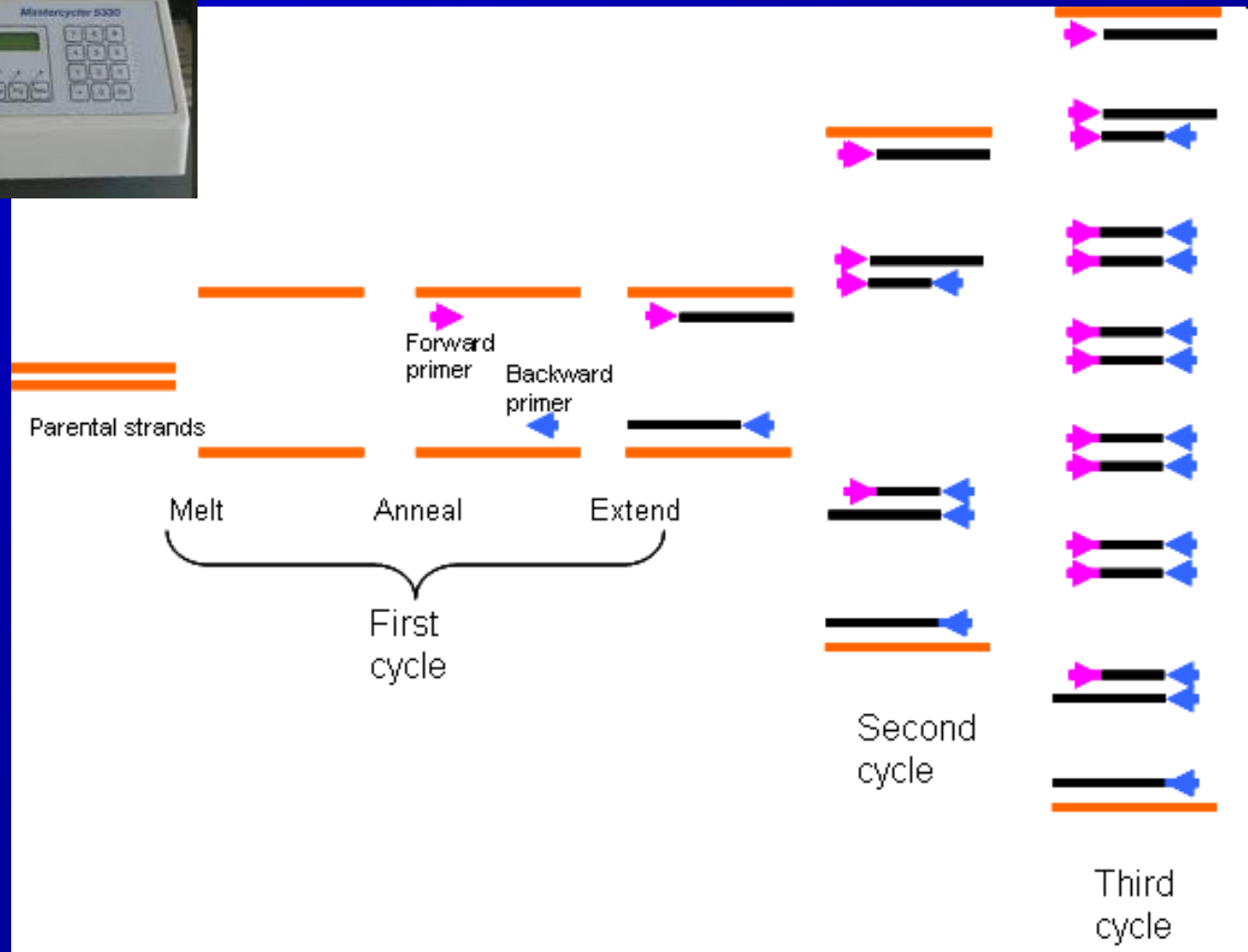


Alcune Tecnologie del DNA

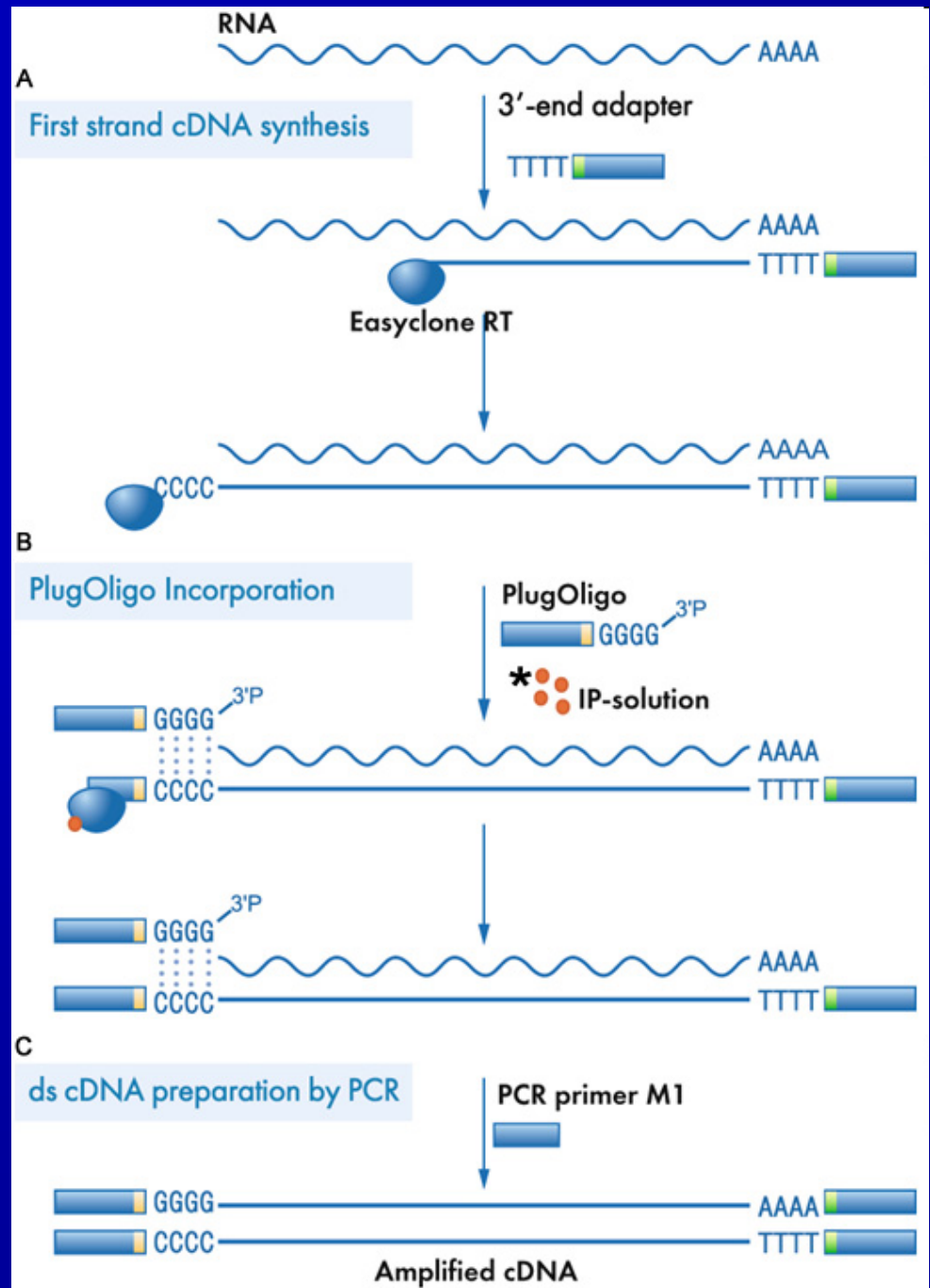
- Estrazione di acidi nucleici
 - » DNA
 - » RNA
- Taglio del DNA con enzimi di restrizione
- Elettroforesi
- Generazione DNA ricombinante
- Clonaggio
- Costruzione libreria genomica
- Impiego di sonde di acido nucleico
- Southern Blotting
- Fingerprinting
- Sequenziamento del DNA
- DNA microarray
- PCR:
 - Qualitativa
 - RT-PCR: Formazione del cDNA
 - Real time-PCR
 - ddPCR

PCR



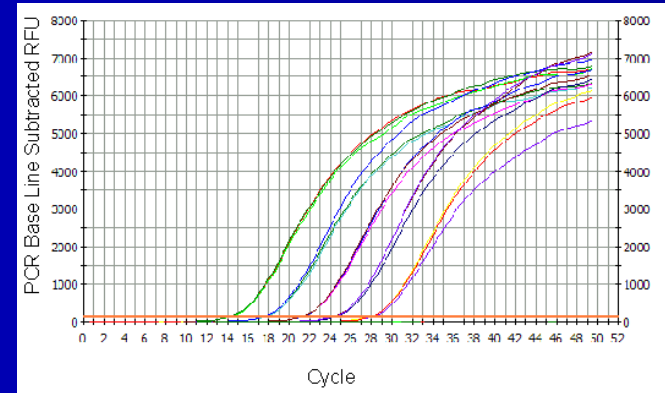
RT-PCR

(retrotrascrizione)



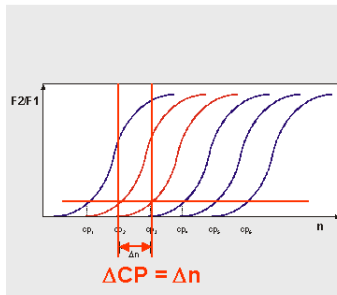
Real-time PCR

(seconda generazione della PCR)



Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



$$N_2 = N_{02} \times E^{n_2} \quad N_3 = N_{03} \times E^{n_3}$$

$$\text{For } N_2 = N_3:$$

$$N_{02} / N_{03} = E^{n_3 - n_2} = E^{\Delta n}$$

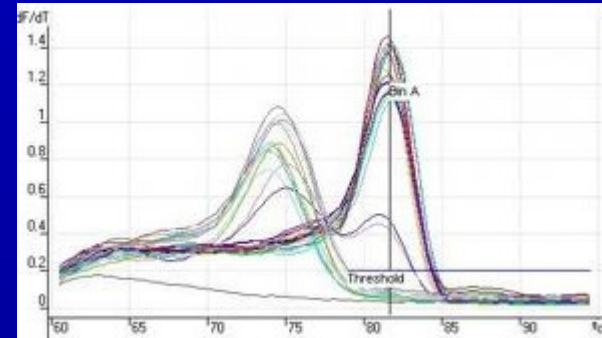
$$\text{For } N_{02} = 10 \times N_{03} \text{ (10-fold dilutions):}$$

$$\Delta n = 1 / \log E \quad E = 10^{-1/\text{slope}}$$

e.g. $E = 2.0 \quad \Delta n = 3.32$
 $E = 1.9 \quad \Delta n = 3.58$
 $E = 1.8 \quad \Delta n = 3.91$

Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, page 21-34



Real Time PCR

La Real Time PCR permette in tempo reale di monitorare la reazione di PCR mediante emissione di fluorescenza

Viene stimata l'iniziale quantità di template di DNA

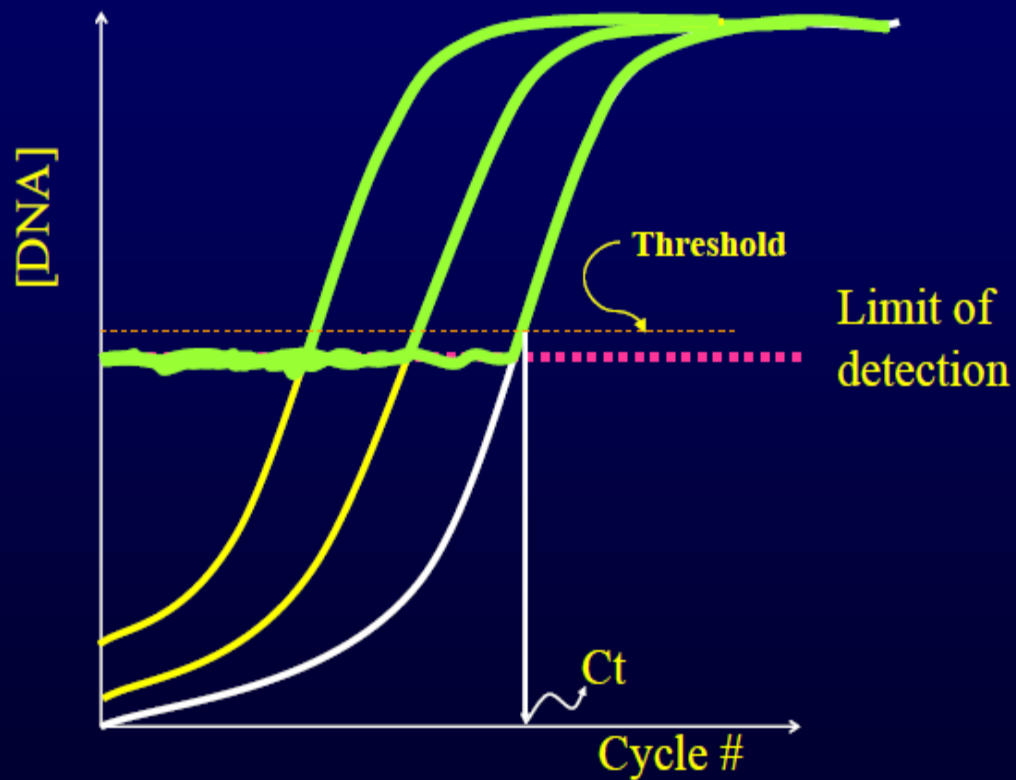
Basata sulla quantificazione di fluorescenza

Ct (ciclo soglia) è il ciclo soglia al di sopra del quale si ha l'esponenziale aumento della quantità di DNA prodotto per PCR.

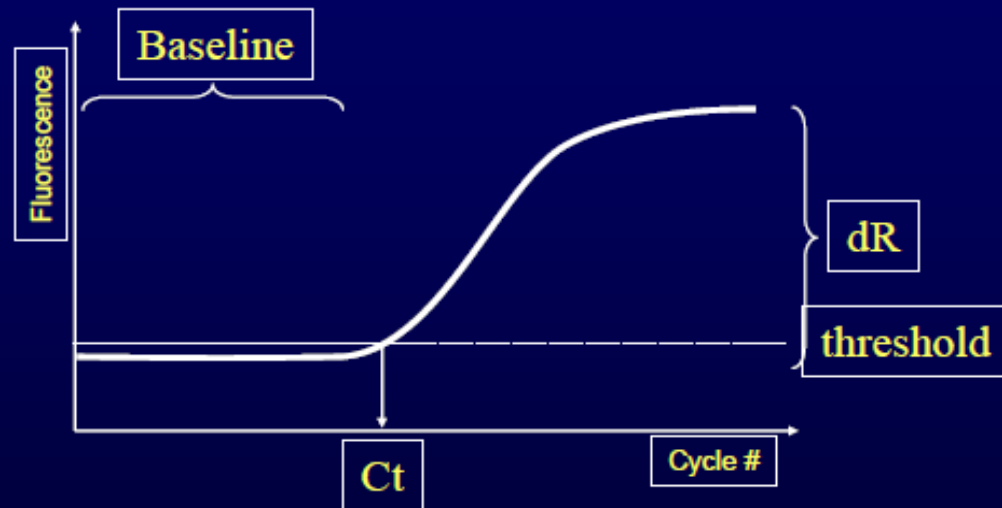
Il ciclo soglia correla con il DNA iniziale

A concentrazione alta di DNA iniziale si ha un basso ciclo soglia.

Quantitative PCR



Definition: C_t value



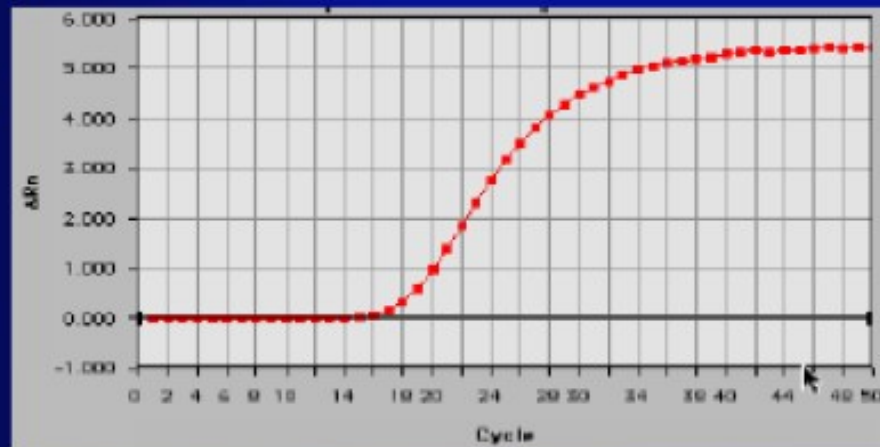
- C_t : Fractional cycle number at which the fluorescence intensity crosses the arbitrary threshold line.
- It is the parameter used for quantitation
 - C_t value of 40 or more means no amplification and cannot be included in the calculations

Real-time PCR is kinetic

- Detection of “amplification-associated fluorescence” at each cycle during PCR
- No gel-based analysis at the end of the PCR reaction
- Computer based analysis of the cycle-fluorescence time course

Increasing
fluorescence

Linear plot



PCR cycle

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:

1. retrotrascrizione dell'RNA,
2. amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase.

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.

Sonde fluorescenti

```
graph TD; A[Sonde fluorescenti] -- cyan arrow --> B[Sybr green]; A -- red arrow --> C[Sonde taq-man]; B -- cyan arrow --> D[Sonda aspecifica]; C -- red arrow --> E[Sonda specifica];
```

Sybr green

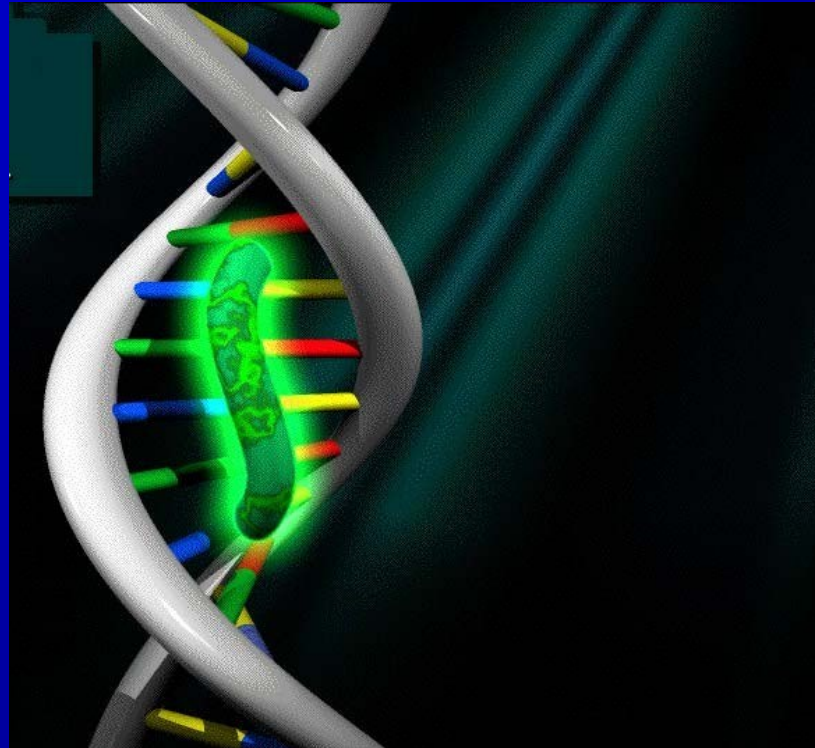
Sonde taq-man

Sonda aspecifica

Sonda specifica

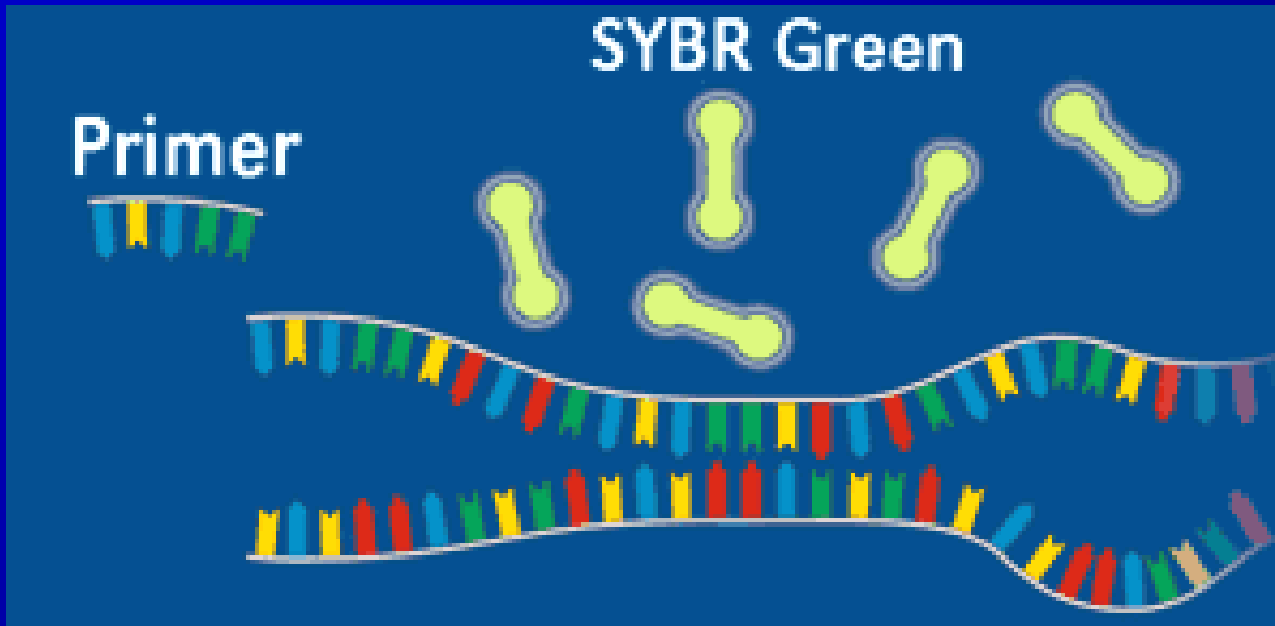
SYBR Green

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



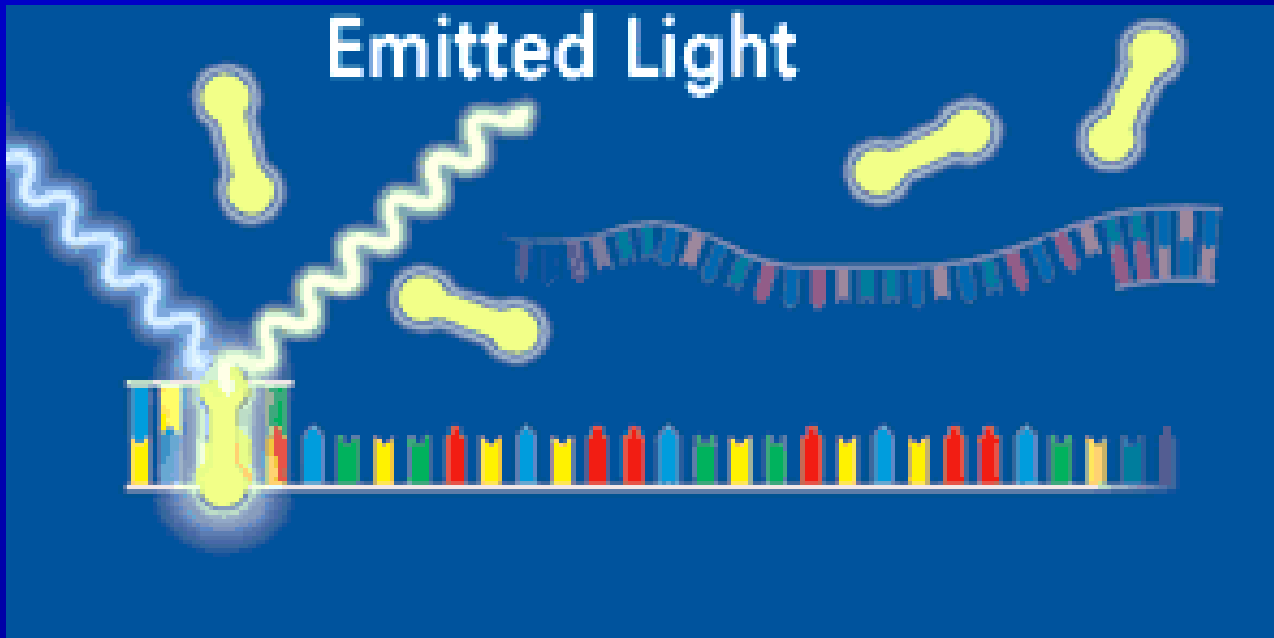
SYBR Green

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



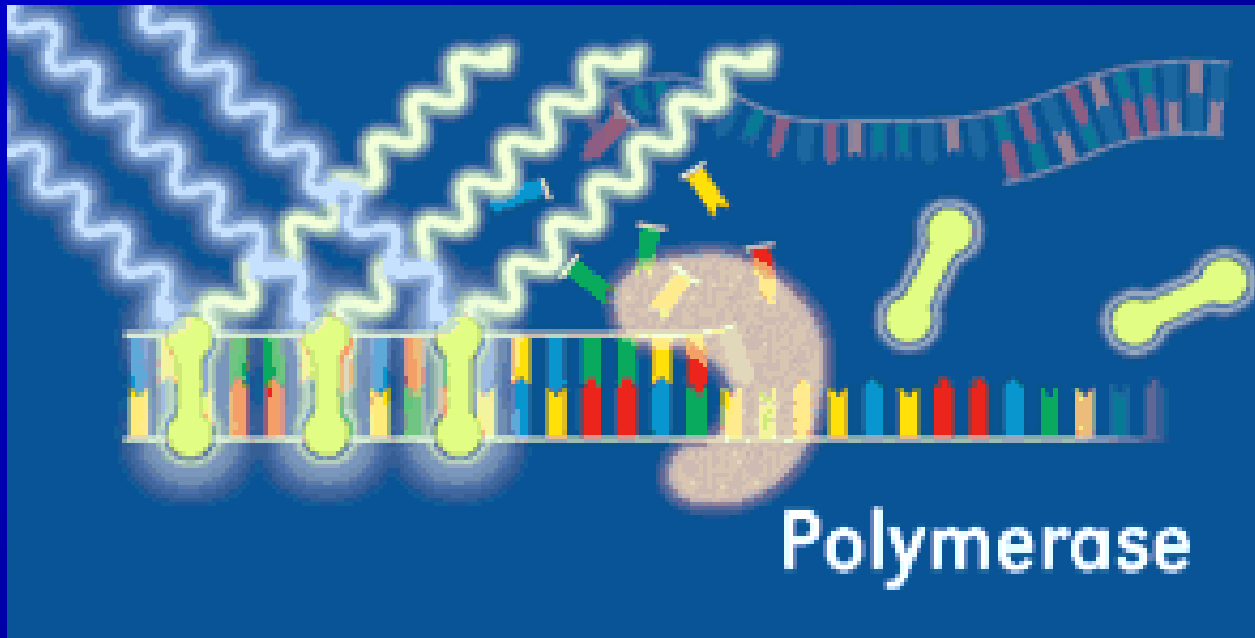
SYBR Green

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



SYBR Green

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

Vantaggi

Costo minore
Analisi di numerosi
target

Svantaggi

Prodotti non specifici e
Dimeri di primer
possono contribuire al
segnale fluorescente

Sonde specifiche marcate con fluorocromi

L'utilizzo di sonde fluorescenti specifiche 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.

Sonde specifiche marcate con fluorocromi

Sonde specifiche marcate con fluorocromi



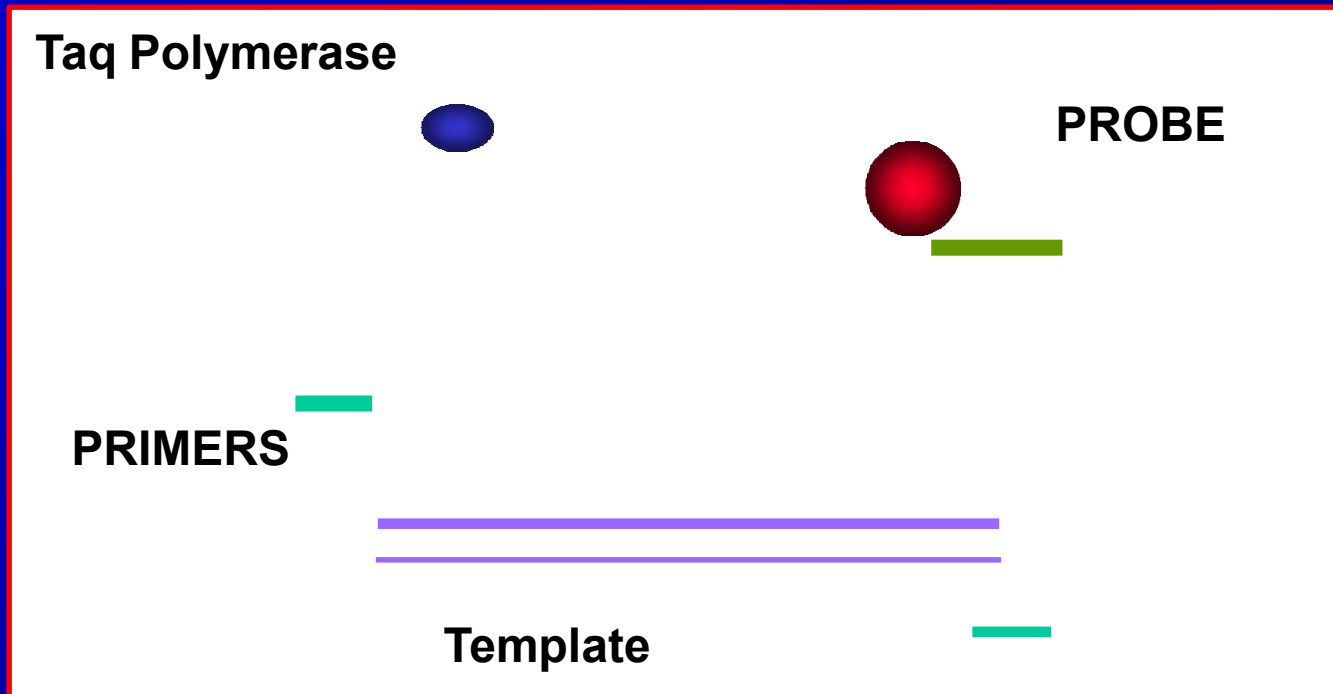
Sono un metodo di rivelazione altamente specifico e sensibile. La sonda deve essere disegnata in una porzione del DNA target compresa fra due normali primers.



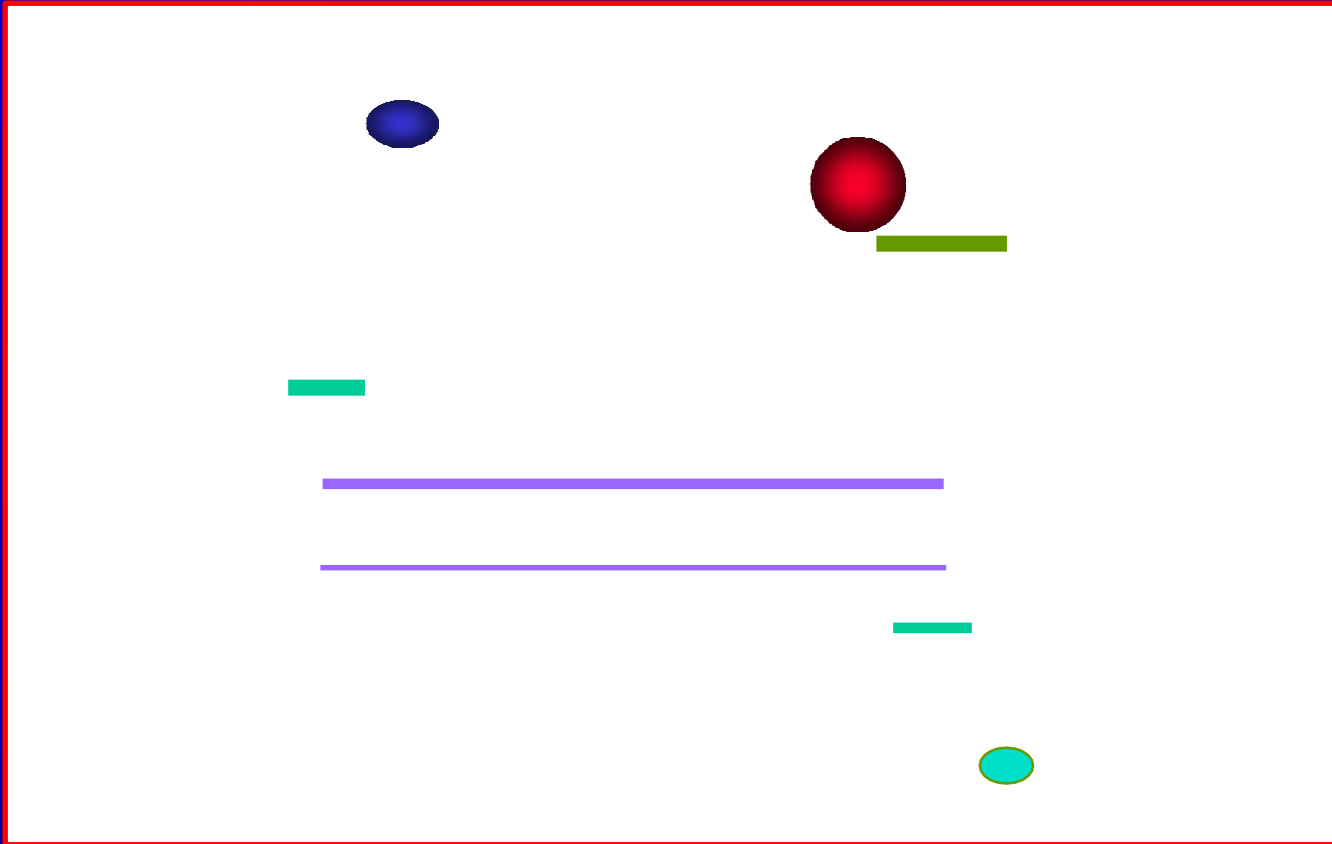
Prodotti aspecifici della PCR non vengono rivelati, quindi si ha un aumento della specificità.

Per ogni target bisogna disegnare una sonda fluorigenica specifica (maggiori costi).

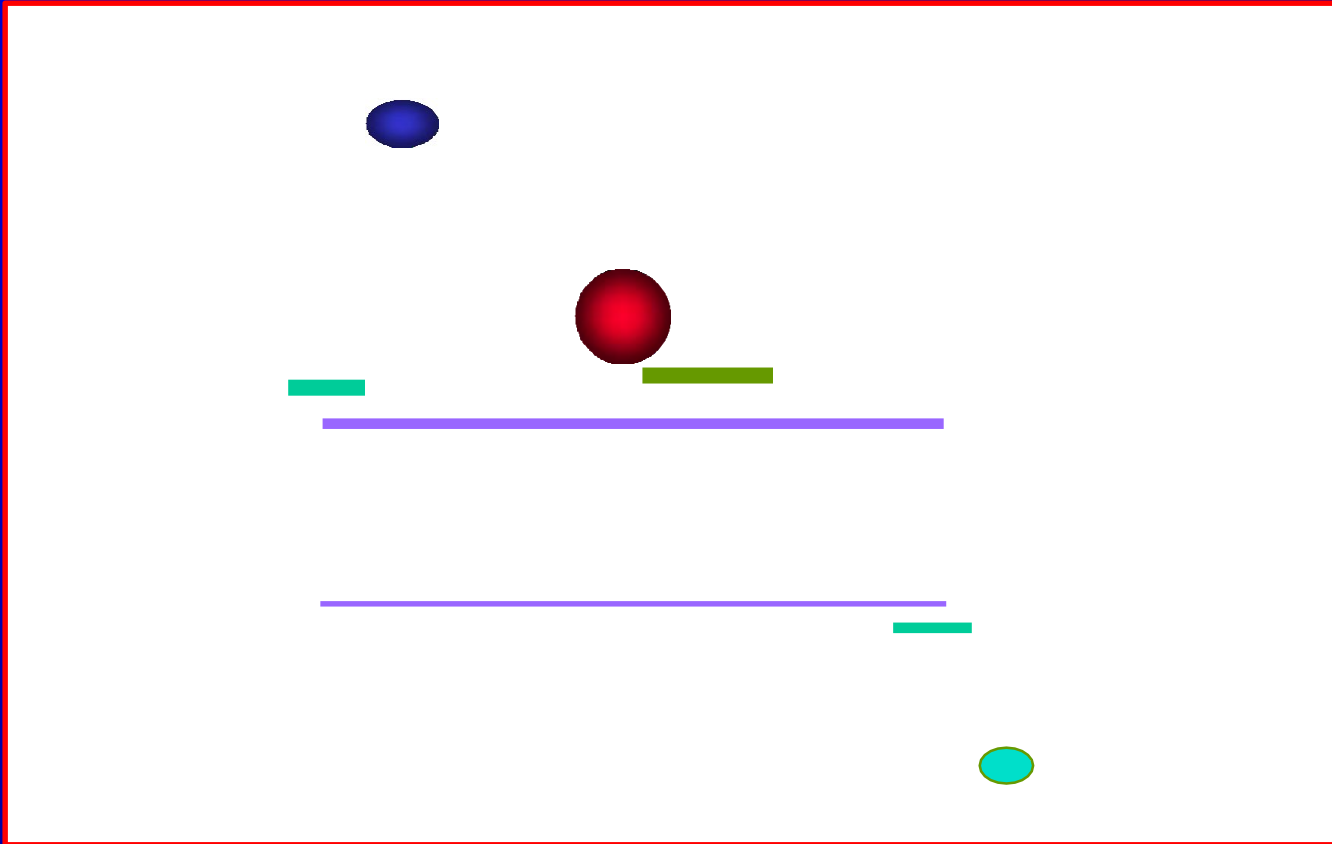
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



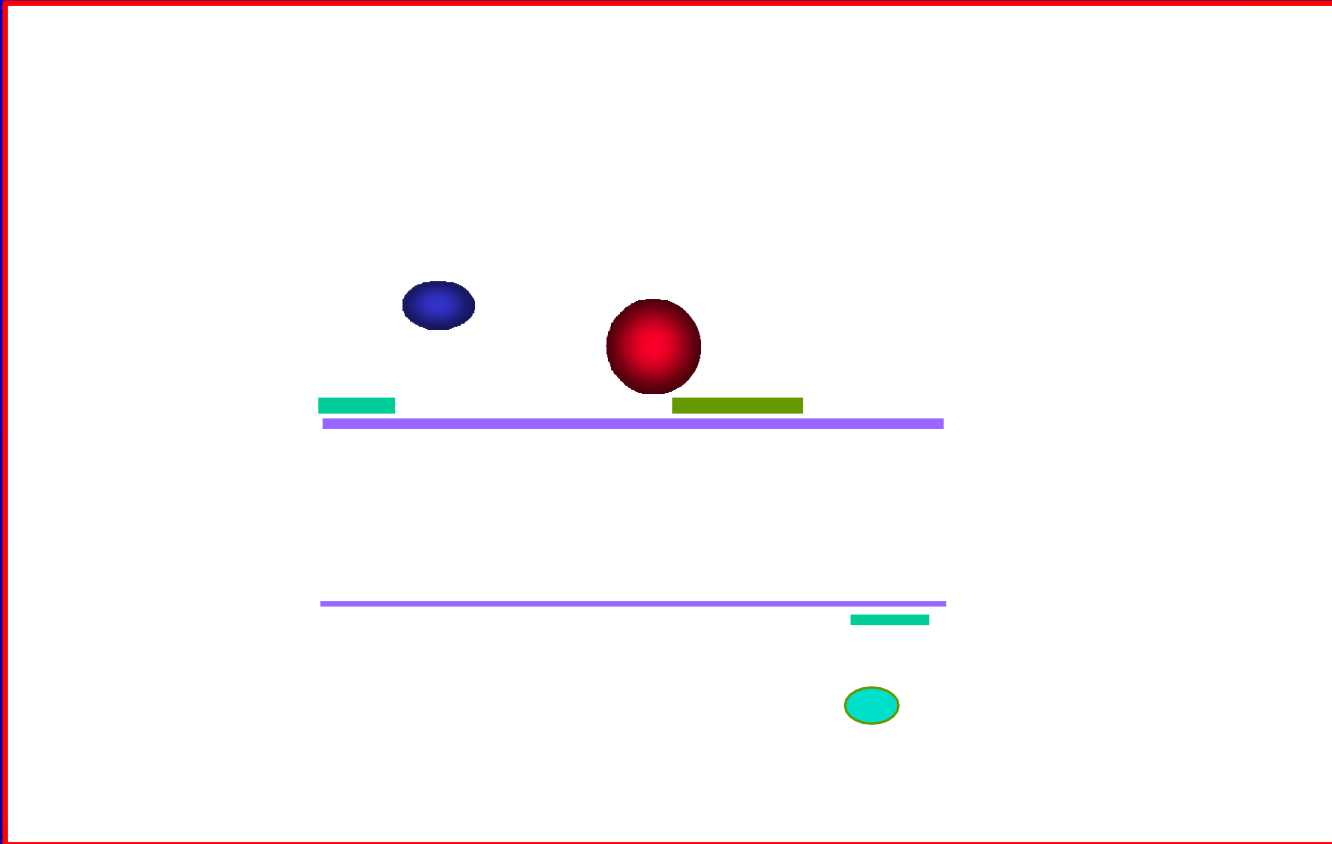
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



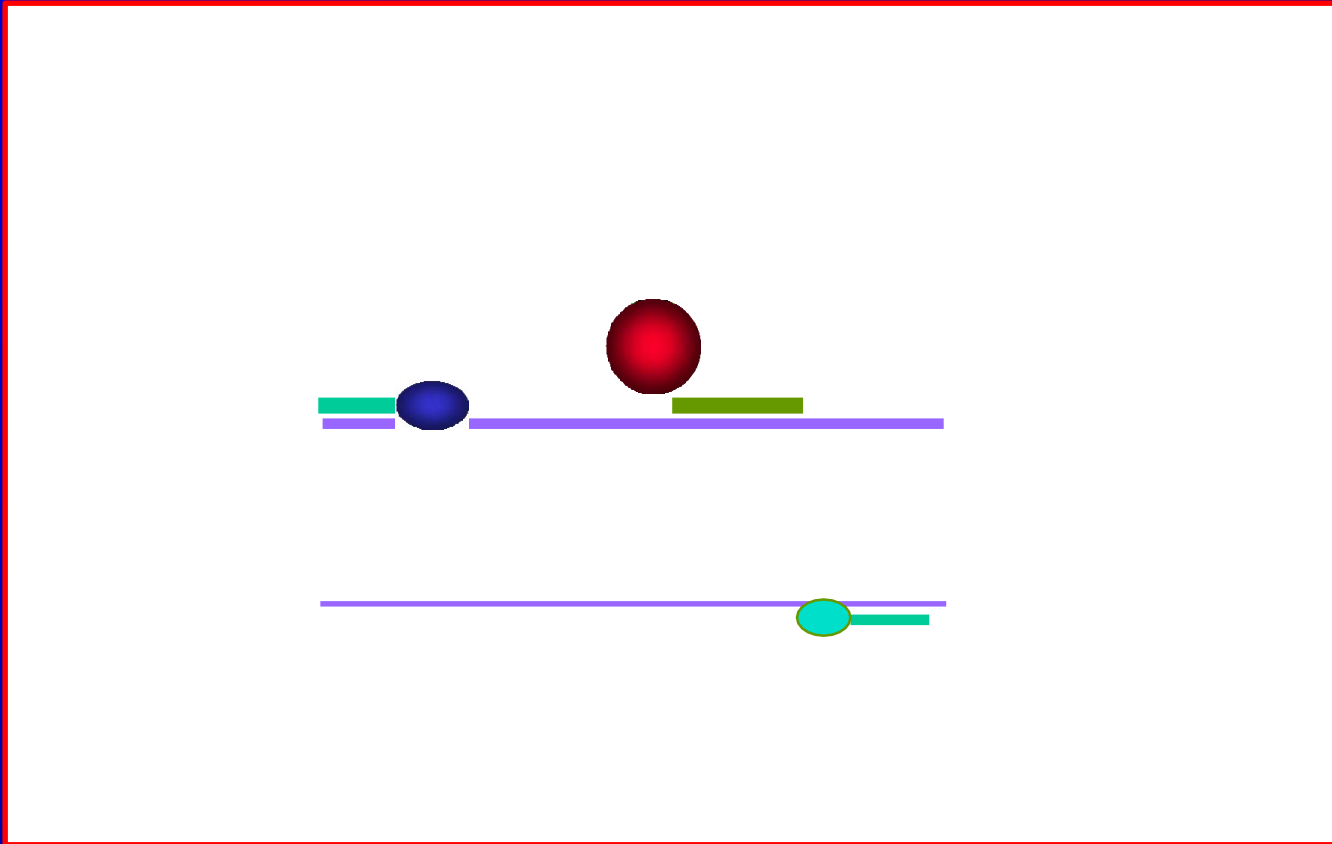
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



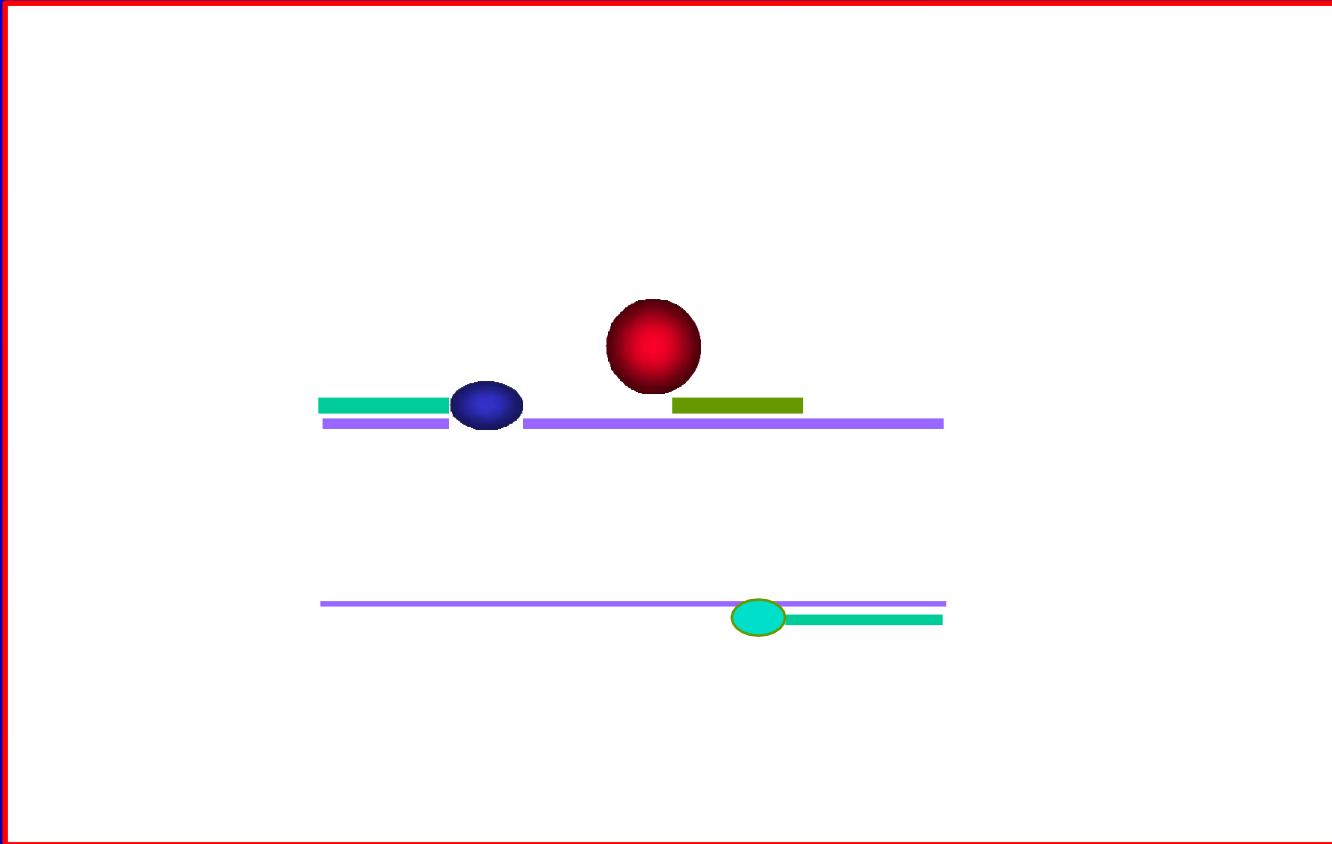
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



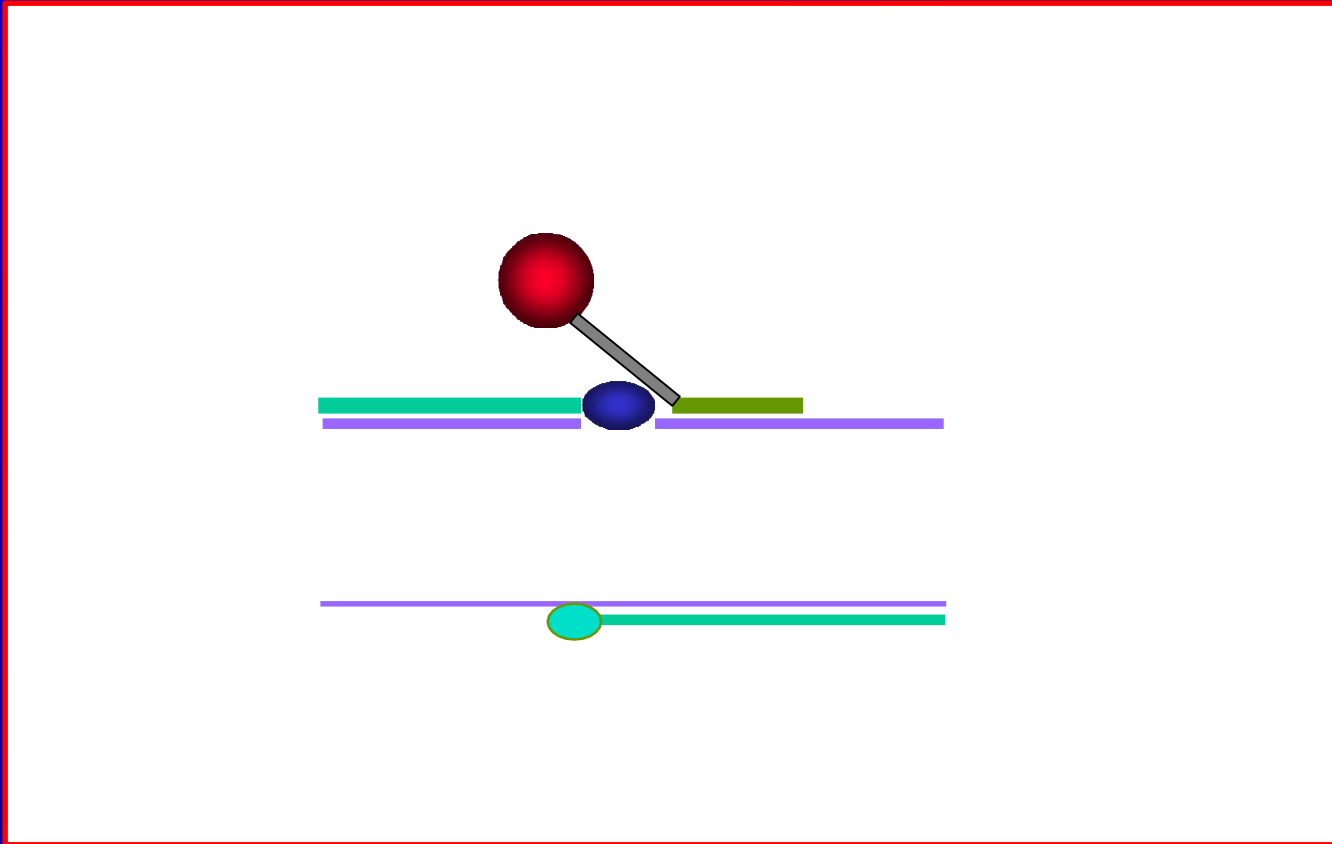
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



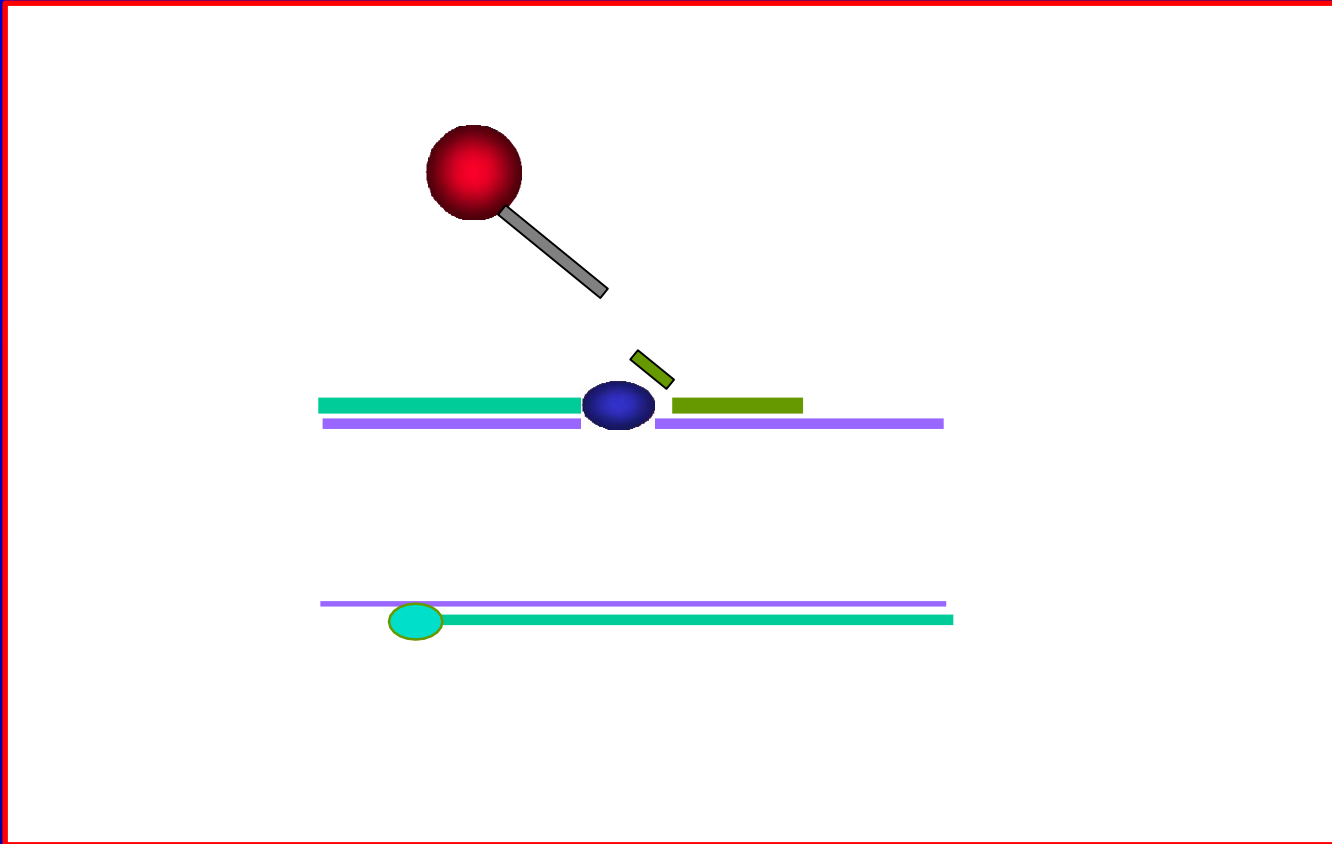
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



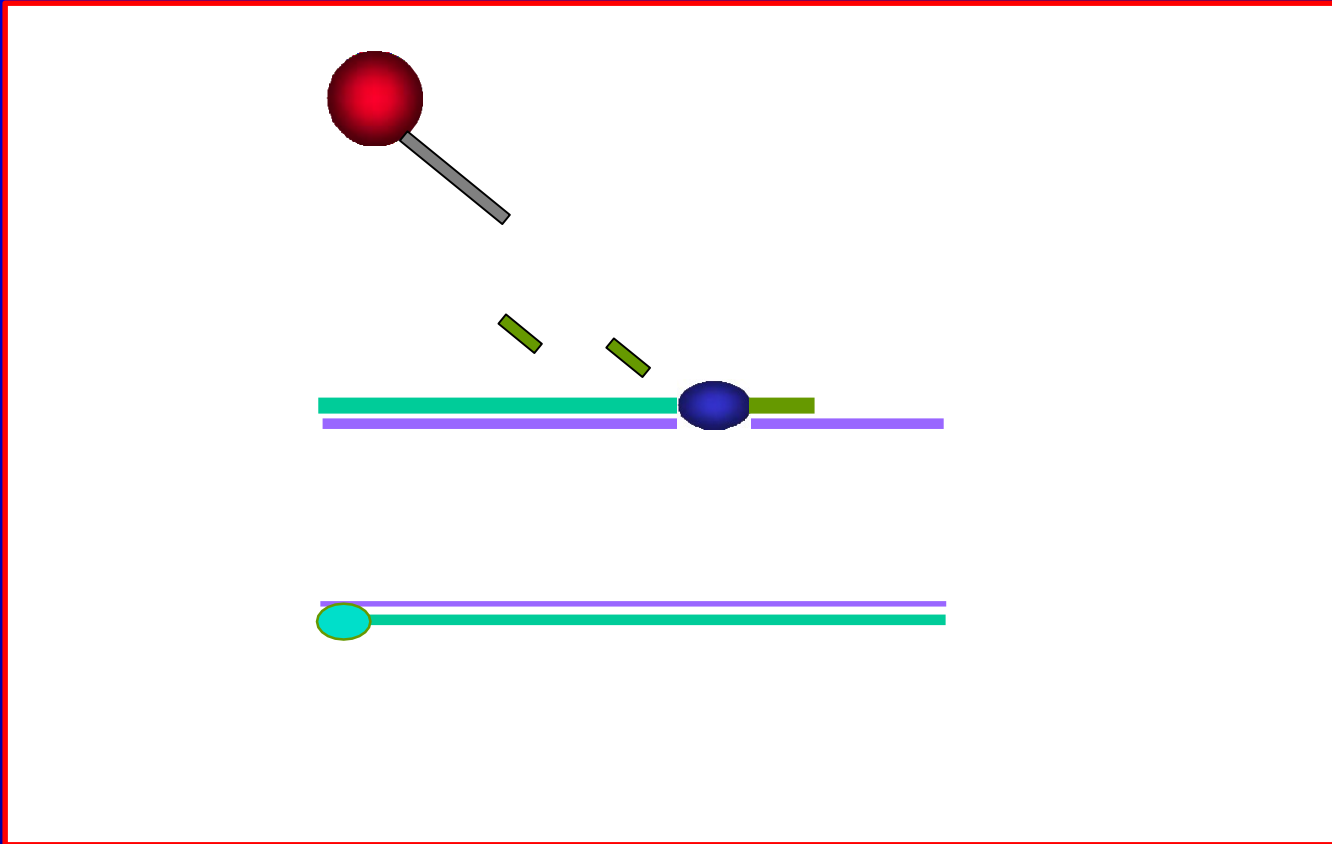
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



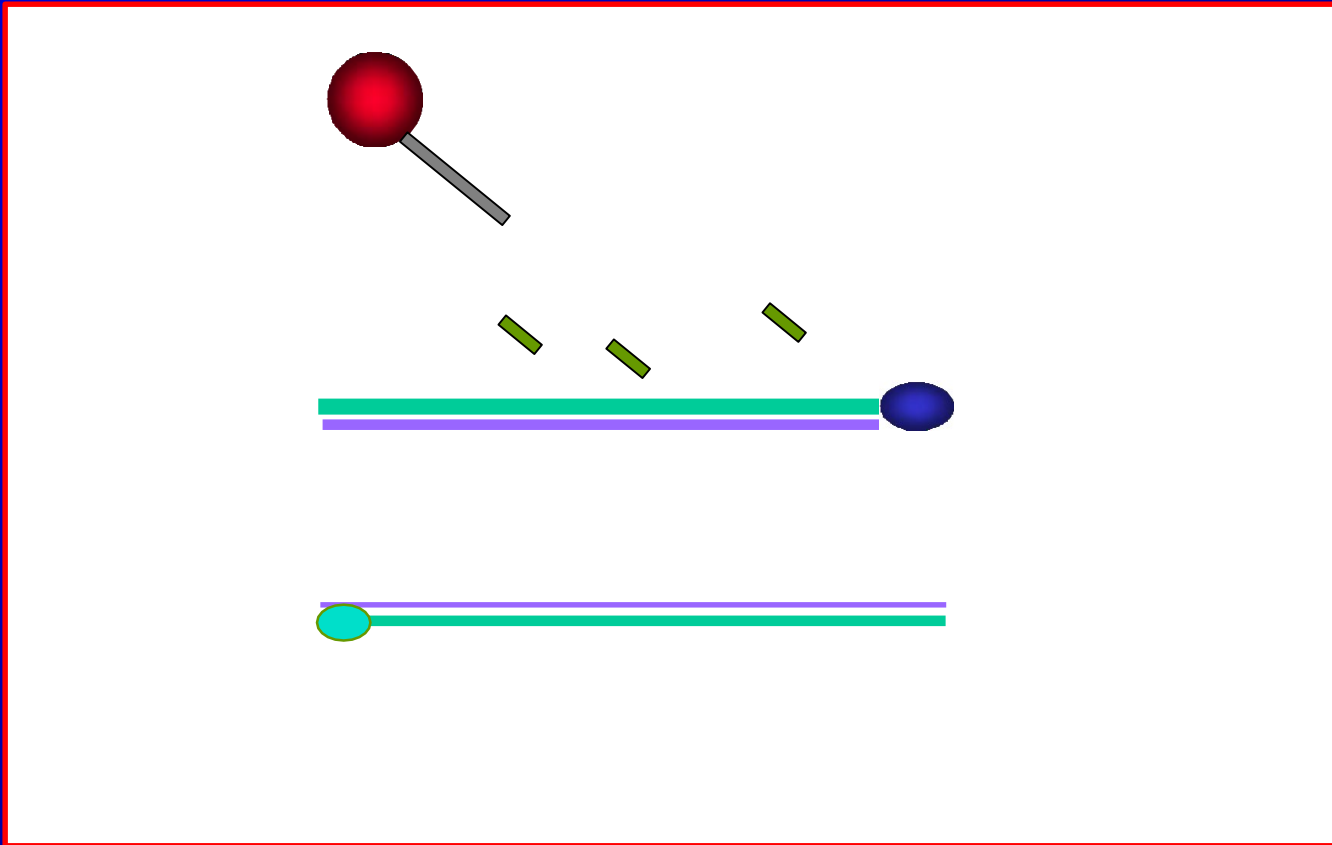
Sonde specifiche marcate con fluorocromi



Sonde specifiche marcate con fluorocromi



Sonde specifiche marcate con fluorocromi



Sonde della Real-Time PCR

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

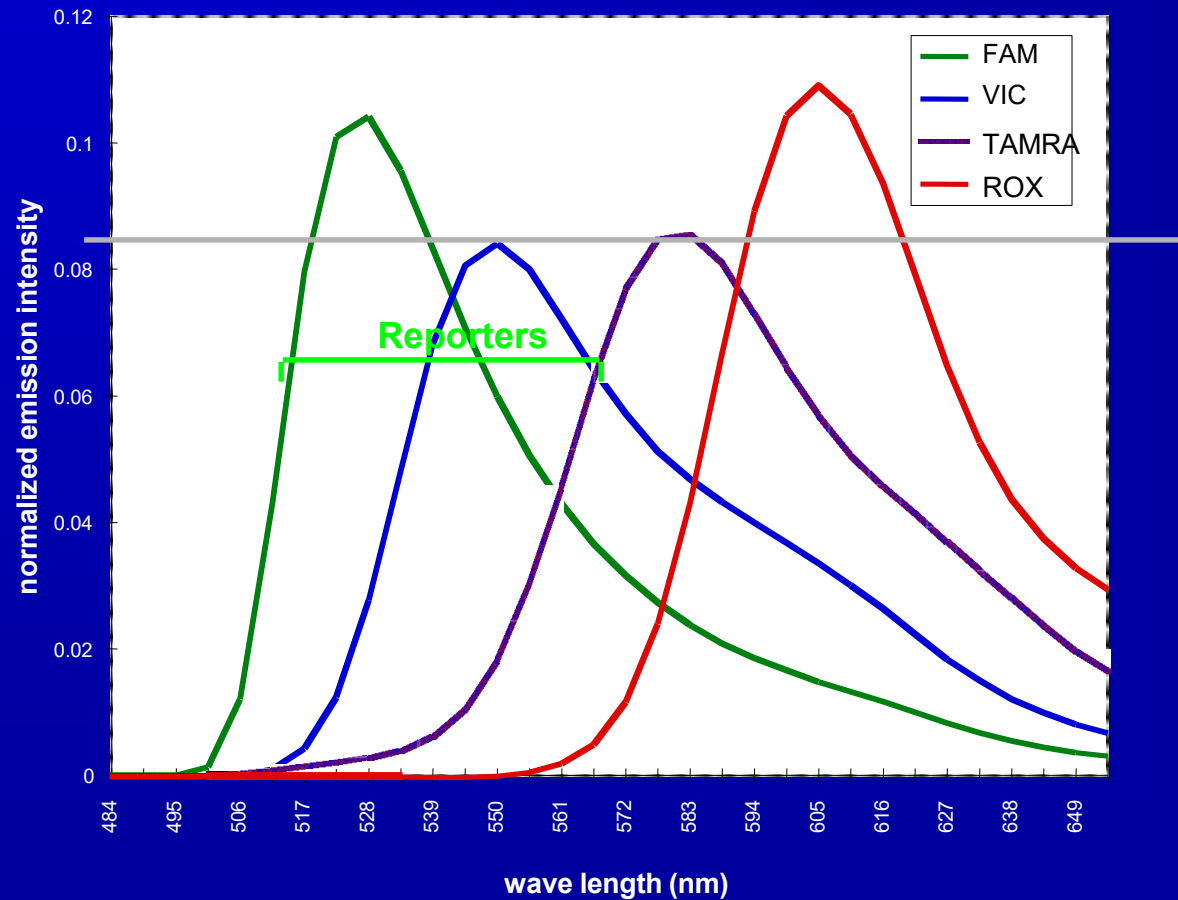
Dye	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)*
Fluorescein	490	513
Oregon Green	492	517
FAM	494	518
SYBR Green I	494	521
TET	521	538
JOE	520	548
VIC	538	552
Yakima Yellow™	526	552
HEX	535	553
Cy®3	552	570
TAMRA	560	582
Cy3.5	588	604
ROX	587	607
Texas Red	596	615
LightCycler-Red 640 (LC640)	625	640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

* Emission spectra may vary depending on the buffer conditions.

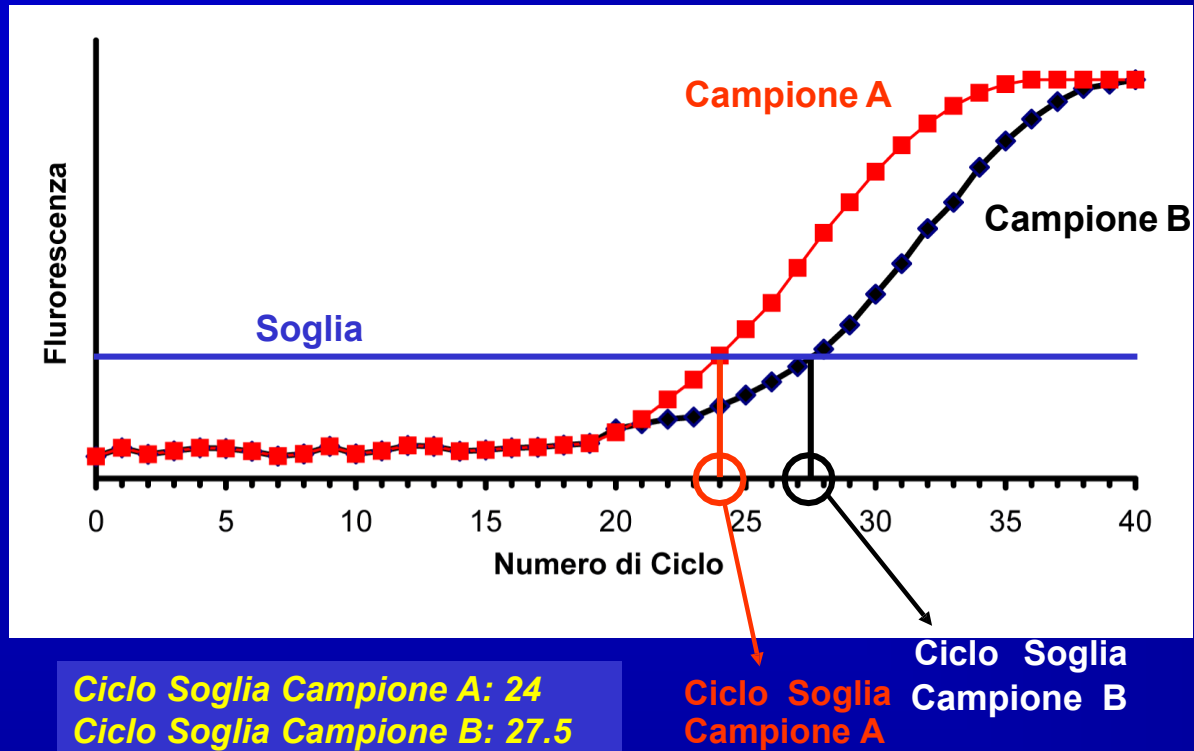
La possibilità di avere diversi coloranti fluorescenti legati alle sonde permette di effettuare Real-Time PCR multiplex, in modo da analizzare più geni in un campione.

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



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

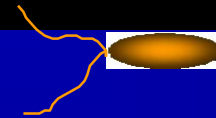
Terapia Farmacologica: effetto dei farmaci sull'mRNA

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

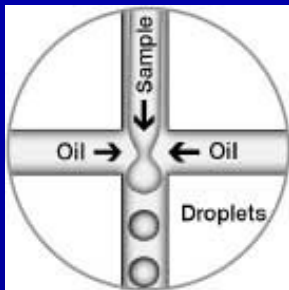
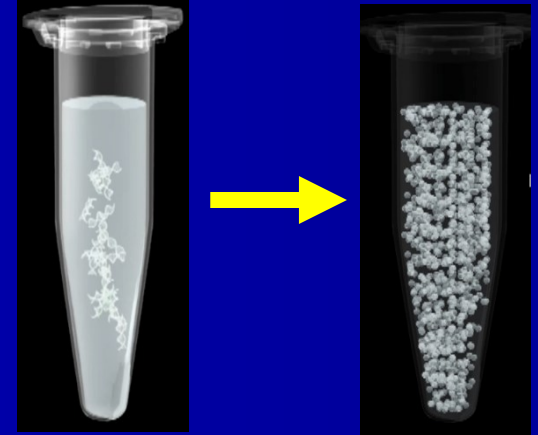
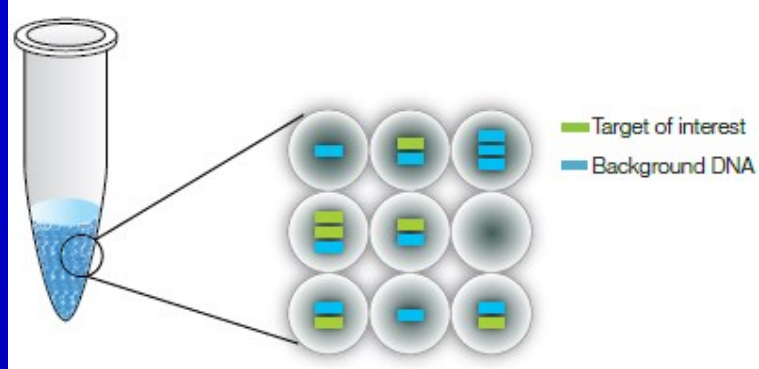
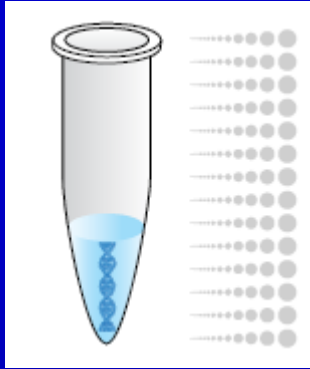
La Real-Time PCR permette la quantificazione di un campione di acido nucleico (DNA, RNA, cDNA).

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.

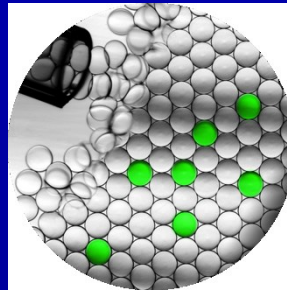
La quantificazione **assoluta** del trascritto di mRNA permette la determinazione precisa della quantità di mRNA per cellula, per RNA totale o per massa di tessuto.

Digital-PCR

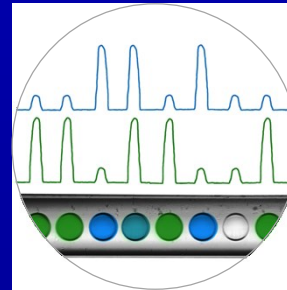
(terza generazione della PCR)



Make Droplets



PCR Droplets



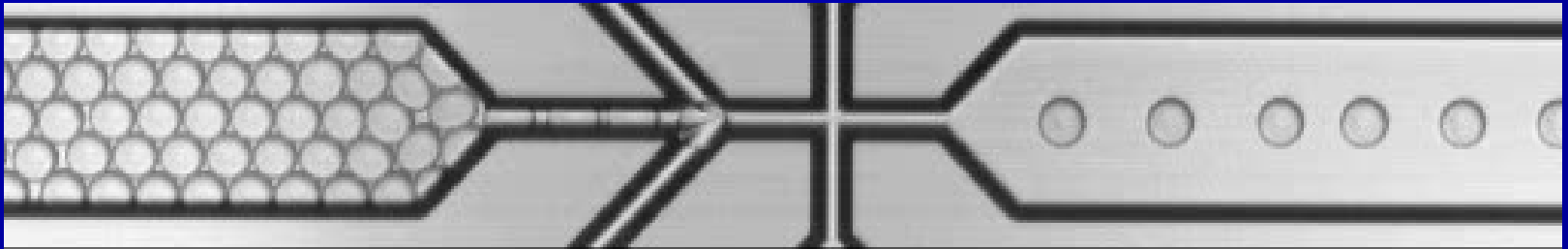
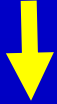
Read Droplets

“X” target
copies

Results

Digital-PCR

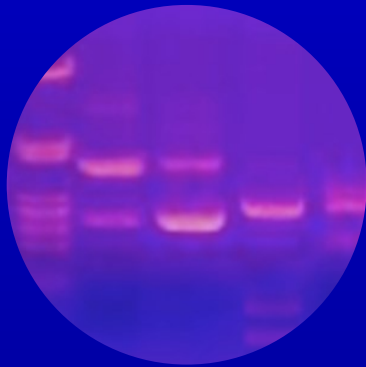
(terza generazione della PCR)



10/11/2010 001284 25680.0 ms 25.680000 s

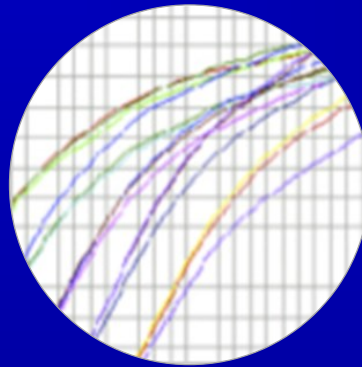
Droplet Digital PCR (ddPCR)

Prima
1983



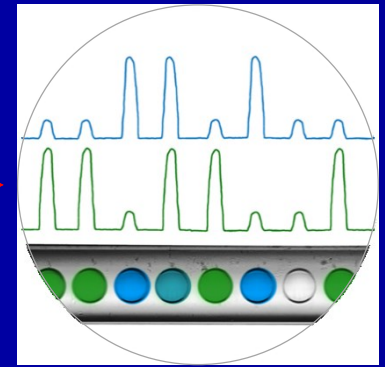
PCR
Qualitativa

Seconda
1996



Real-time PCR (RT-qPCR)
Quantificazione Relativa

Terza
2011



Droplet Digital PCR (dd PCR)
Quantificazione Assoluta

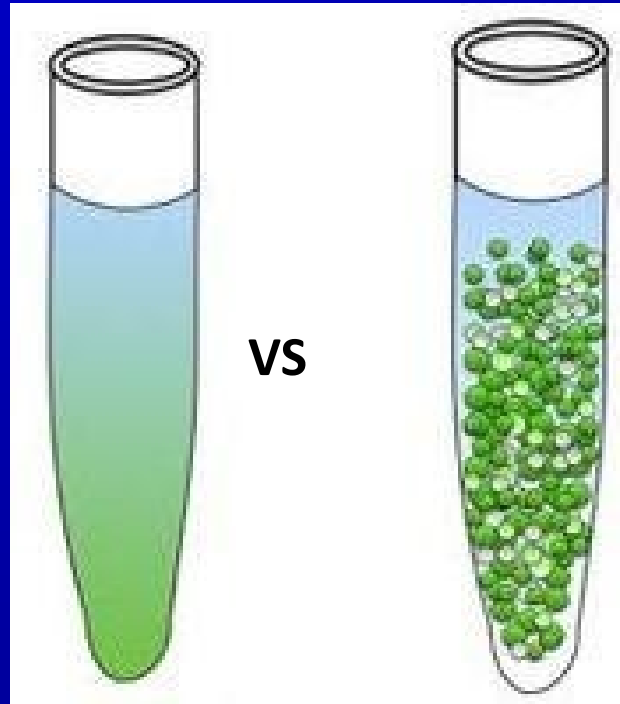
I Principi della Droplet Digital PCR

È una nuova tecnologia emergente che partiziona il campione in migliaia di piccole goccioline (droplet) indipendenti dividendo le molecole di acido nucleico in regioni distinte.

Metodi tradizionali

- ✓ Campione
- ✓ Primers
- ✓ Sonda Fluorescente
- ✓ DNA Polimerase
- ✓ dNTPs

In un unico
sistema
omogeneo



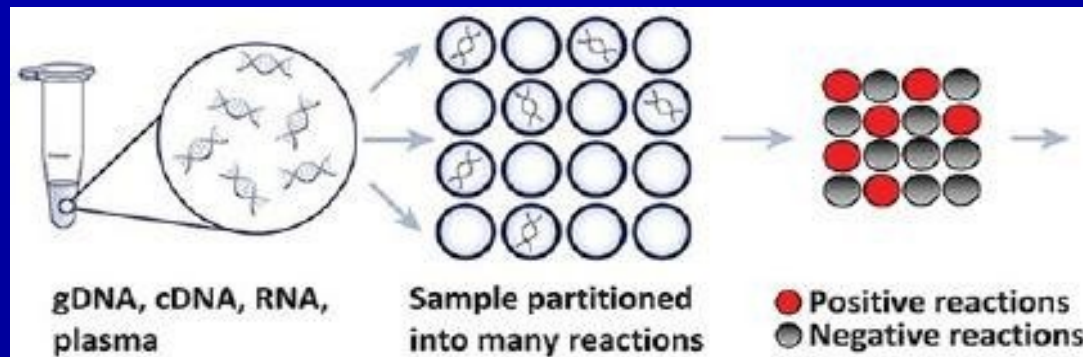
ddPCR

- ✓ Campione
- ✓ Primers
- ✓ Sonda Fluorescente
- ✓ DNA Polimerase
- ✓ dNTPs

Separati in circa
20.000
goccioline

Vantaggi!

- **Conta delle molecole**, con quantificazione assoluta del campione, espressa come n° di copie/uL
- Singola amplificazione per ogni molecola di DNA riducendo i problemi di competizione
- È **ultrasensibile e più accurata** e precisa rispetto alle precedenti tecniche, permettendo di identificare eventi rari
- Ha **molte applicazioni** tra cui l'individuazione e la quantificazione:
 - ✓ dei **patogeni** di basso livello
 - ✓ di sequenze genetiche rare
 - ✓ di **variazioni del numero di copie**
 - ✓ dell'espressione genica relativa in singole cellule



Sistema Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR

Generatore Automatico di Droplet

Emulsiona il campione dividendo la reazione in migliaia di goccioline



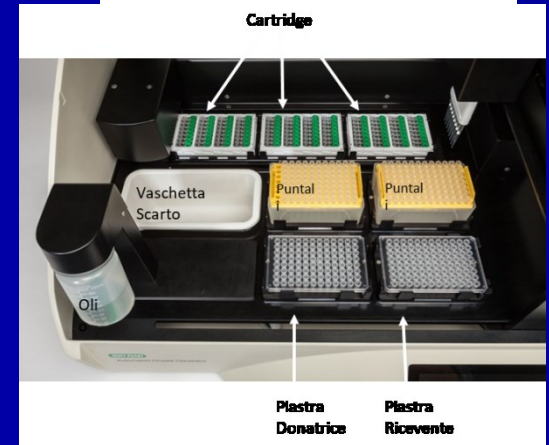
Cartridge

Termociclatore

Sealer



Formazione della goccia



Legge la fluorescenza delle singole droplet

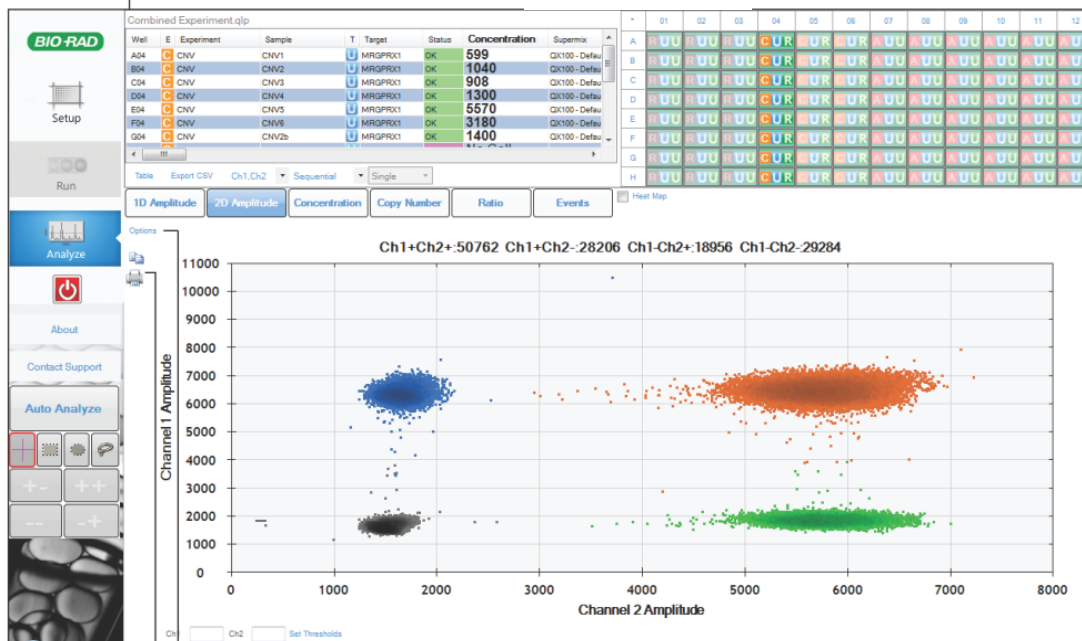


Sistema Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR

Analisi dei Dati

Tabella dei
Dati Grezzi

Selettore di
Pozzetti



Interfaccia
Analisi dei
Dati

Opzioni Asse delle Y

Stampa Grafico

PCR

Applications

- Gene expression (and microarray validation).
- DNA target quantification (nuclear, mitochondrial, residual DNA in protein preps (QC)).
- SNP detection, Allele discrimination, Genotyping, Haplotyping
- DNA Methylation, Apoptosis
- Viral load assays, pathogen & GMO detection.
- Clinical Diagnostics (Cancer, Therapy Response)
- Static reads (“96-well fluorimeter”).

PCR

Real-Time PCR Applications II

- **DNA damage (microsatellite instability) measurement**
- **radiation exposure assessment**
- ***in vivo* imaging of cellular processes**
- **mitochondrial DNA studies**
- **methylation detection**
- **detection of inactivation at X-chromosome**
- **linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: a new method for real-time quantitative analysis of target numbers in small samples, which is adaptable to high throughput applications in clinical diagnostics, biodefense, forensics, and DNA sequencing**

Esempio di applicazione della PCR nell'impianto

*Periodontology 2000, Vol. 41, 2006, 157–176
Printed in Singapore. All rights reserved*

Copyright © Blackwell Munksgaard 2006
PERIODONTOLOGY 2000

Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants

JANET MORADIAN-OLDAK, HAI BO WEN, GALEN B. SCHNEIDER &
CLARK M. STANFORD

Osteointegrazione: l'intima unione tra un osso e un impianto artificiale senza tessuto connettivo apparente. Si definisce intima unione quando lo spazio e i movimenti relativi fra osso e impianto non superano i 100 micron.

Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants

JANET MORADIAN-OLDAK, HAI BO WEN, GALEN B. SCHNEIDER &
CLARK M. STANFORD

Esempio di applicazione della PCR nell'impianto

Per la formazione ossea associata all'osteogenesi e, successivamente, **osteointegrazione** sono necessari:

1. Differenziazione degli osteoblasti
2. formazione di matrice extracellulare e
3. successiva mineralizzazione

Fattore di trascrizione **Cbfa1** noto anche come **RunX2** regola questo sviluppo e, se interrotto, inibisce lo sviluppo osseo

Cbfa1 si lega ai promotori dei principali geni osteoblasti, come osteocalcina, BSP, osteopontina e collagene di tipo I e regola la loro espressione

Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants

JANET MORADIAN-OLDAK, HAI BO WEN, GALEN B. SCHNEIDER &
CLARK M. STANFORD

Esempio di applicazione della PCR nell'impianto

Gli osteoblasti che crescono le superfici ruvide hanno un maggior grado di mineralizzazione rispetto agli osteoblasti cresciuti su superfici lisce

In questo lavoro hanno usato la Real-PCR per dimostrare che l'espressione genica del gene $Cbfa1$ è aumentata in osteoblasti cresciuti su impianti ruvidi

Esperimento di oggi

**CHARACTERIZATION OF MESOTHELIAL AND
MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA CELLS
BY DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR)**

SELECTED GENES:

1. MSLN (mesotelina):

- Membrane-bound glycoprotein overexpressed by the epithelioid component of MPM
- Soluble mesothelin (SM) approved for treatment monitoring of MPM by FDA
- Uncertain role, maybe facilitate cell adhesion and cell-cell recognition and signalling

2. GAPDH: gene housekeeping per normalizzare la quantità di

cDNA utilizzato

SELECTED GENES:

1. CALB2:

- Proteina intracellulare legante il calcio appartenente al complesso proteico Troponina C

2. **B2M**: gene housekeeping utilizzato per la normalizzazione dei risultati.

PLATE LAYOUT

	cDNA 4 ng/well					
	Assay GAPDH: 0,25 ul;			Assay B2M: 0,25 ul		
	GAPDH			B2M		
	1	2	3	4	5	6
A	NTC	NTC		NTC	NTC	
B	HMC 26.09	HMC 8.4 8.10.19		HMC 26.09	HMC 8.4 8.10.19	
C	HMC 8.3 8.10.19	HMC29.4 8.10.19		HMC 8.3 8.10.19	HMC29.4 8.10.19	
D	IST-MES 2 26.09	IST MES 2 8.10		IST-MES 2 26.09	IST MES 2 8.10	
E	MPP89 26.09	MPP89 8.10		MPP89 26.09	MPP89 8.10	
F	COD 404 26.09	COD 404 8.10		COD 404 26.09	COD 404 8.10	
G	COD 421 26.09	COD 421 8.10		COD 421 26.09	COD 421 8.10	
H	COD 570 26.09	COD 570 8.10		COD 570 26.09	COD 570 8.10	

ddPCR MIX:

GAPDH					B2M			
REAGENTI	1 RXN (μl)	per totale rxn			REAGENTI	1 RXN (μl)	per totale rxn	
TEMPLATE cDNA (0,25 ng/ul)	4				TEMPLATE cDNA (0,25 ng/ul)	4		
SuperMix	11	18	198		SuperMix	11	18	198
Assay GAPDH	0,25		4,5		Assay B2M	0,25		4,5
H2O	6,75		121,5		H2O	6,75		121,5
Total	22		324		Total	22		324
Mix/Well	18				Mix/Well	18		
16 wells + 2 eccesso					16 wells + 2 eccesso			