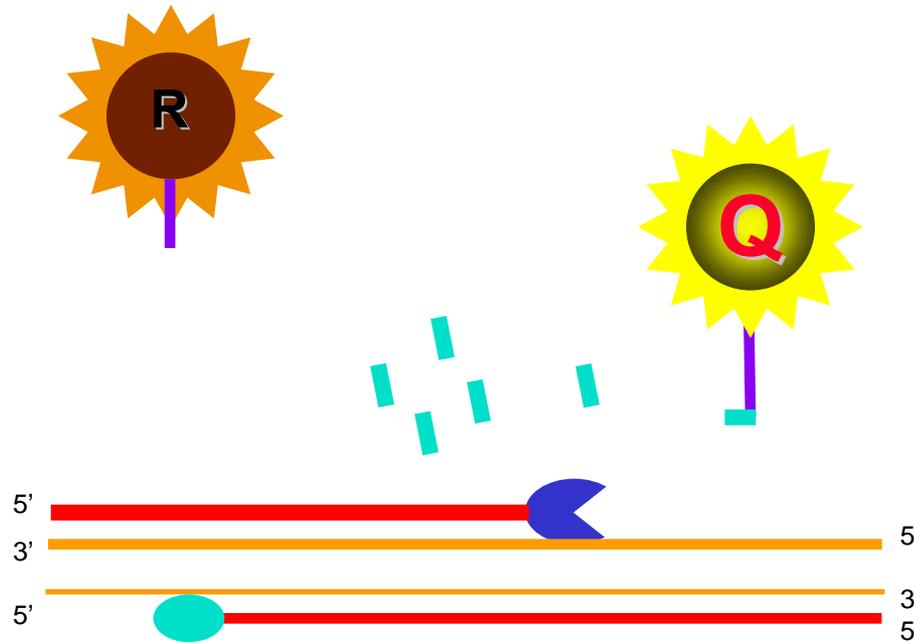
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogénica TaqMan

Taglio del probe

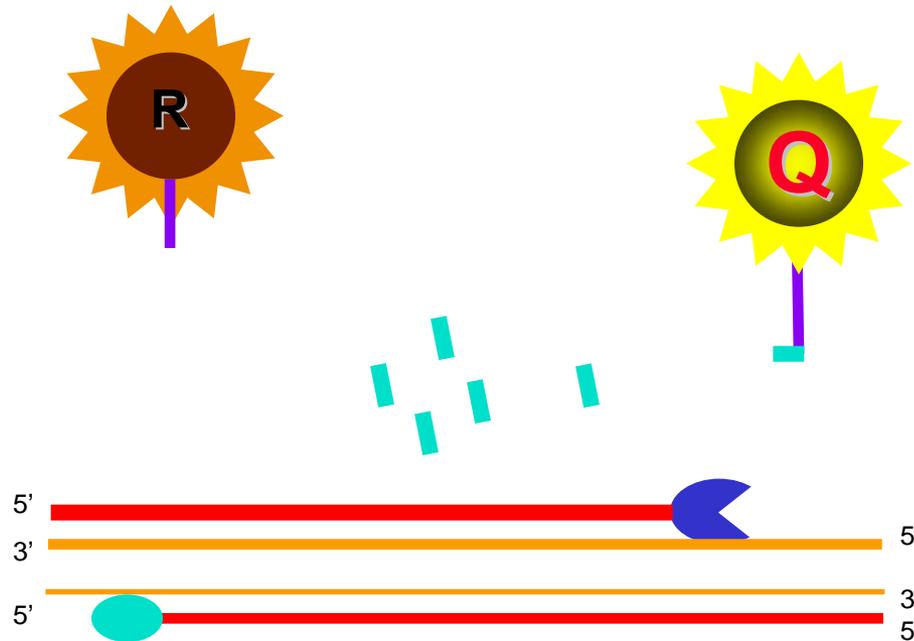
R = Reporter
Q = Quencher



Sonde Fluorogeniche TaqMan

Taglio del probe

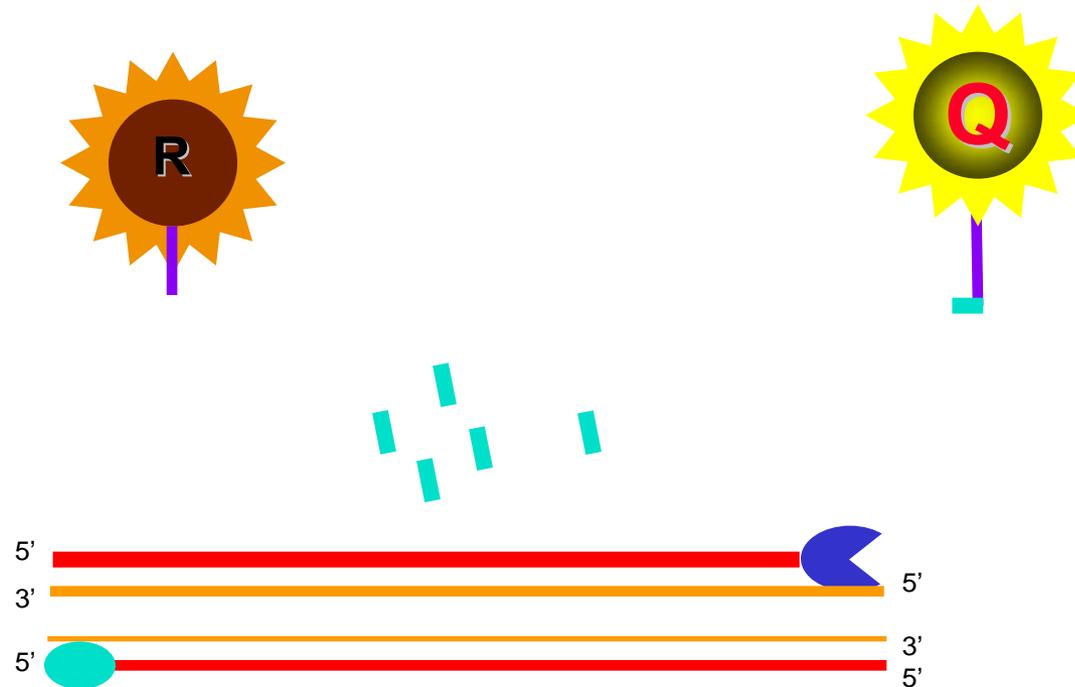
R = Reporter
Q = Quencher



Sonda Fluorogeniche TaqMan

Fine polimerizzazione

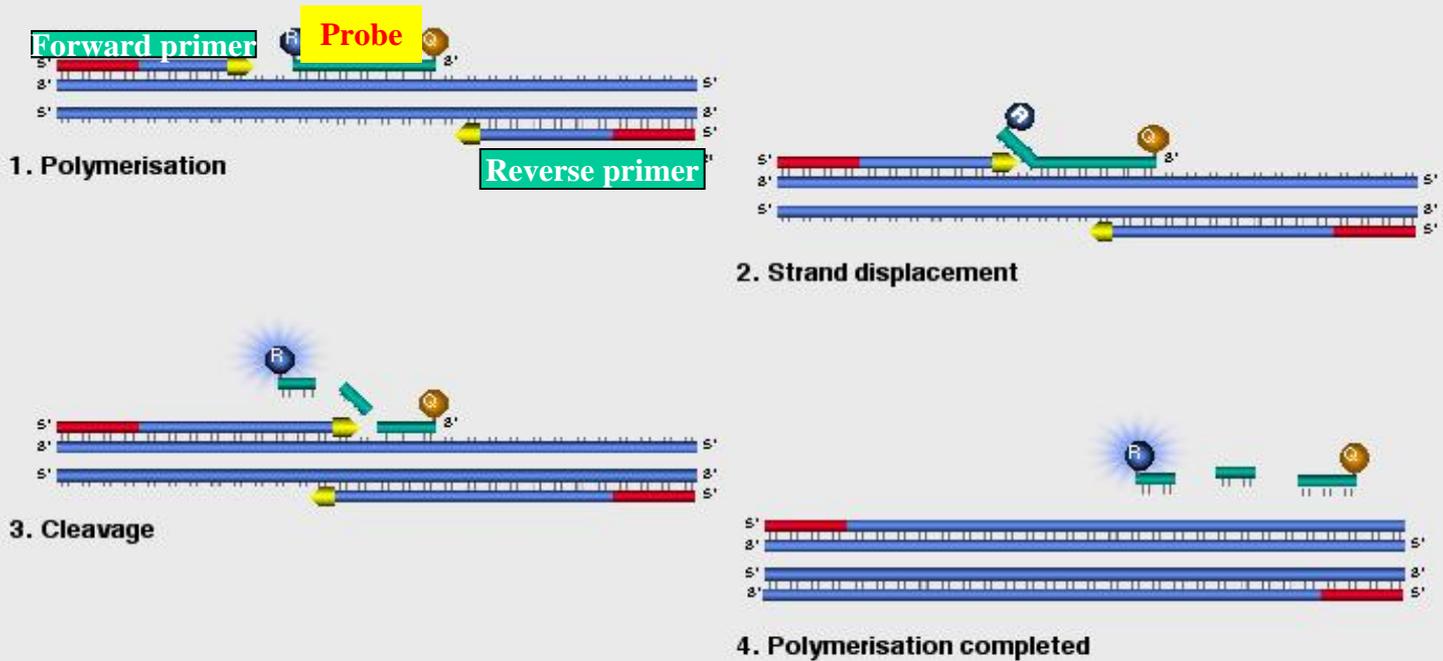
R = Reporter
Q = Quencher



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

Sonda Taq Man (Riassunto)

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

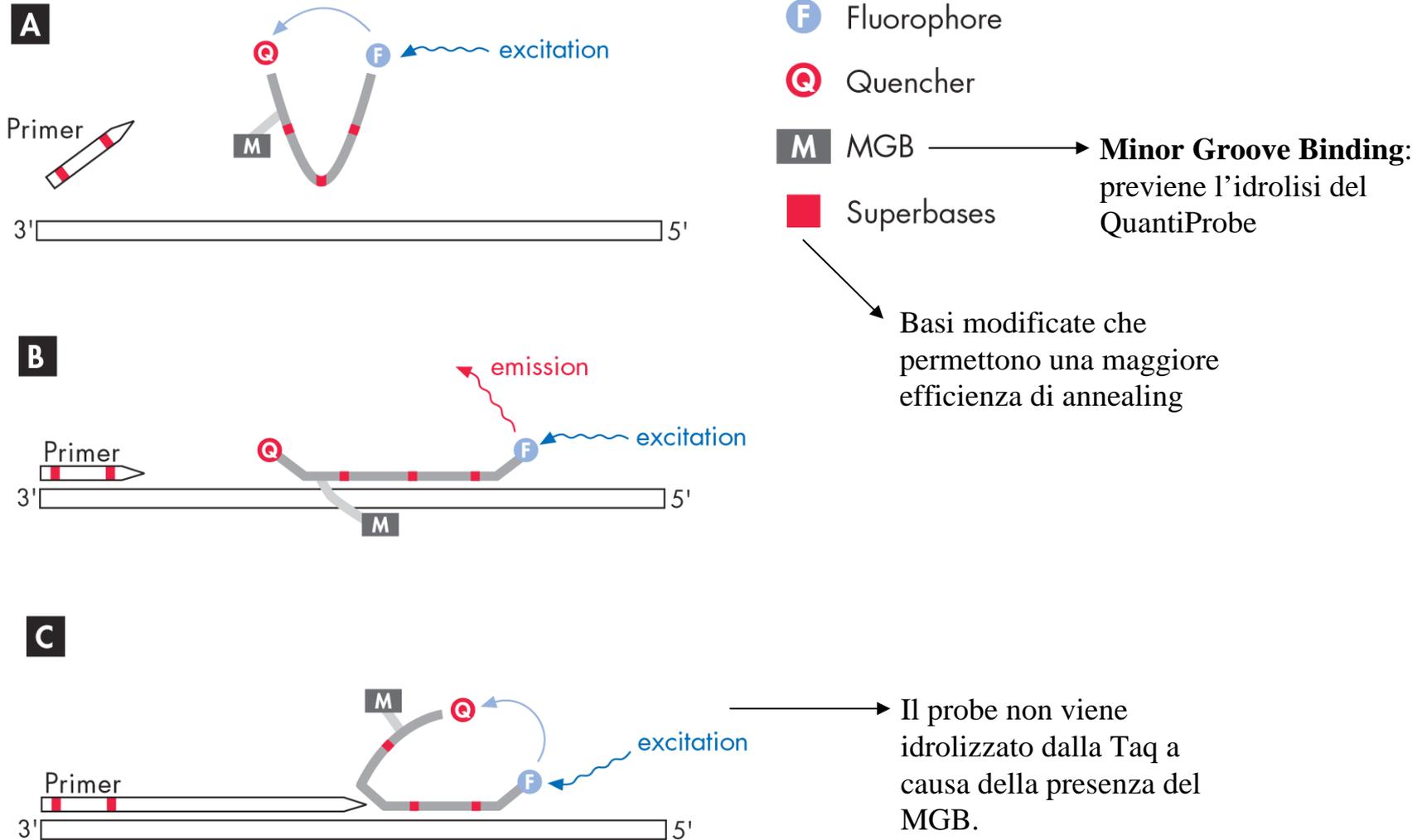
Durante l'amplificazione, la sonda si ibrida al template ed essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi.

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

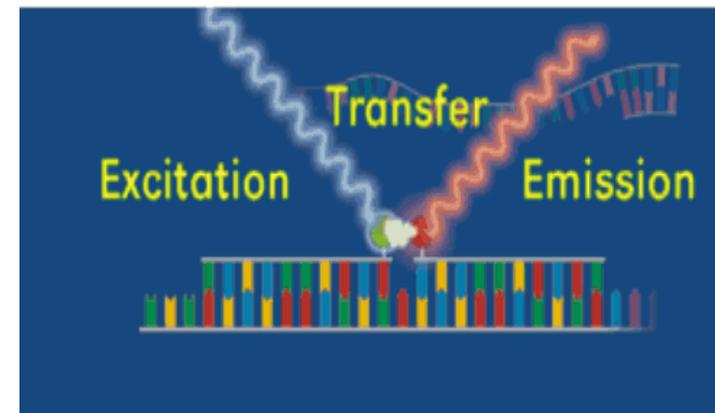
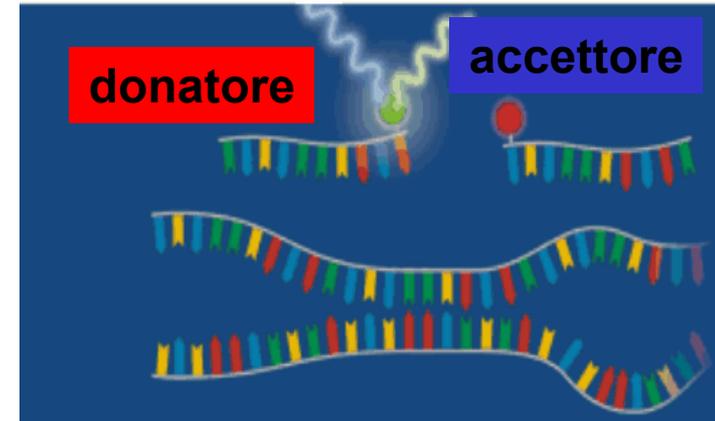
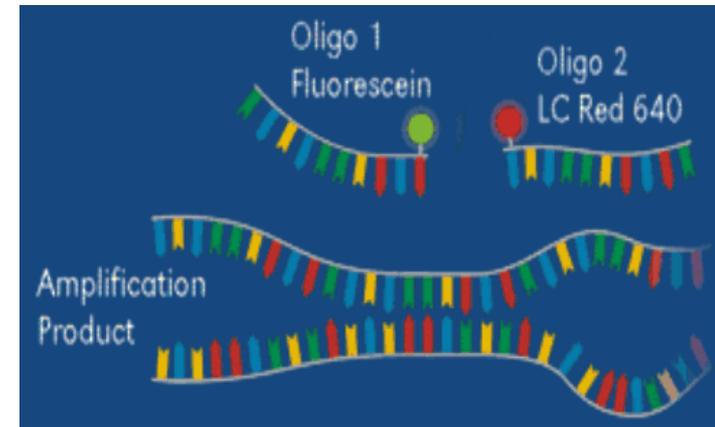


Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

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).

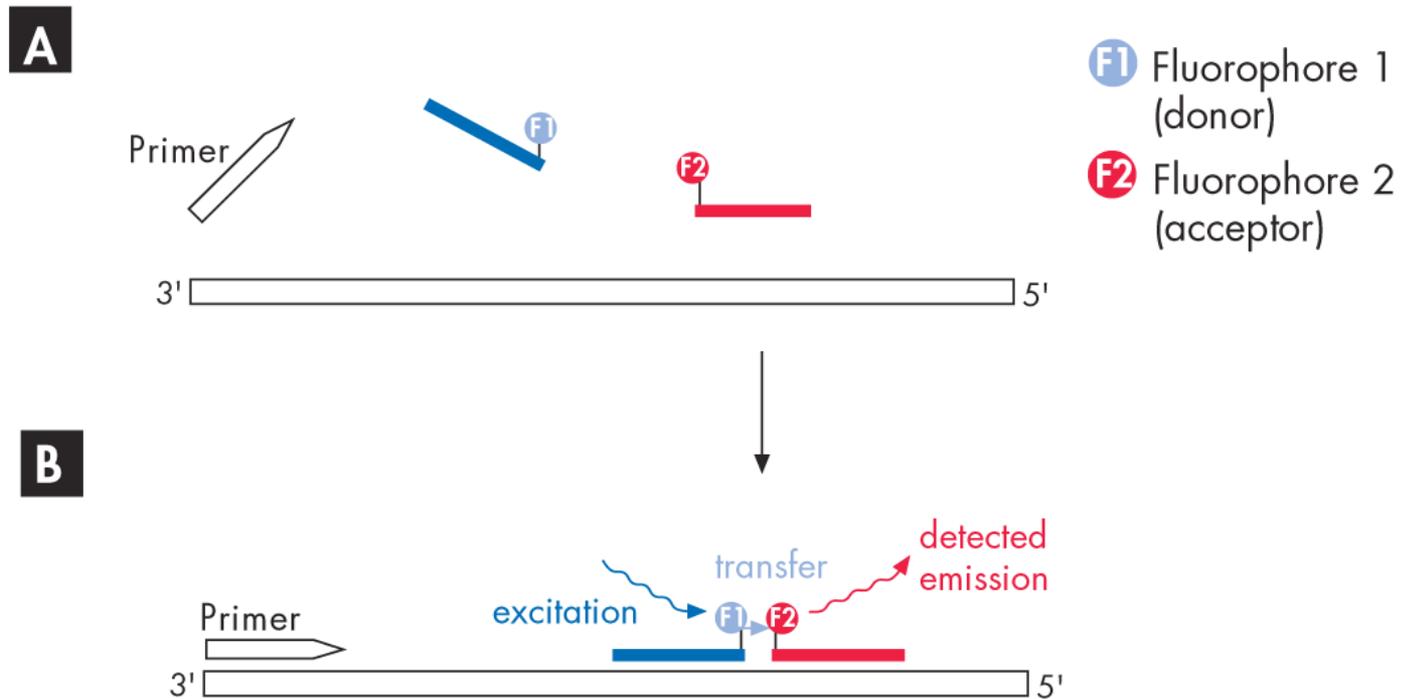
Quando le sonde non sono legate alle sequenze target, il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato.

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.



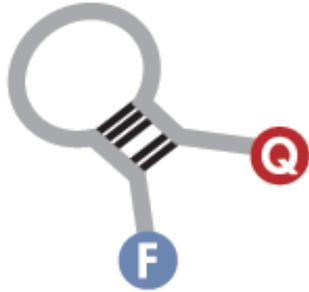
Sonde Fluorogeniche FRET

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

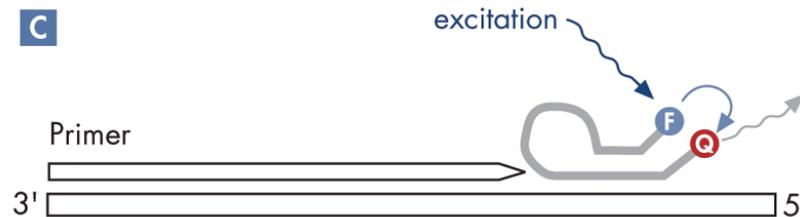
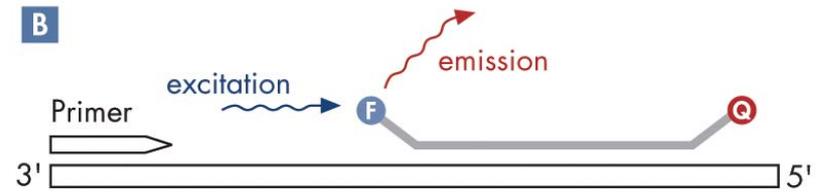


Sonde Fluorogeniche Molecular Beacons

F Fluorophore **Q** Quencher

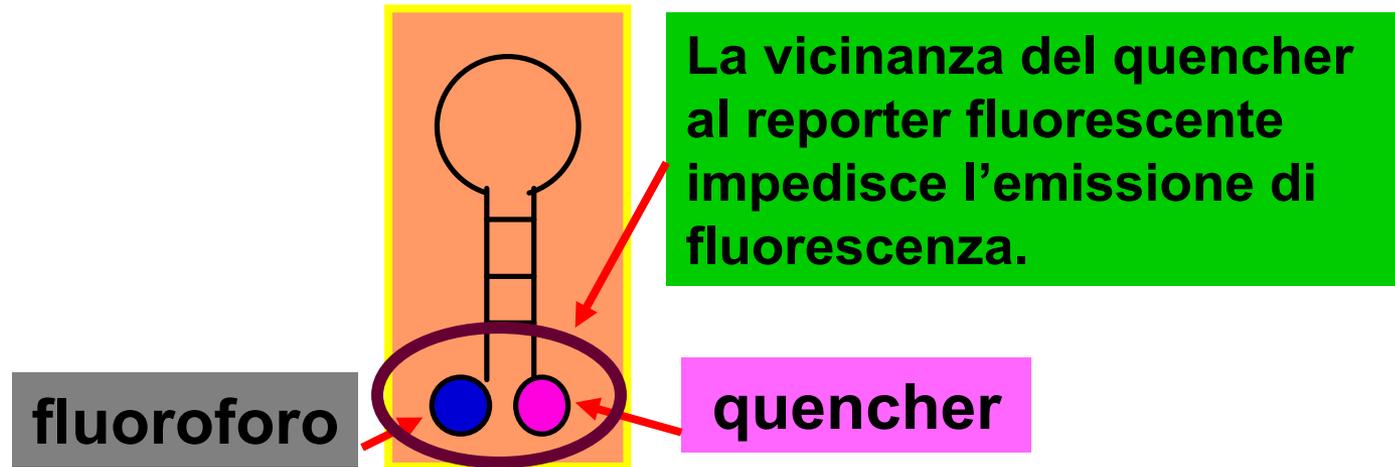


Sono sonde marcate con un fluorocromo al 5' e un quencher al 3'.
Le estremità del probe sono complementari, per cui in soluzione formano un'ansa a forma di stelo, che mantiene il fluoroforo e il quencher strettamente vicini.



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,



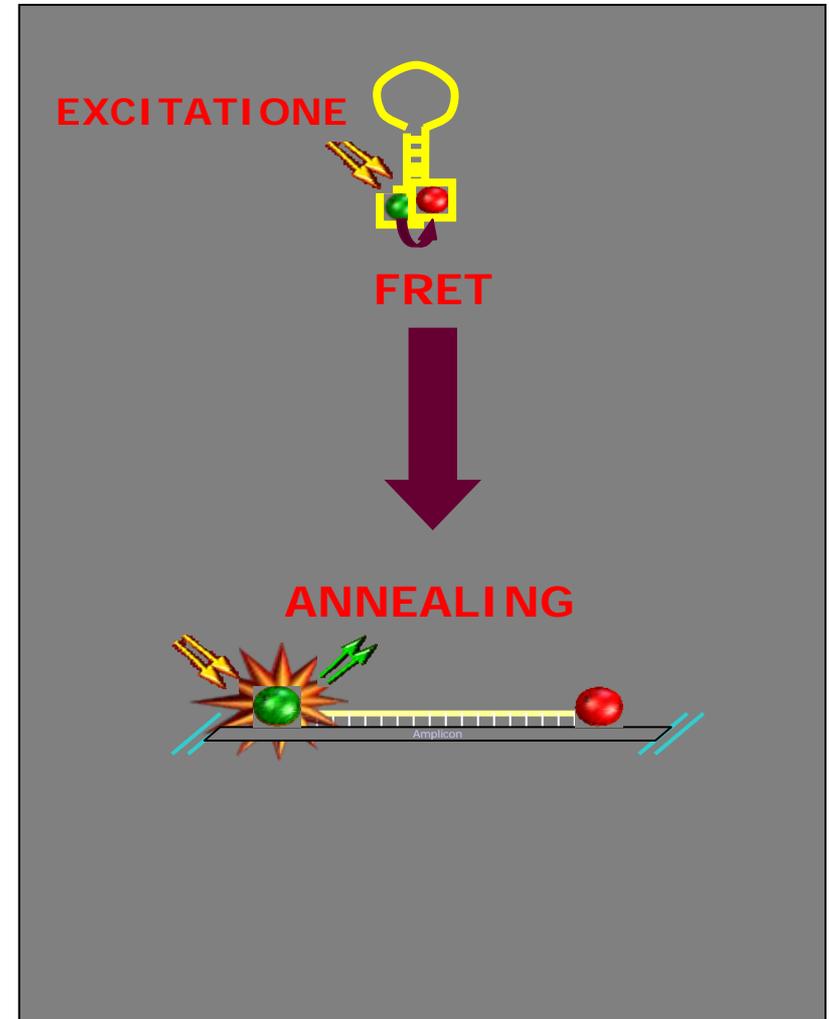
il loop è complementare ad una sequenza all'interno del prodotto amplificato.

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 ad 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 della Real-Time PCR

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

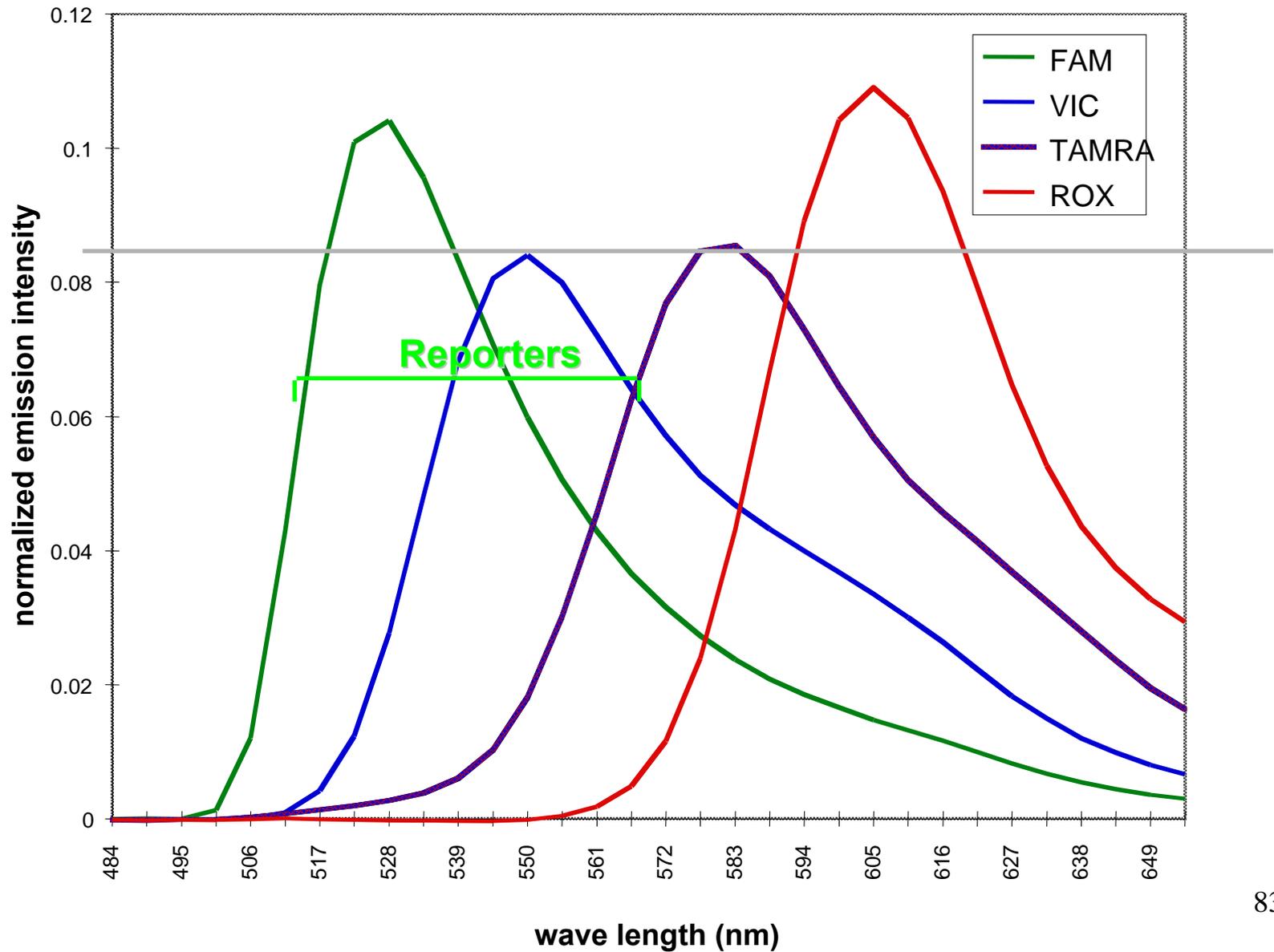
Dye	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)*
Fluorescein	490	513
Oregon Green	492	517
FAM	494	518
SYBR Green I	494	521
TET	521	538
JOE	520	548
VIC	538	552
Yakima Yellow™	526	552
HEX	535	553
Cy [®] 3	552	570
TAMRA	560	582
Cy3.5	588	604
ROX	587	607
Texas Red	596	615
LightCycler-Red 640 (LC640)	625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

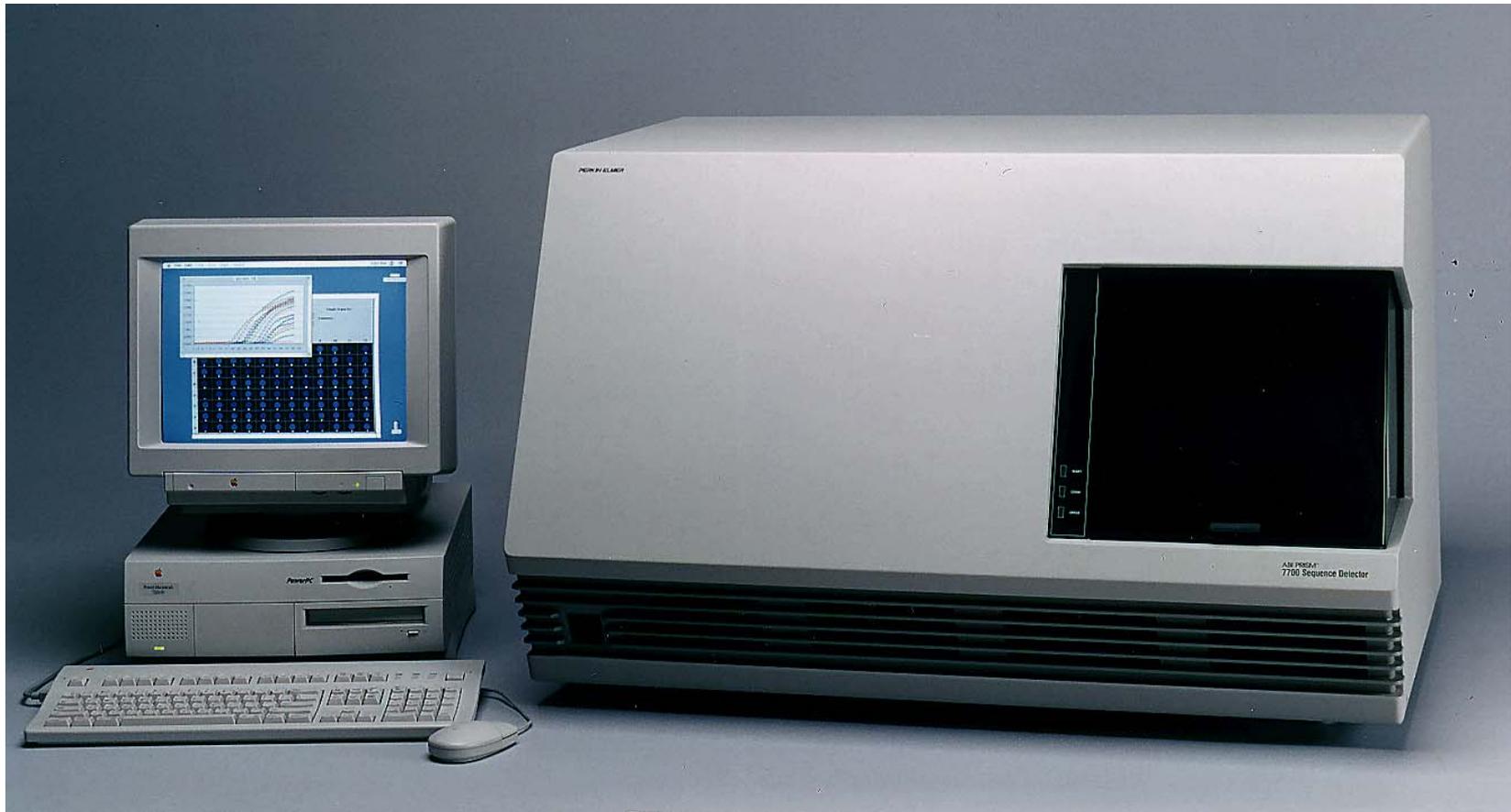
E' necessario scegliere il colorante in funzione dei loro spettri di emissione e assorbimento, in modo che siano sufficientemente distinti l'uno dall'altro.

Sonde Fluorogeniche TaqMan

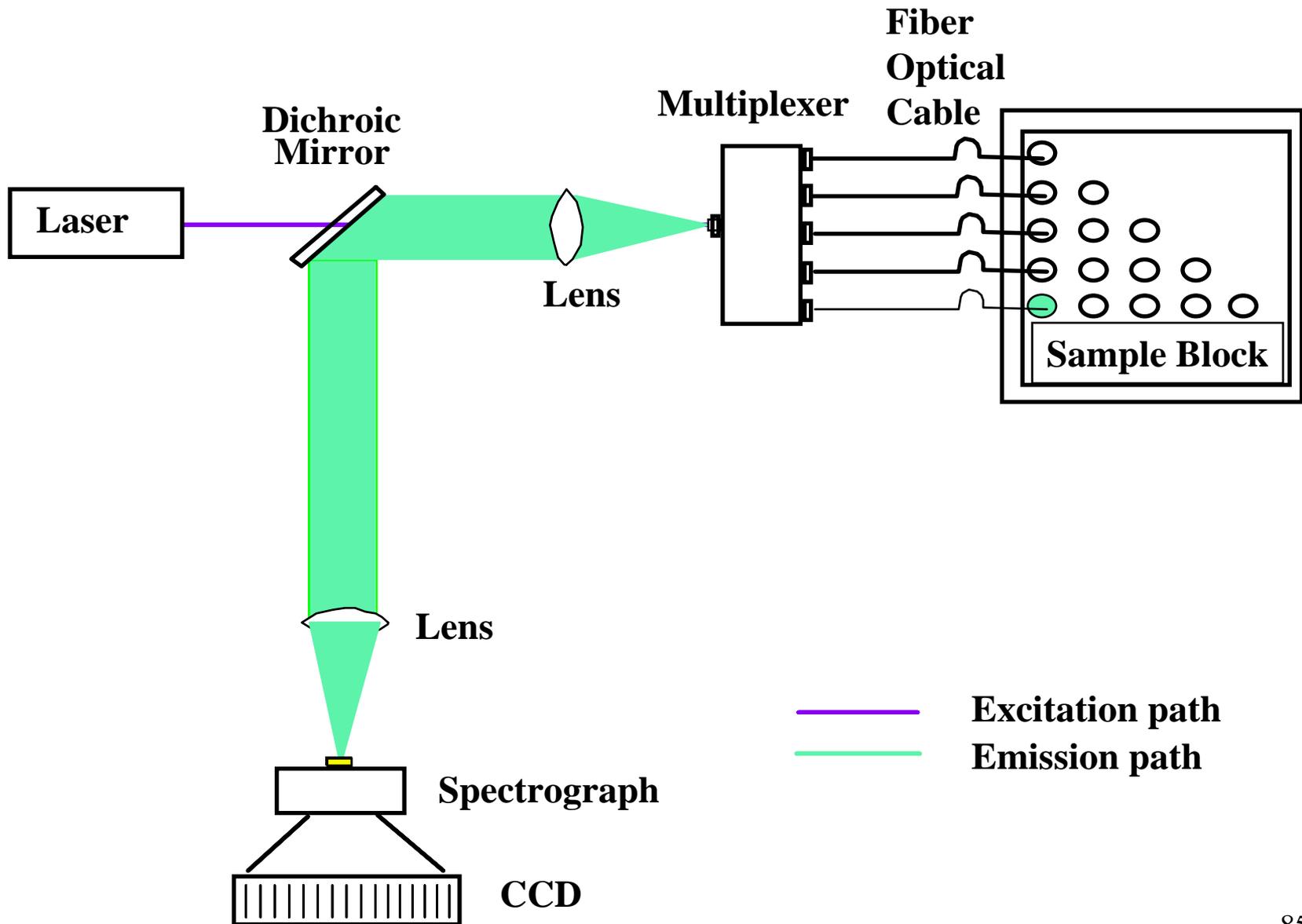


Real-Time PCR: Strumentazione

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System



Real-Time PCR: Strumentazione



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

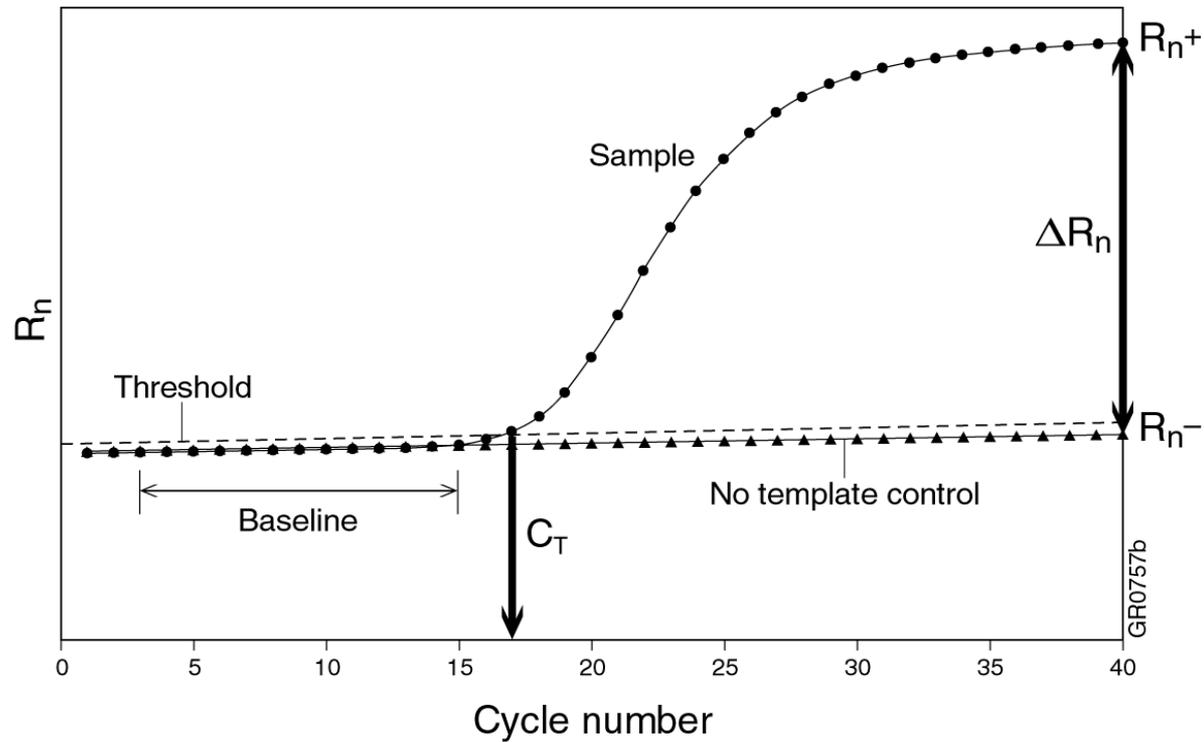
$$R_n^- = \frac{\text{Emission Intensity of Reporter}}{\text{Emission Intensity of Passive Reference}}$$

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

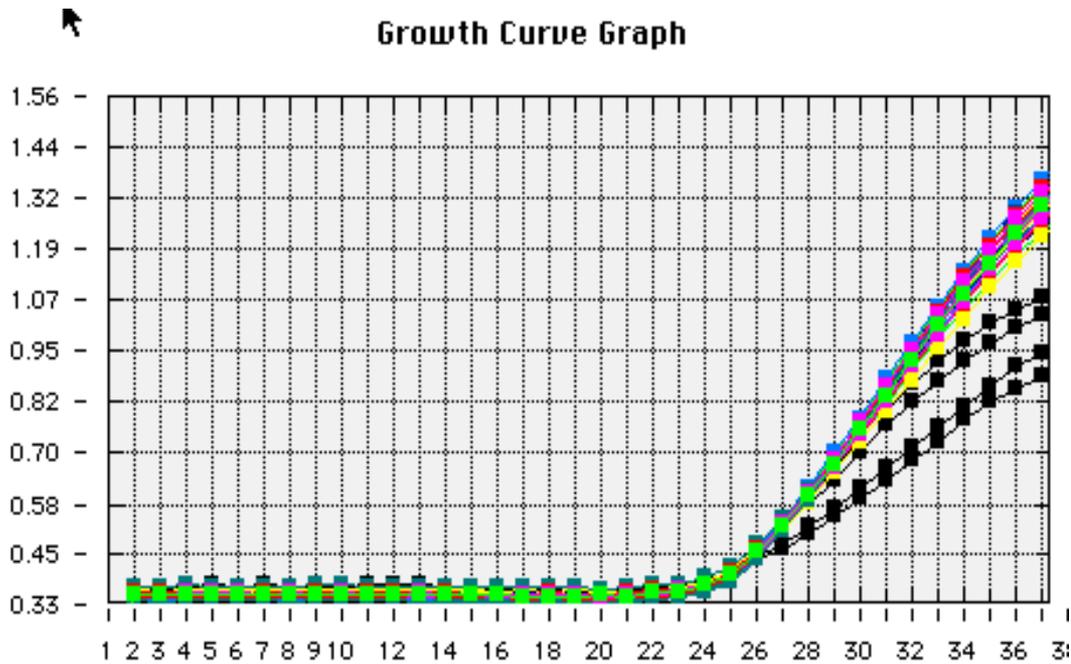
- R_n^+ è il valore di una reazione che comprende il template;
- R_n^- è il valore del campione che non reagisce (miscela senza template).

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

Interpretazione dei Risultati



Real-Time PCR



9,048

9,498

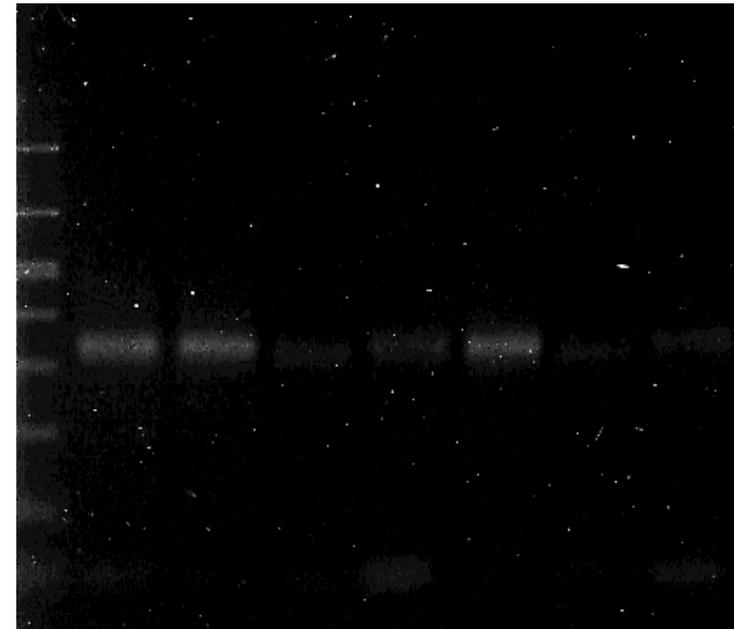
10,180

9,238

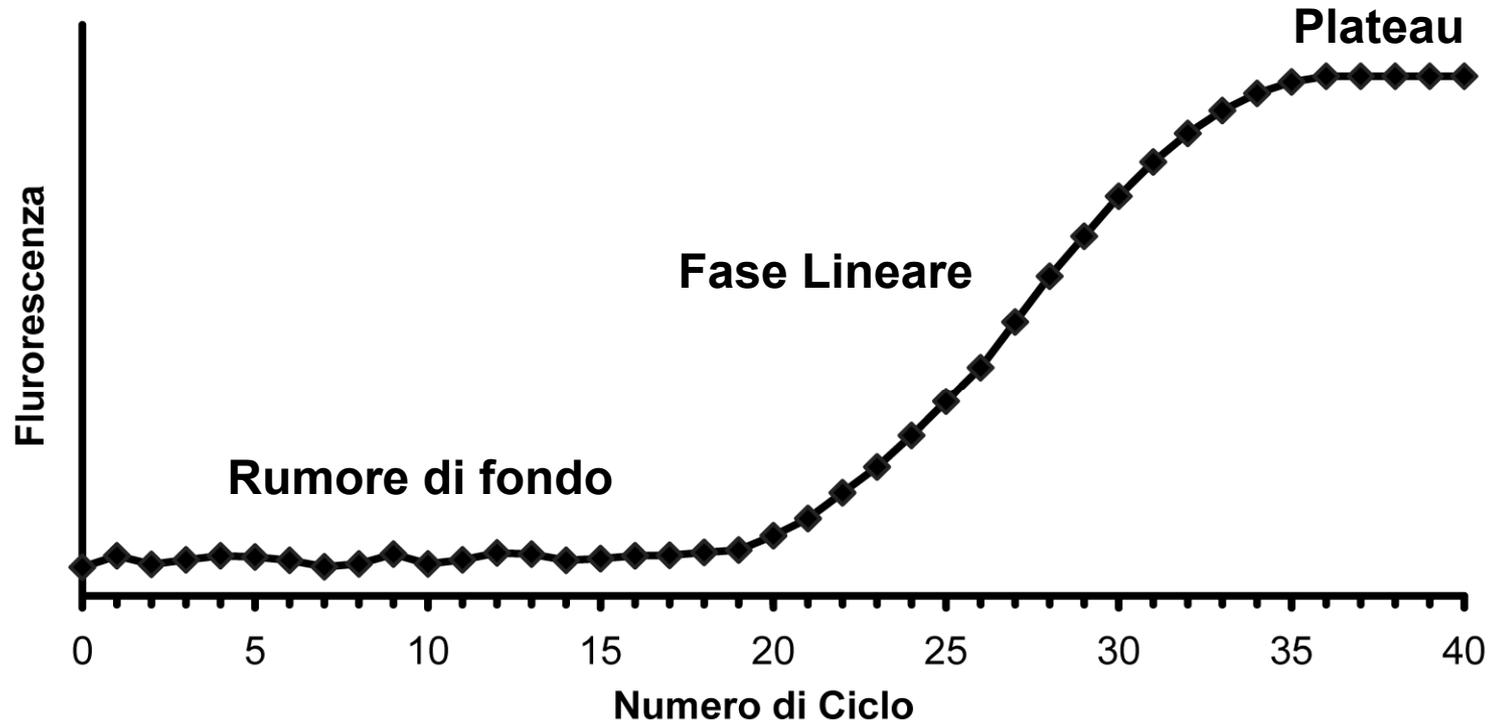
9,111

12,885

10,539



Real-Time PCR



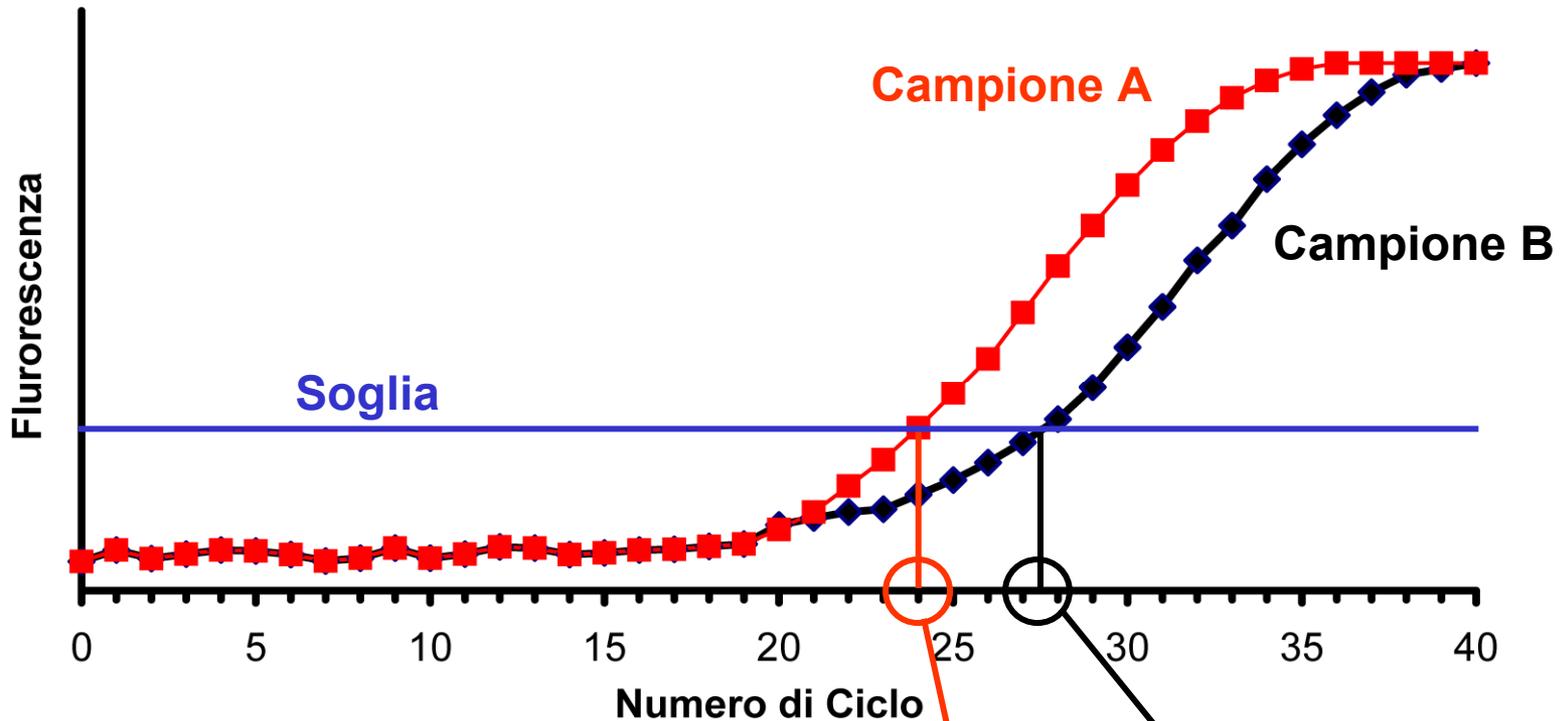
Real-Time PCR

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

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

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

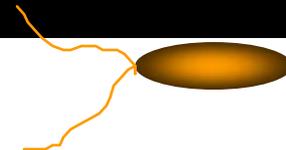
Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct),

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.

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, o in differenti momenti cellulari dello stesso tessuto.

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

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.

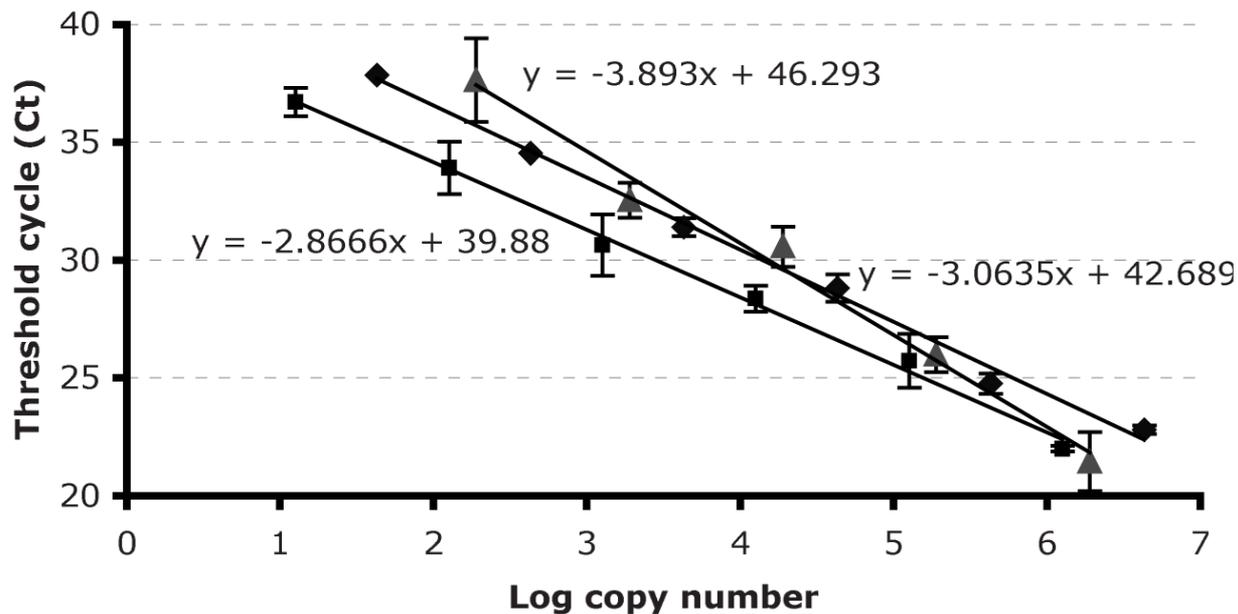
Viene usata per:

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

Quantificazione con Real-Time PCR

La quantificazione assoluta richiede:

1. Standard a concentrazione nota
2. Utilizzo di una curva standard



Quantificazione con Real-Time PCR

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

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.

