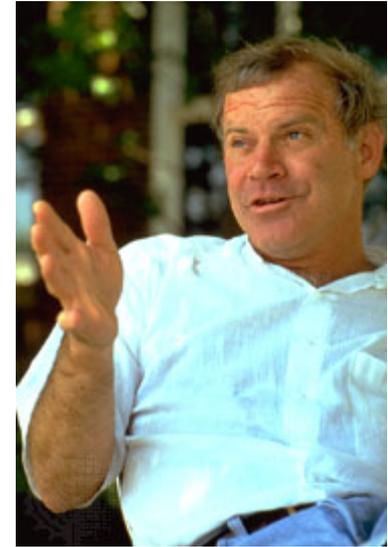


PCR: Polymerase Chain Reaction

Poche invenzioni hanno rivoluzionato in maniera così drastica e repentina il corso della biologia molecolare come la PCR.

La tecnica é l'approccio per il quale, permettendo l'amplificazione in vitro di frammenti di **DNA**, da modo di analizzare l'informazione genetica contenuta nel patrimonio genetico di un individuo, con ricadute fondamentali in campi diversissimi, dai laboratori di ricerca pura, ai centri di diagnostica degli ospedali, fino alle aule dei tribunali.



KARY BANKS MULLIS

BIBLIOGRAPHY.

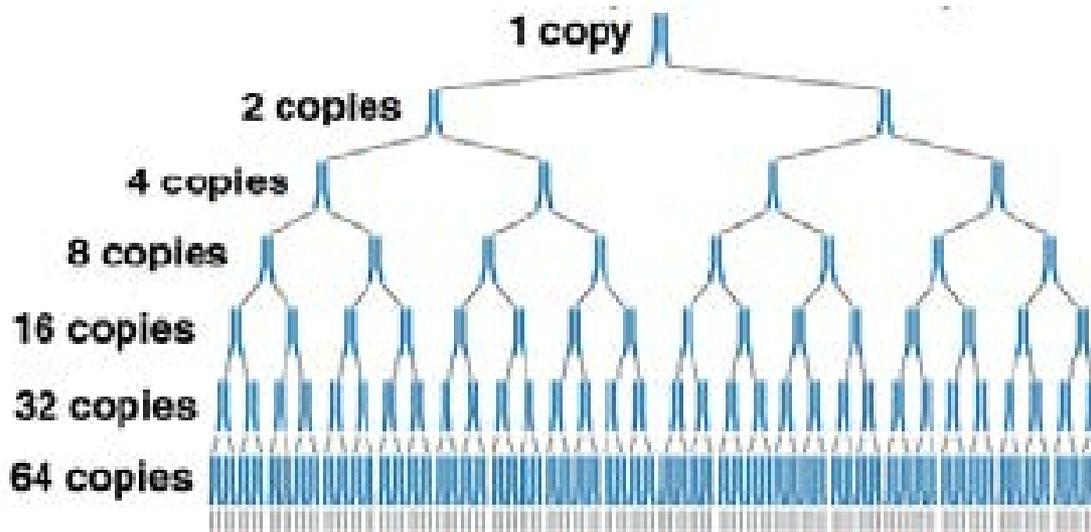
Nel suo libro del [1998](#) (*"Ballando nudi nel campo della mente"*, Mullis parla della sua visione del mondo e narra di episodi curiosi ed esperienze alquanto insolite da lui vissute. Parla dell'astrologia, della sua partecipazione al processo di O. J. Simpson, del suo uso di droghe. Sostiene che *"la scienza dei media è una fesseria"* per finire addirittura con l'ammissione di... essere stato rapito dagli alieni; gli accadde una notte del 1985, in un bosco nei pressi di Mendocino County in California, poco dopo aver incrociato un procione parlante.

Mullis racconta come ai tempi dei suoi studi a Berkeley (1973) mandò all'autorevole rivista inglese *Nature* un articolo inventato di sana pianta nel quale sosteneva che metà della materia dell'universo andrebbe all'indietro nel tempo. L'articolo beffa fu pubblicato. Un ventennio dopo propose alla stessa rivista un lavoro in cui documentava la tecnica del [PCR](#) che gli avrebbe valso il Nobel, e non fu pubblicato; *"Questa esperienza mi insegnò un paio di cose e mi fece crescere un bel po"*.

.....potevo letteralmente veder lavorare i singoli polimeri....

Polymerase Chain Reaction

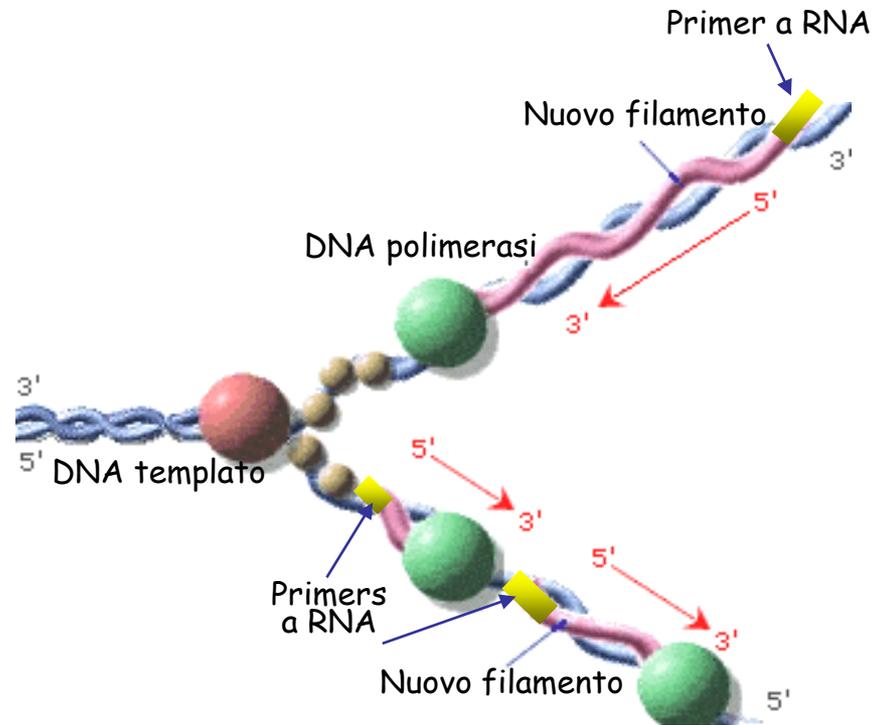
- Powerful technique for amplifying or copying a specific piece of DNA
- Carried out in vitro (in the lab)
- Extremely simple technique



PCR - REAZIONE a CATENA della POLIMERASI

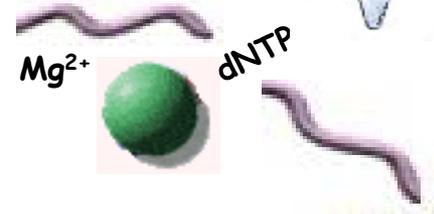
Il principio a cui si ispira la PCR è la replicazione del DNA:

REPLICAZIONE



COMPONENTI di una REAZIONE di PCR

Stampo \Rightarrow DNA a doppio filamento



Primers \Rightarrow Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

Deossiribonucleotidi trifosfati \Rightarrow Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Tampone contenente cloruro di magnesio \Rightarrow Lo ione Mg^{2+} è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima \Rightarrow Tradizionalmente viene usata la *Taq* polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*

Common PCR additives

BSA (usually at 0.1 to 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ final concentration)

Stabilize *Taq* polymerase & overcome PCR inhibitors

DMSO (usually at 2-5% v/v, inhibitory at $\leq 10\%$ v/v)

Denaturant - good at keeping GC rich template/primer strands from forming secondary structures.

Glycerol (usually at 5-10% v/v)

Increases apparent concentration of primer/template mix, and often increases PCR efficiency at high temperatures.

Stringency enhancers (Formamide, Betaine, TMAC)

Concentrations used vary by type

Enhances yield and reduces non-specific priming

Non-ionic detergents (Triton X, Tween 20 or Nonidet P-40) (0.1–1%)

NOT SDS (0.01% SDS cuts *Taq* activity to $\sim 10\%$ of normal)

Stabilize *Taq* polymerase & suppress formation of 2^o structure

Le FASI della PCR

① DENATURAZIONE:

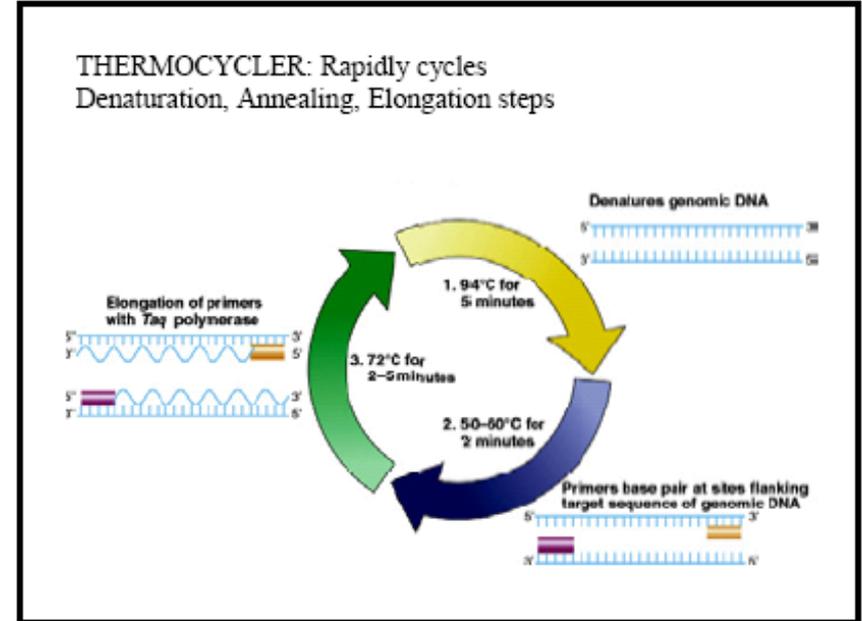
Il DNA viene denaturato mediante riscaldamento in provetta a ~ 92-95°C

② ANNEALING:

La miscela viene raffreddata fino a raggiungere la temperatura che garantisce la specifica ibridazione dei primers alle regioni dello stampo ad essi complementari

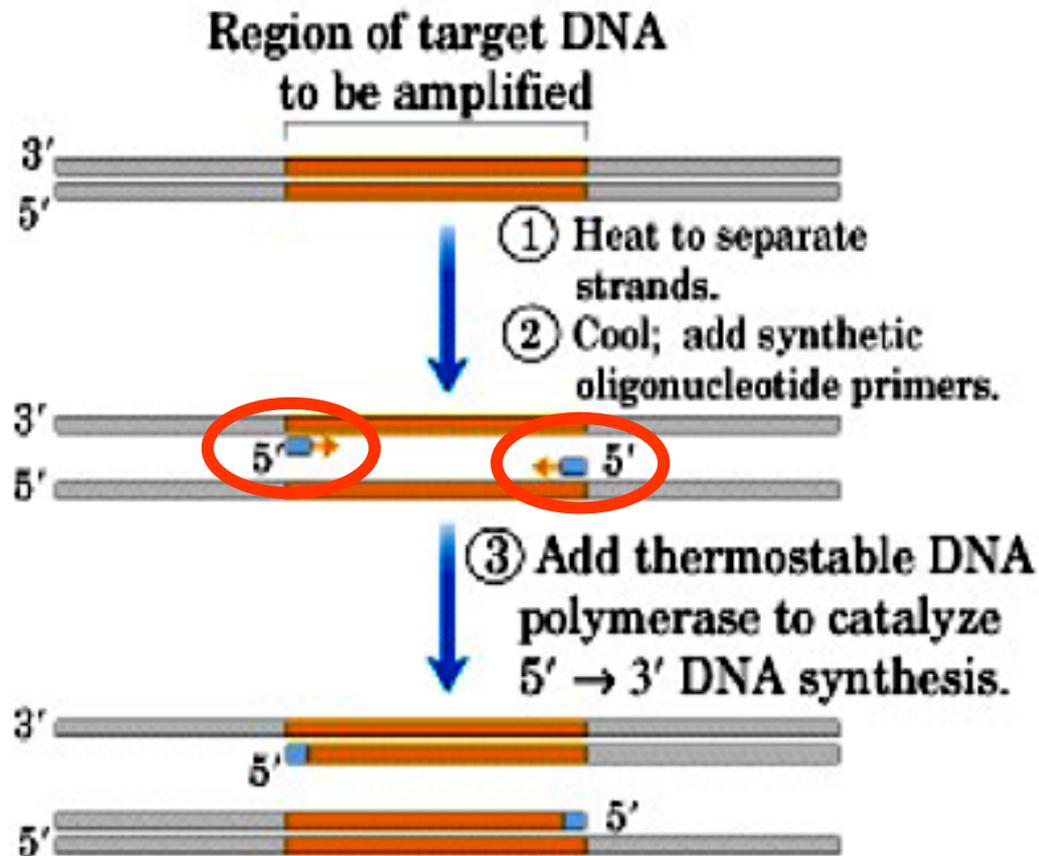
③ ALLUNGAMENTO:

La temperatura della miscela viene portata a 68-72°C consentendo alla DNA polimerasi termostabile di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall'innescio oligonucleotidico



Polymerase Chain Reaction: principio

CICLI TERMICI:



DENATURAZIONE
(94-96°C)

ANNEALING
(50-65°C)

EXTENSION
(72°C)

La reazione a catena della polimerasi (PCR)

(A)

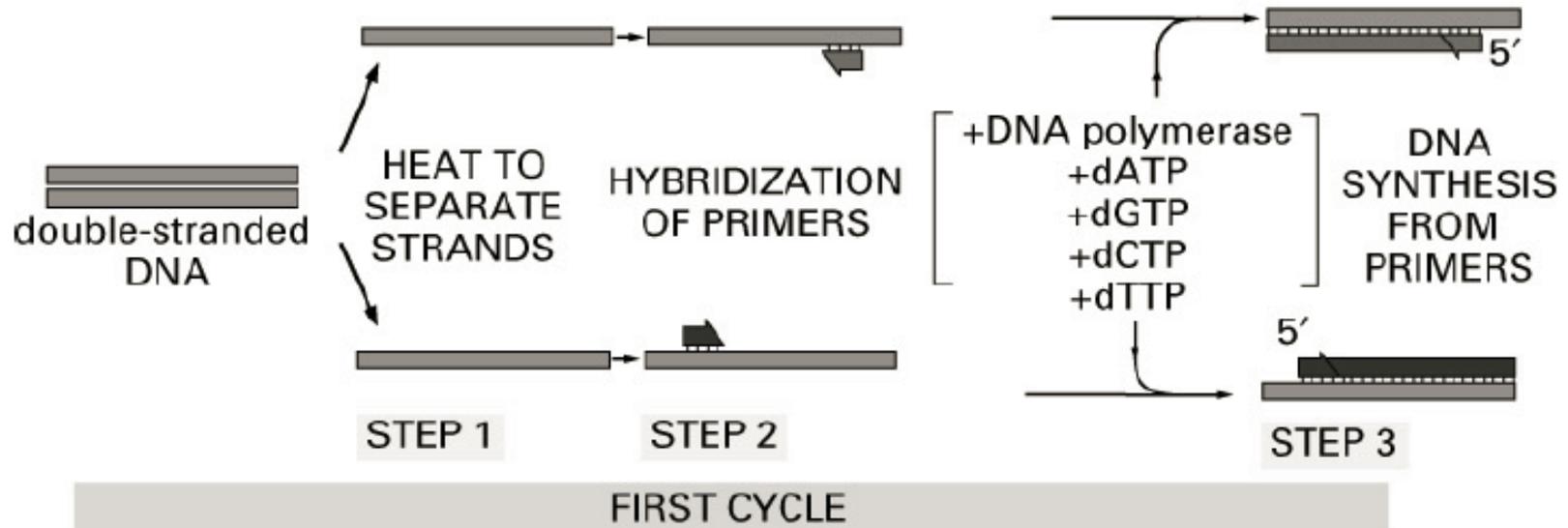


Figure 8–39 part 1 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- **Step 1:** Denaturazione (95°C per 30 sec.);
- **Step 2:** Annealing dei primer (55-70 °C per 1 min.);
- **Step 3:** Allungamento (72°C per tempo variabile).

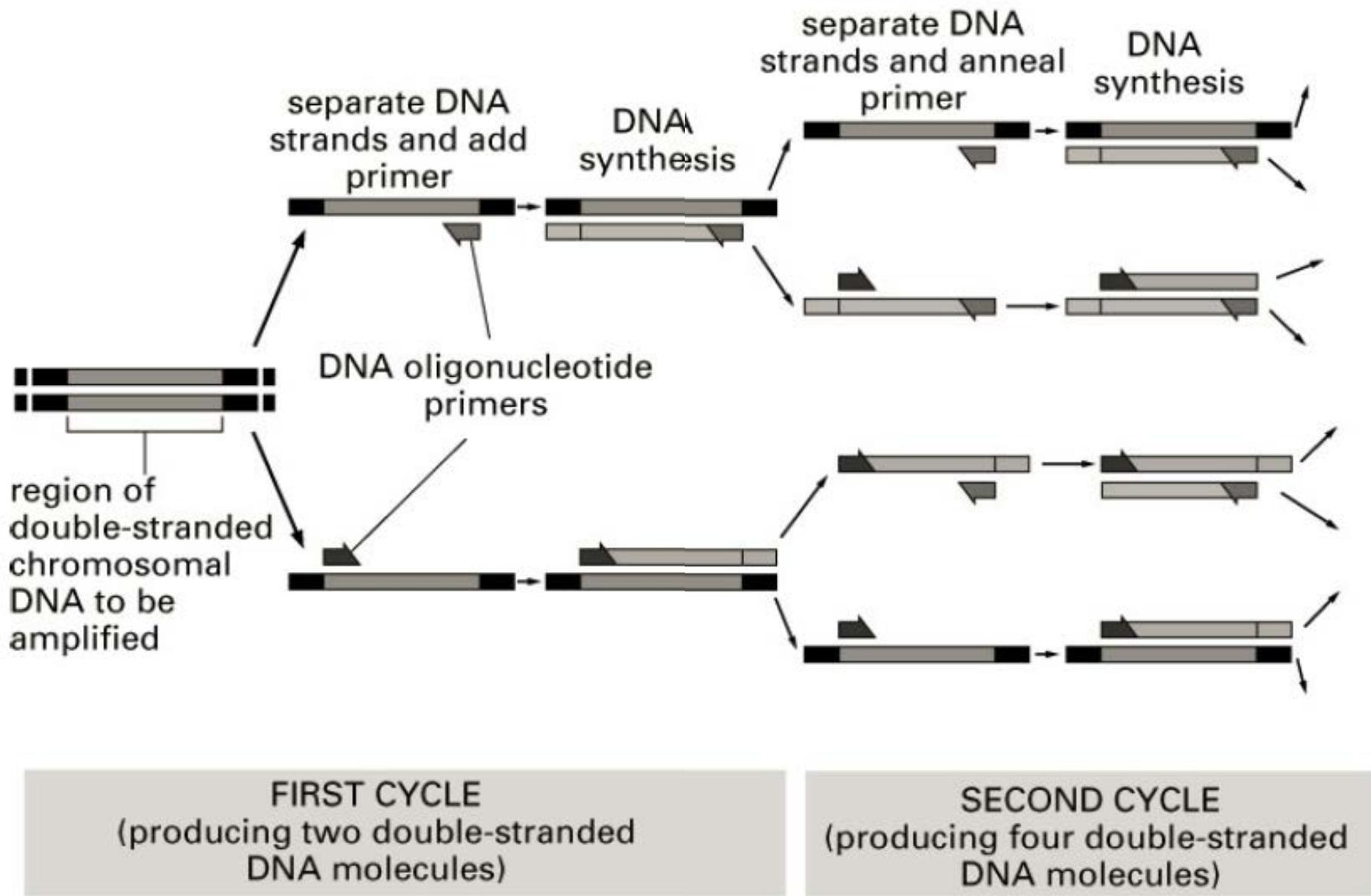


Figure 8-39 part 2 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

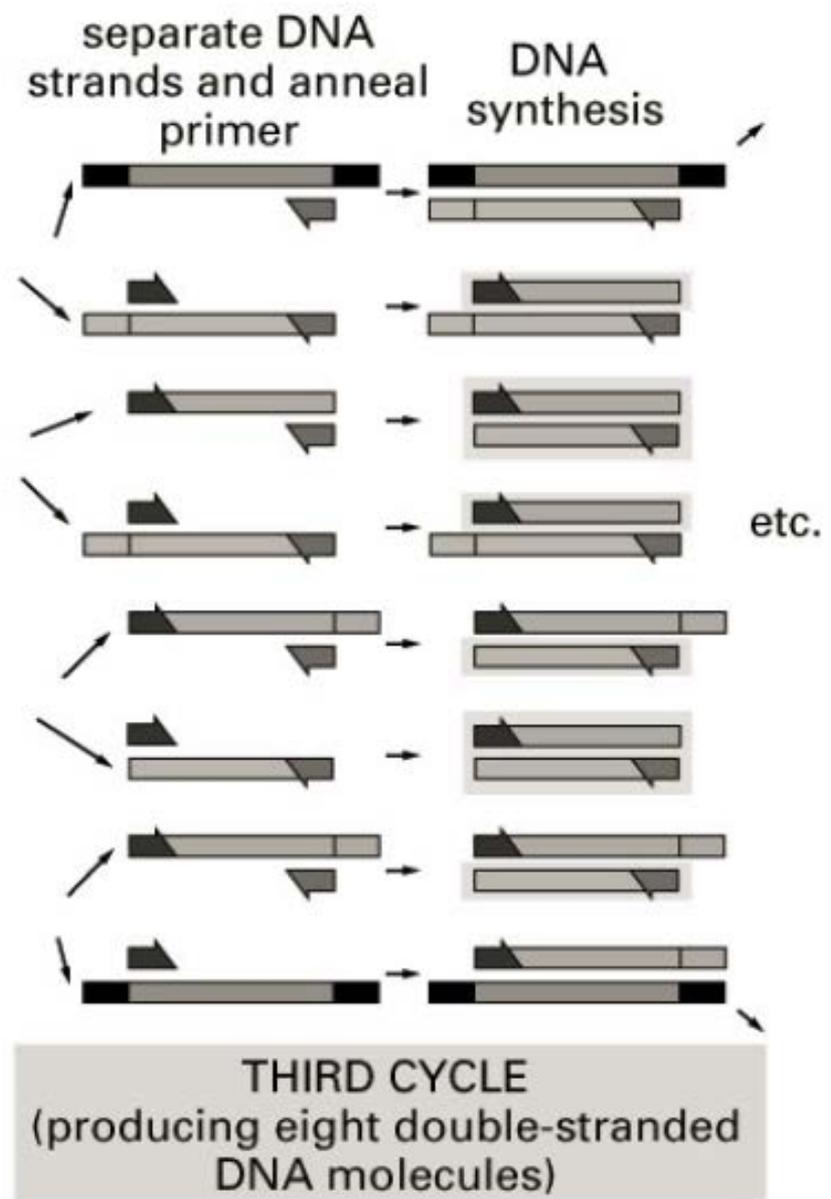
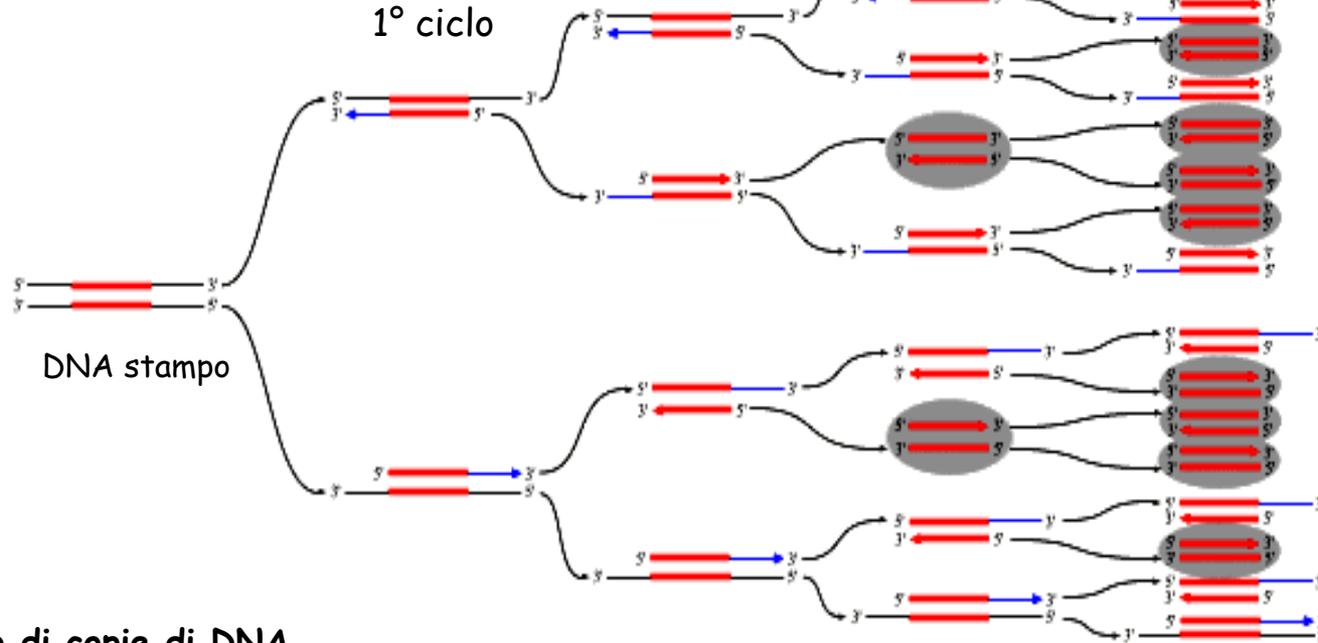


Figure 8–39 part 3 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

I primi 4 cicli della PCR in dettaglio

Amplificazione esponenziale

Frammento desiderato



-----> 35° ciclo

Numero di copie di DNA contenenti il frammento desiderato

$$2^1 = 2$$

$$2^2 = 4$$

$$2^3 = 8$$

$$2^4 = 16$$

$$2^{35}$$

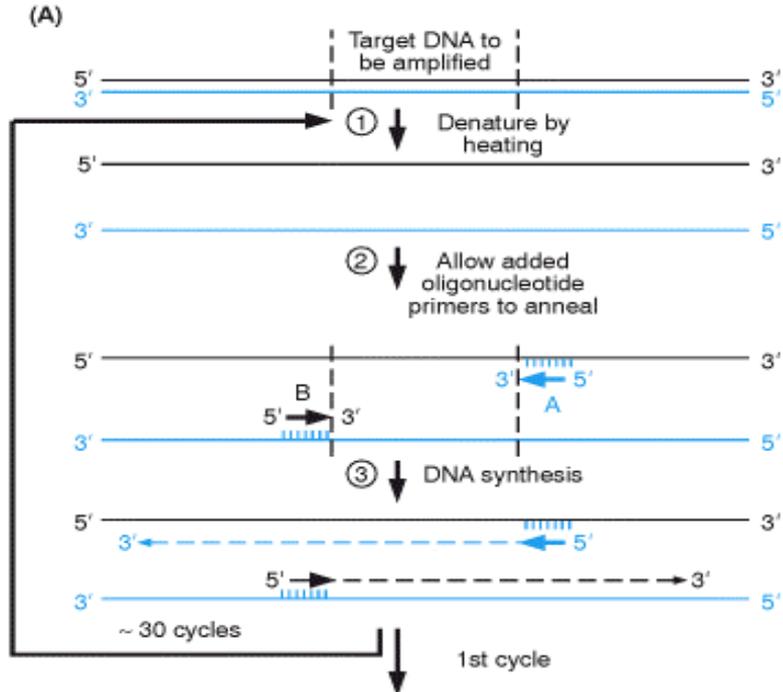
Numero di copie di DNA della corretta lunghezza contenenti il frammento desiderato

0

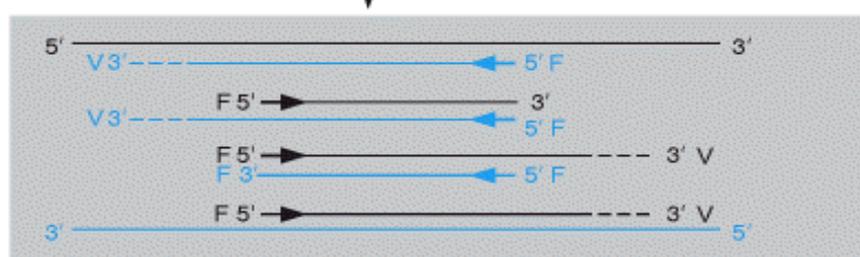
0

2

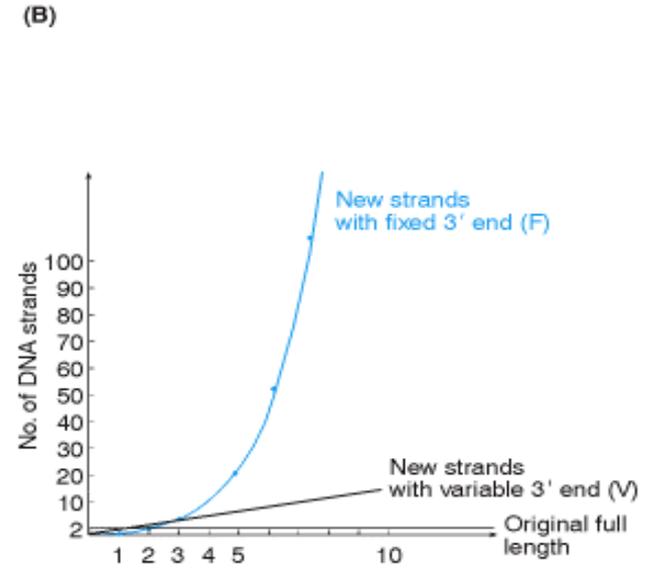
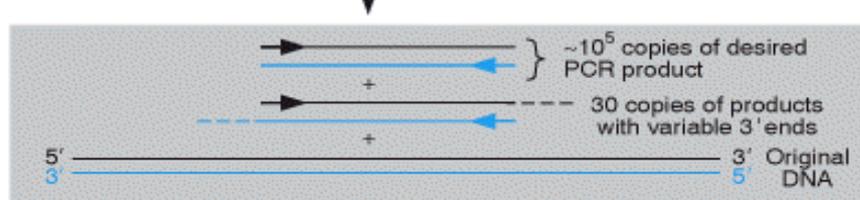
8



2nd cycle



25th cycle

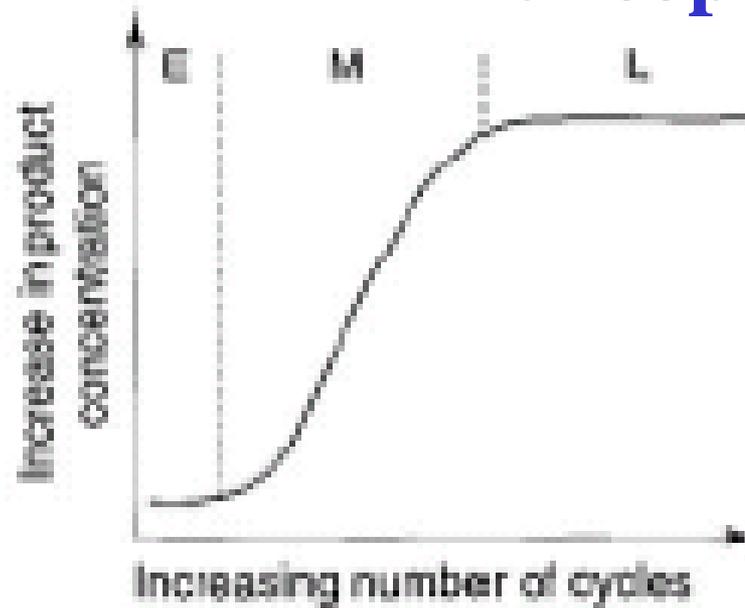


Key:

F, F Fixed end

V, V End of variable length

10^{12} copies



$$Y = (1 + X)^N$$

X = mean efficiency of a cycle

N = number of cycles

Y = fold amplification

Per Cycle Efficiency (%)	Extent of amplification (20 cycles)	Relative yield
-------------------------------------	--	-----------------------

100

1 048 576

1.00

95

631 964

0.60

90

375 900

0.36

85

220 513

0.21

80

127 452

0.12

dsDNA: μg to pmol

Name	yotta-	zetta-	exa-	peta-	tera-	giga-	mega-	kilo-	hecto-	deca-
Symbol	Y	Z	E	P	T	G	M	k	h	da
Factor	10^{24}	10^{21}	10^{18}	10^{15}	10^{12}	10^9	10^6	10^3	10^2	10^1
Name	deci-	centi-	milli-	micro-	nano-	pico-	femto-	atto-	zepto-	yocto-
Symbol	d	c	m	μ	n	p	f	a	z	y
Factor	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-9}	10^{-12}	10^{-15}	10^{-18}	10^{-21}	10^{-24}

dsDNA(1000bp): $10\text{pg}/\mu\text{l} \rightarrow \text{pM}$?

$$M = \text{moles}/L \quad \text{Moles} = \text{gr}/\text{mw} \quad \rightarrow \quad M = \text{gr}/\text{mw} * L$$

$$\text{dsDNAmw} = L * \text{bp mw}$$

L = DNA length (nucleotides)

$$\text{bp mw} = 650\text{dalton}$$

$$\text{dsDNA: } 10 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 10 \mu\text{g}/\text{L}$$

$$M = 10 \mu\text{g} / 1000 * 650 * 1 = 1,54 \text{E}-05 \mu\text{M} = 1,54 \text{E}-02 \text{nM} = 15,4 \text{pM}$$

Another way of expressing an amount of DNA is in terms of molarity. One mole of anything is given by Avagadro's number 6.023×10^{23} . Thus, 1 mole of DNA is 6.023×10^{23} molecules of DNA and 1 mole of bowling balls is 6.023×10^{23} bowling balls. It is often necessary to express amounts of DNA in terms of both weight and number of molecules. For example, one microgram (μg , 10^{-6} grams) of DNA pieces 1000bp long is 1.52 picomoles (pmol, 10^{-12} moles) and 1pmole of DNA pieces 1000bp long will weigh $0.66 \mu\text{g}$.

$$\frac{15,4 \text{M} * 6,023 \text{E}23}{10 \text{E}12} = 93 \text{E}11$$

$$= 9.300.000.000.000 \text{ molecules}$$

*What are the factors determining the
“Plateau Effect” ????*

What is limiting?

Template?

Primers?

dNTPs?

Taq Polymerase?

Polymerase Chain Reaction: plateau

Resa effettiva: **effetto plateau**

Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:

Quantità dei primers

Attività della Taq polimerasi

Reannealing dei filamenti

Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

Length

Usually about 20 nt for target sequences in complex genomic DNA; can be much less if target DNA is less complex

Una sequenza di 16 bp sarà statisticamente presente solo una volta ogni 4^{16} bp (~ 4 miliardi di basi) corrispondenti circa alla grandezza del genoma umano.

Più lungo è il primer e più è stabile, ma > probabilità che formi dimeri

Base composition

Substantial tandem repeats of one or more nucleotides to be avoided.

Overall %GC plus length to be chosen so that the T_m of each oligonucleotide (*Table 5.2*) should be equal or nearly identical

$$T_m \text{ primer 1} \cong T_m \text{ primer 2}$$

La T_m dipende dalla **lunghezza** e dalla **sequenza** del primer

Se la T_a dei due primers è molto diversa si possono verificare amplificazioni asimmetriche o a singolo filamento.

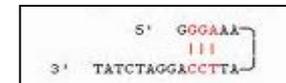
Secondary structure

Avoid sequences prone to secondary structure which could form hairpins etc. (see *Figure 1.7A*)

$$T_m (\text{°C}) = 4(\text{G} + \text{C}) + 2(\text{A} + \text{T})$$

3' end

Base complementarity of the two bases at the extreme 3' end of the two primers to be avoided. Otherwise primer dimers can result, reducing amplification efficiency



```
4 bp, delta G = -6.6 kc/m (bad!) (worst= -36.6)
5' GGGAAAATTCAGGATCTAT 3'
   |||  |||
3' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 5'

4 bp, delta G = -5.4 kc/m (bad!) (worst= -36.6)
5' GGGAAAATTCAGGATCTAT 3'
   |||
3' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 5'
```

PCR primer design

Mg⁺⁺

Non deve essere limitante: tutto ciò che metabolizza polimeri di nucleotidi necessita di Mg⁺⁺.

Se è largamente eccedente determina inaccuratezza, aumentando la frequenza degli appaiamenti degli oligo con sequenza non omologhe: le 2 cariche positive possono interagire con i fosfati e dare stabilità all'appaiamento. Stabilizzando gli omologhi, stabilizzano anche i non omologhi, e questo va evitato.

La [Mg⁺⁺] ottimale si determina tenendo conto che può essere legato sui fosfati di dsDNA, Oligo e dNTP; sommando queste concentrazioni (conto stechiometrico/spannometrico) più la [compatibile] con l'attività enzimatica. Si va a spanne: si guarda l'ordine di grandezza molare.

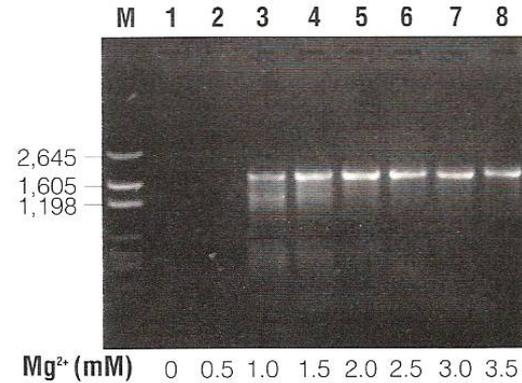
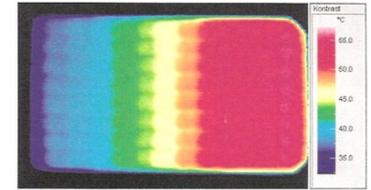
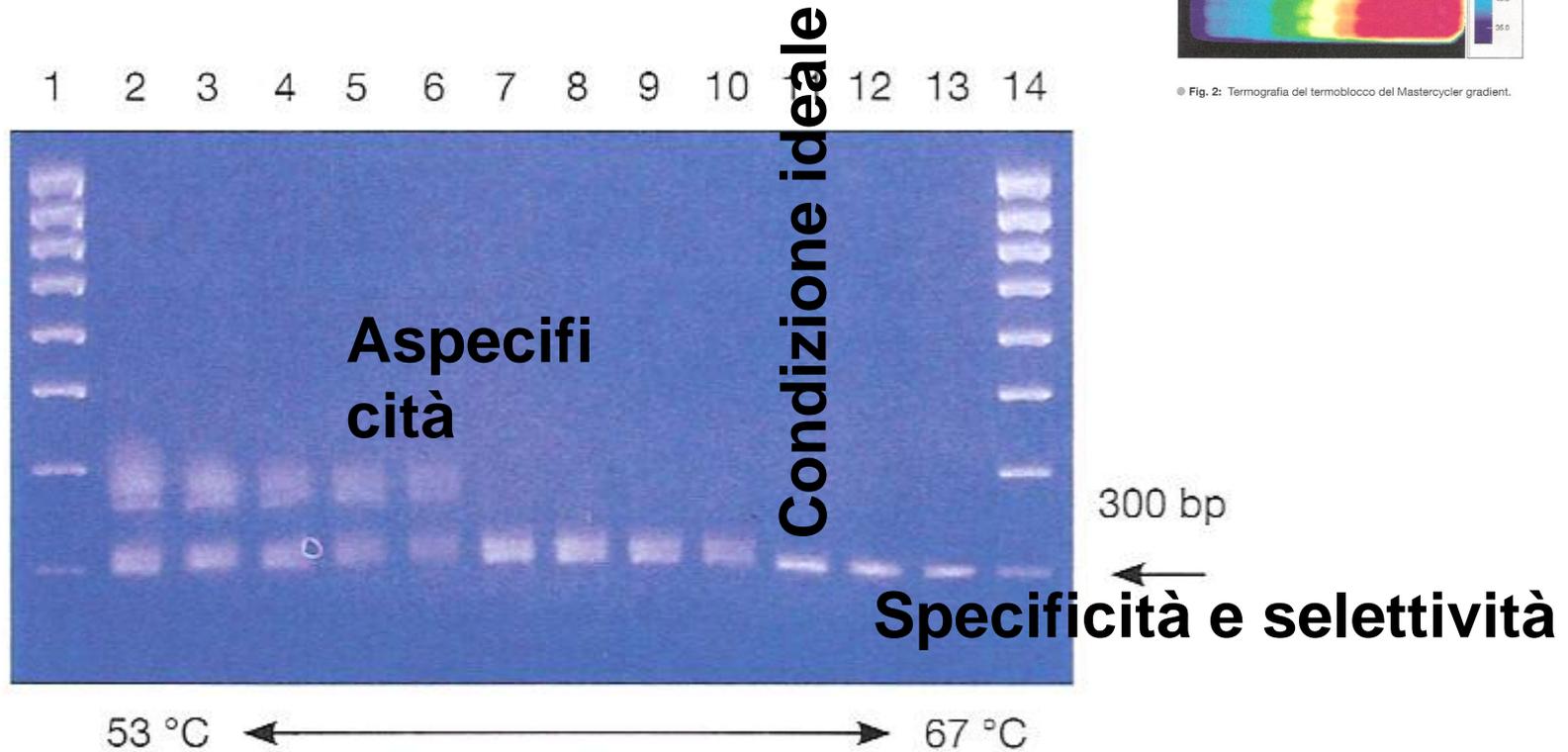


Figure 5. Effects of magnesium concentration on PCR amplification. PCR reactions were performed using various concentrations of Mg²⁺ to demonstrate this effect on the amplification of a 1.8kb target luciferase gene. The reaction products were analyzed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane M, Promega's pGEM[®] DNA Markers; Lane 1, 0mM Mg²⁺; Lane 2, 0.5mM Mg²⁺; Lane 3, 1mM Mg²⁺; Lane 4, 1.5mM Mg²⁺; Lane 5, 2mM Mg²⁺; Lane 6, 2.5mM Mg²⁺; Lane 7, 3mM Mg²⁺ and Lane 8, 3.5mM Mg²⁺.

Macchine pcr che generano un gradiente termico



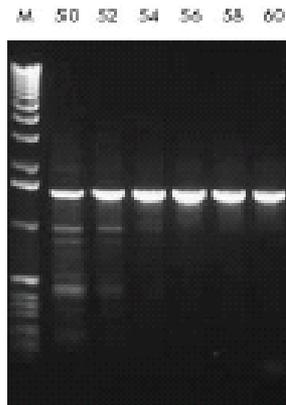
● Fig. 2: Termografia del termoblocco del Mastercycler gradient.



● Fig. 1: Determinazione sperimentale della temperatura ideale di annealing.

Optimising the Annealing Temperature

- Primers have a calculated annealing temperature (e.g. 54°C).
- Temperature must be confirmed practically.
- Temperature steps of 2°C above and below.
- Use gradient cycler.



Optimising the Mg²⁺ Concentration

- The fidelity of the PCR depends on [Mg²⁺].
- Vary [Mg²⁺] in steps of 0.5 mM.
- Sometimes a compromise between yield and specificity.

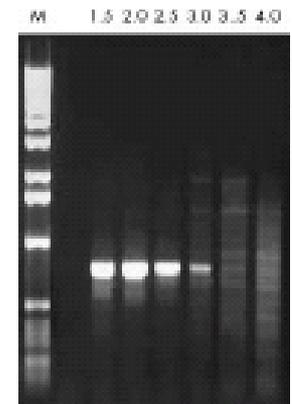


TABLE A4-5 Properties of Thermostable DNA Polymerases

ENZYME	MANUFACTURER ^a	ORGANISM	OPTIMUM TEMPERATURE (°C)	EXONUCLEASE ACTIVITY	ERROR RATE $\times 10^{-6}$	STABILITY (MINUTES AT SPECIFIED TEMPERATURE)	K_m dNTP (μ M)	K_m DNA (NM)
<i>Taq</i>	BM, LT, Pro, Strat, P-E, T	<i>T. aquaticus</i>	75–80	5'–3'	20–100	9 min at 97.5°C	10–16	2
<i>Taq</i> Stoffel fragment	P-E	<i>T. aquaticus</i>	75–80	none	50	21 min at 97.5°C	–	2
<i>rTth</i>	BM, ET, P-E	<i>T. thermophilus</i>	75–80	5'–3'	~20	20 min at 95°C	115	–
<i>Tfl</i>	Pro	<i>T. flavus</i>	70	none	100	120 min at 70°C	63	–
<i>Hot Tub</i>	Amr	<i>T. ubiquitus</i>	–	none	–	–	–	–
<i>Tbr</i>	Amr, Finnz	<i>T. brockianus</i>	75–80	5'–3'	–	150 min at 96°C	–	–
<i>ULTma</i>	P-E, Roche	<i>Thermotoga maritima</i>	75–80	3'–5'	–	50 min at 95°C	–	–
<i>rBst</i>	ET	<i>Bacillus sterothermophilus</i>	60–65	5'–3' (3'–5') ^b	–	–	–	–
Isotherm <i>Bst</i> large fragment	ET, Bio-Rad	<i>Bacillus sterothermophilus</i>	60–65	none	–	–	7–85	–
<i>Pwo</i>	BM	<i>Pyrococcus woesei</i>	60–65	3'–5'	3.2	>2 hr at 100°C	–	–
<i>Tli</i>	Pro	<i>Thermococcus litoralis</i>	70–80	3'–5'	20–45	100 min at 100°C	66	0.1
<i>DeepVent</i>	NEB	<i>Pyrococcus</i> (strain GB-D)	70–80	3'–5'	20–45	480 min at 100°C	50	0.01
<i>Pfu</i>	Strat	<i>Pyrococcus furiosus</i>	72–78	3'–5'	1.6	240 min at 95°C	–	–

Riassumendo....in media stat virtus...

	resa	specificità
Mg ⁺⁺	+	-
Taq	+	-
Primers	+	-
Num. cicli	+	-
Temp annealing	-	+

Resa e specificità procedono in direzioni opposte. Fattori che favoriscono l'una sfavoriscono l'altra.

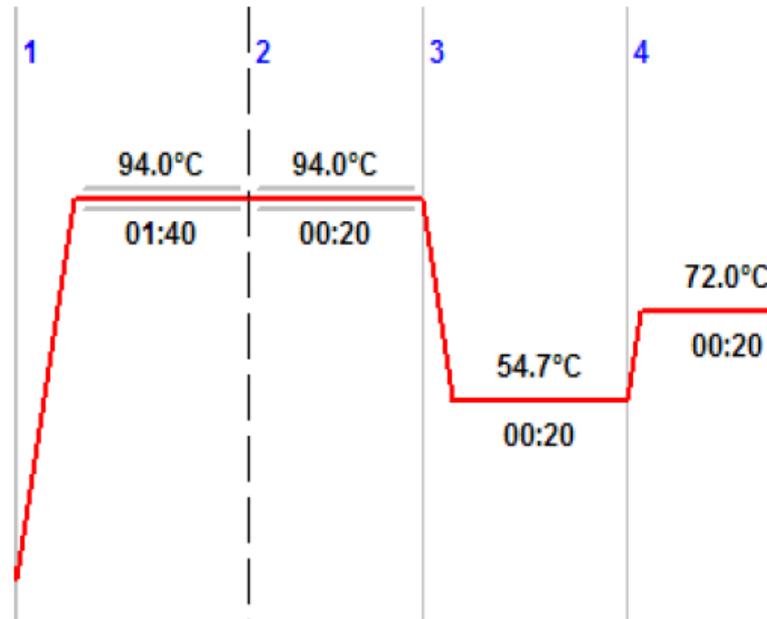
Bisogna trovare un equilibrio tra le 2 opposte tendenze

Troubleshooting

- Nessuno o scarso amplificato:
 - Concentrazione reagenti e setup reazione corretti?
 - Disegno Primers corretto?
 - Presenza inibitori
 - T annealing troppo alta
 - Pochi cicli
 - Thermal cycler funziona?
- Bande aspecifiche:
 - Eccesso reagenti o cicli
 - T annealing troppo bassa
 - Disegno Primers corretto?
 - Sintesi parziale dei primers
- PCR amplifica solo alcuni campioni:
 - Pulizia e corretto dosaggio DNA templato
 - Presenza polimorfismi che ostacolano annealing di un primer
- Prodotto dimensioni errate:
 - Appaiamento primers in regioni non corrette (pseudogeni, seq. Ripetute)

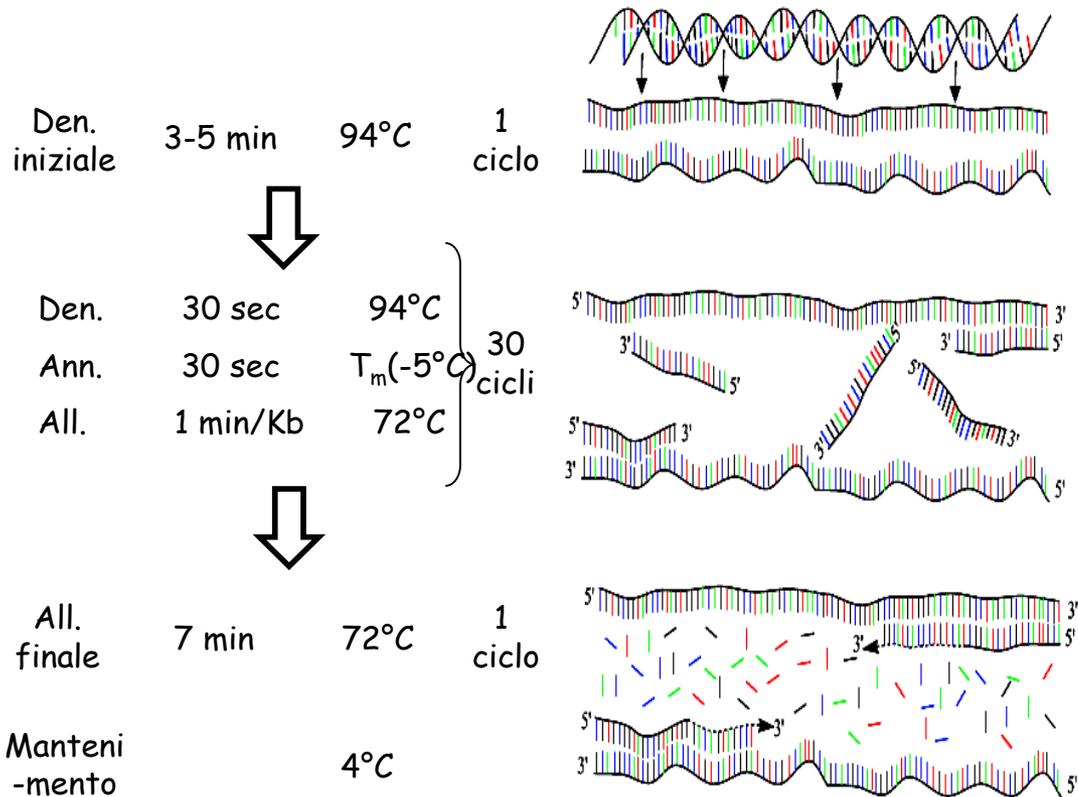


PCR Program

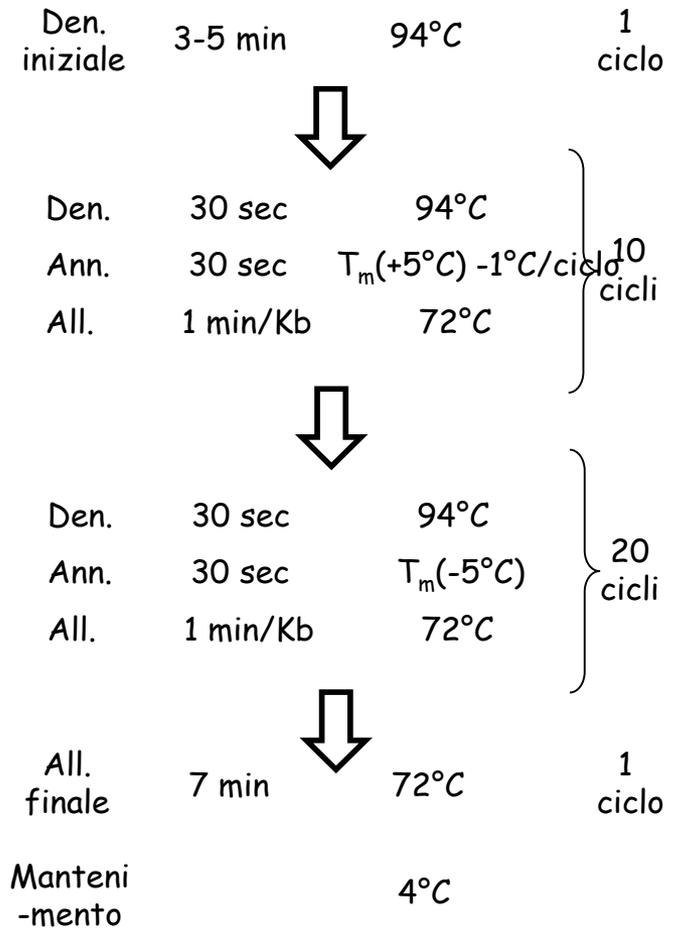


STRATEGIE per AUMENTARE la SPECIFICITA'

PCR CLASSICA



TOUCHDOWN PCR



Touch-down: (campioni ricchi di DNA simili al target di amplificazione)

Si parte da cicli con annealing a temperatura superiore a quella prevista per i primer, scendendo gradatamente alla temperatura corretta e poi continuando per gli ultimi cicli in condizioni normali.

SCOPO: arricchire la miscela del template voluto a scapito degli omologhi.

Touch-up: (campioni molto poveri in template) Si parte da temperature di annealing basse, per rendere i primers specifici e arricchire così la mix, aumentando man mano la temperatura di annealing per recuperare specificità.



...STRATEGIE per AUMENTARE la SPECIFICITA'

HOT START

Perché realizzare una PCR "hot start"?

Durante l'allestimento della reazione di PCR o durante il riscaldamento iniziale del campione si possono verificare situazioni di appaiamento non specifico fra primers e stampo.

Fra 40 e 50°C la *Taq* polimerasi ha un'efficiente attività polimerasica e può estendere i primers non correttamente appaiati.

La PCR "hot start" previene la formazione di questi prodotti non specifici in quanto un componente chiave della miscela di reazione (enzima o $MgCl_2$) viene aggiunto dopo lo step di denaturazione iniziale.

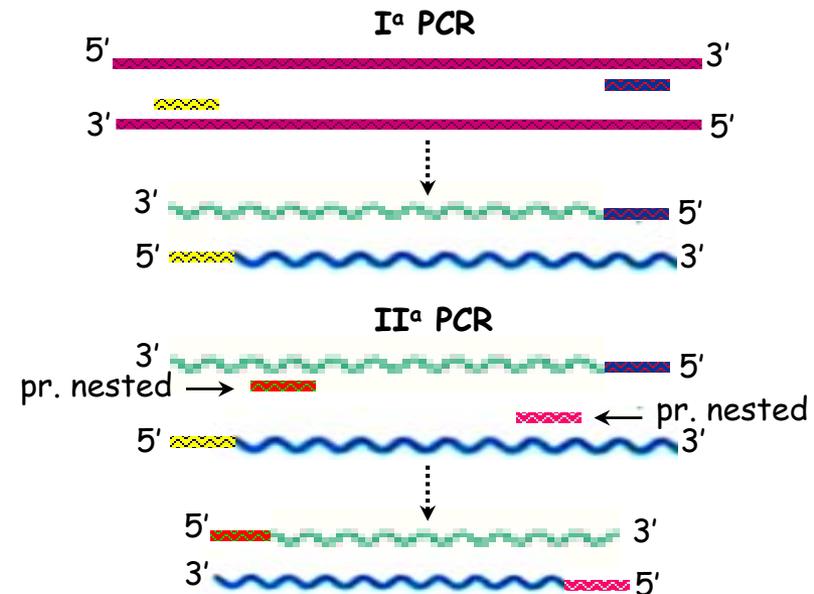
NOVITA': Enzimi "Hot start"
Gocce di cera



NESTED PRIMER PCR

Procedura:

- ✓ L'amplificazione è realizzata con un set di primers
- ✓ Il prodotto è riamplicato con un set di primers interni ai precedenti



I prodotti non specifici amplificati nella Iª PCR non saranno amplificati nella IIª

Con un po' di fantasia... ;-)

• Impiego di primers degeneri

- quando si vuole amplificare un gene di una specie, la cui sequenza esatta e' conosciuta solo in altre specie (**geni omologhi**).
- quando si conosce solo la **sequenza aminoacidica** della proteina.
- quando le sequenze target presentano esse stesse **eterogeneità**, ad es. nel caso dell' amplificazione di diversi sottotipi dell' HIV.

```

5' Sequences                               3' Sequences
CCACGACTCCAAGTGCCACCCGAT//TGCACCTTCCACTGGTGGTGCC Wnt1
ACAAGAGTGC AAGTGCCACGGGGT//TGTAAGTTC CACTGGTGGTGCC Wnt2
GGTGGAA TGC AAGTGCCACGGGGT//TGCAAATTC CACTGGTGGTGCT Wnt4
TGTGGCC TGC AAGTGCCATGGGGT//TGCAAATTC CACTGGTGGTGCT Wnt5a
CACCGAGTGC AATGCCACGGGGT//TGCCCGCTTCCACTGGTGGTGCG Wnt6
GCTGGAATGT AAGTGCCACGGCGT//TGTAAGTTC CACTGGTGGTGCT Wnt7a
GCTGGAGTGC AAGTGCCACGGCGT//TGCAAATTC CACTGGTGGTGCT Wnt7b
AAGGACATGC AATGTCA TGGCAT//TGCAAATTC CACTGGTGGTGT A Wnt8a
ACGCACGTGC AAGTGCCACGGCGT//TGCAAATTC CACTGGTGGTGCG Wnt8b
GACCAC TGC AAGTGCCACGGGGT//TGCCAGGTGC AGTGGTGGTGCT Wnt9a
GACCACGTGT AAGTGCCATGGCGT//TGCCAGGTGC AGTGGTGGTGCT Wnt9b
GCGGAAATGC AAGTGTCA TGGCAC//TGCCCGCTTCCACTGGTGGTGCT Wnt10b
AATGAAGTGT AAGTGCCATGGGGT//TGTAAGTTC CACTGGTGGTGCT Wnt11
    
```

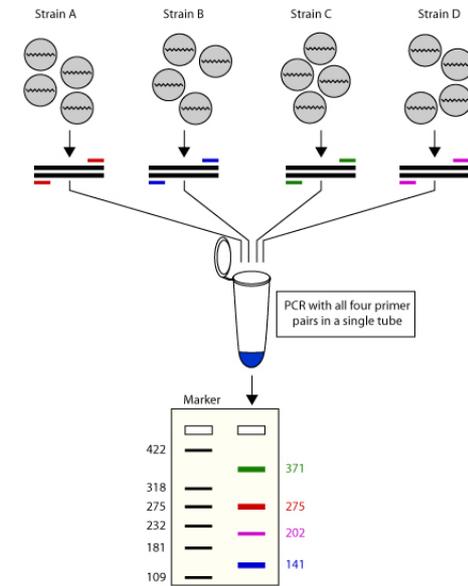
```

UPPER PRIMER LOWER PRIMER
5'-GGGGAATTCANCGAVT SYAARTGYCAY-3' 3'-KWSCRBTGGTGGTG CAGATCTTTT-5'
E c o r RI B g I II
    
```

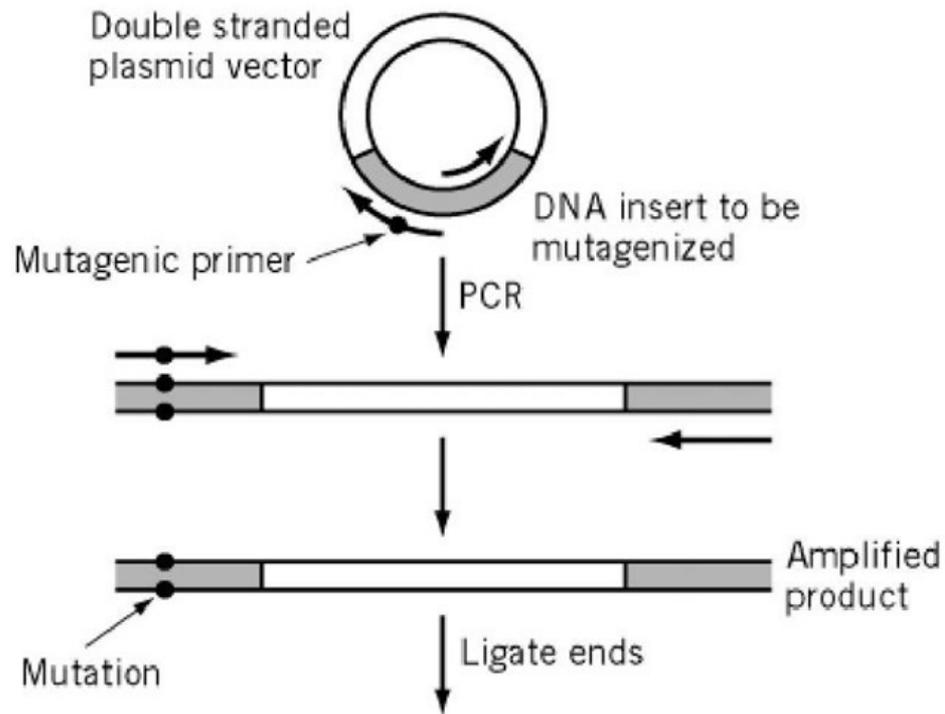
V=ACG, N=ACGT, R=AG, M=AC, Y=CT, H=ACT, W=AT, S=CG, K=TG, B=CGT

• Multiplex PCR

Vengono prodotti contemporaneamente e nella stessa provetta diversi amplificati, grazie all' utilizzo di diverse coppie di primers (e' chiaro che la resa si abbassa).

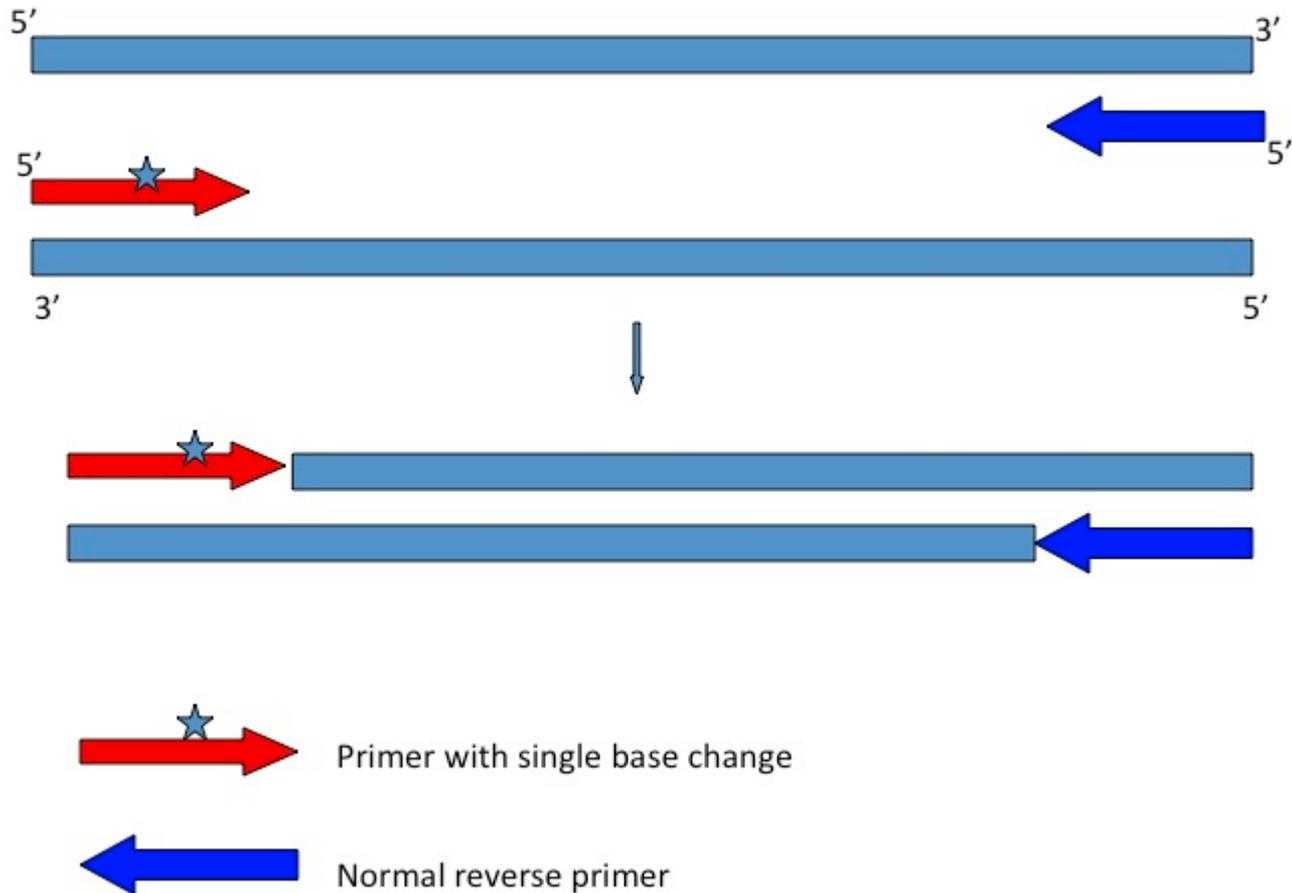


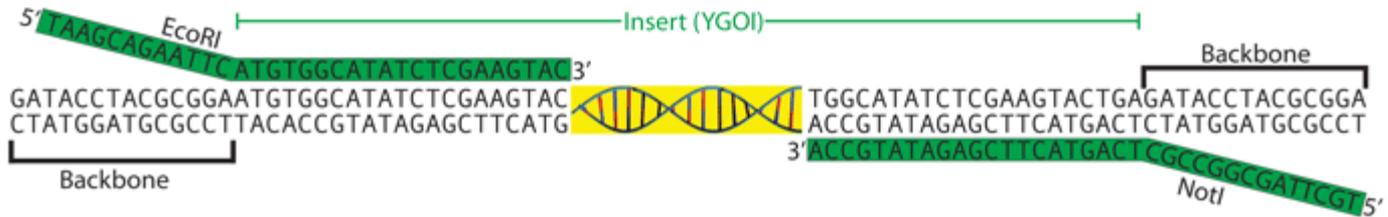
- *Inverted PCR*



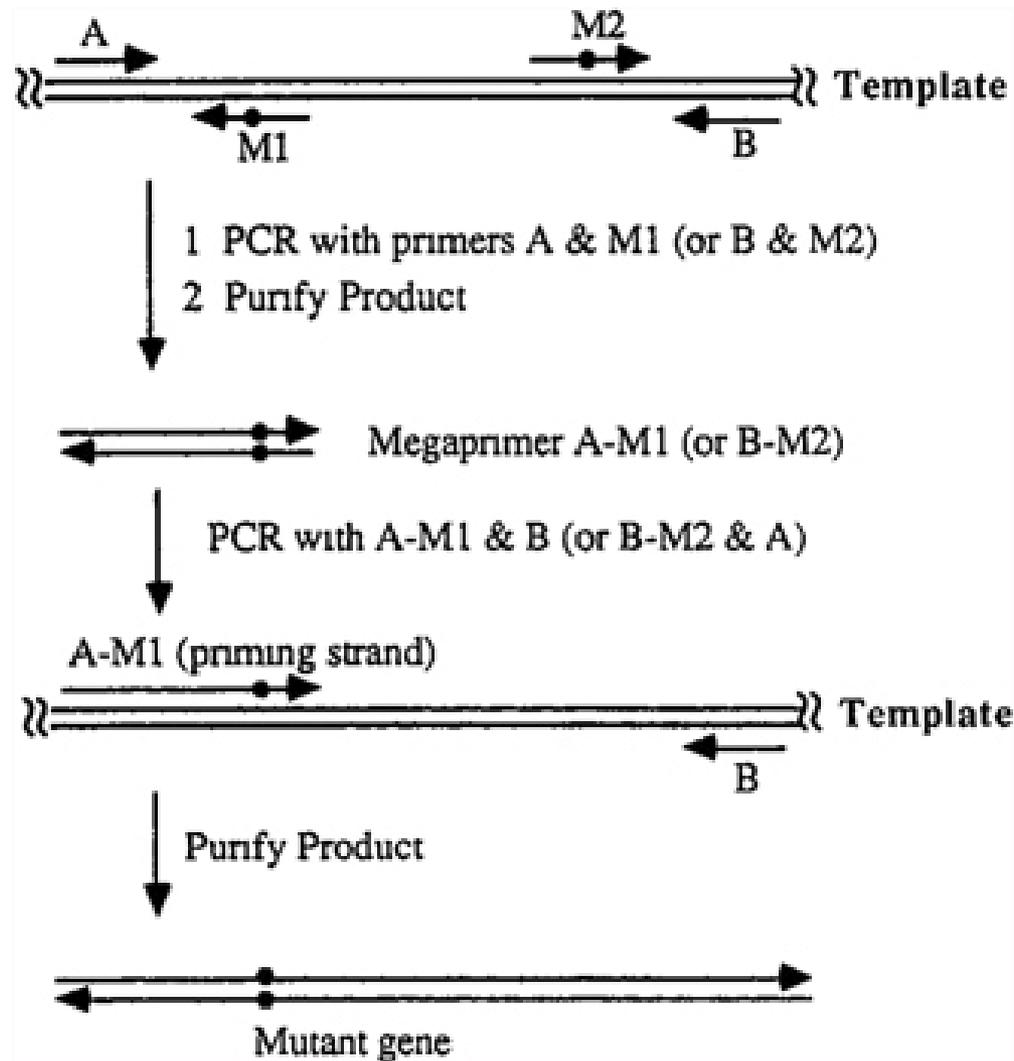
Mutagenesi in vitro

Point mutations can be introduced into genes by PCR

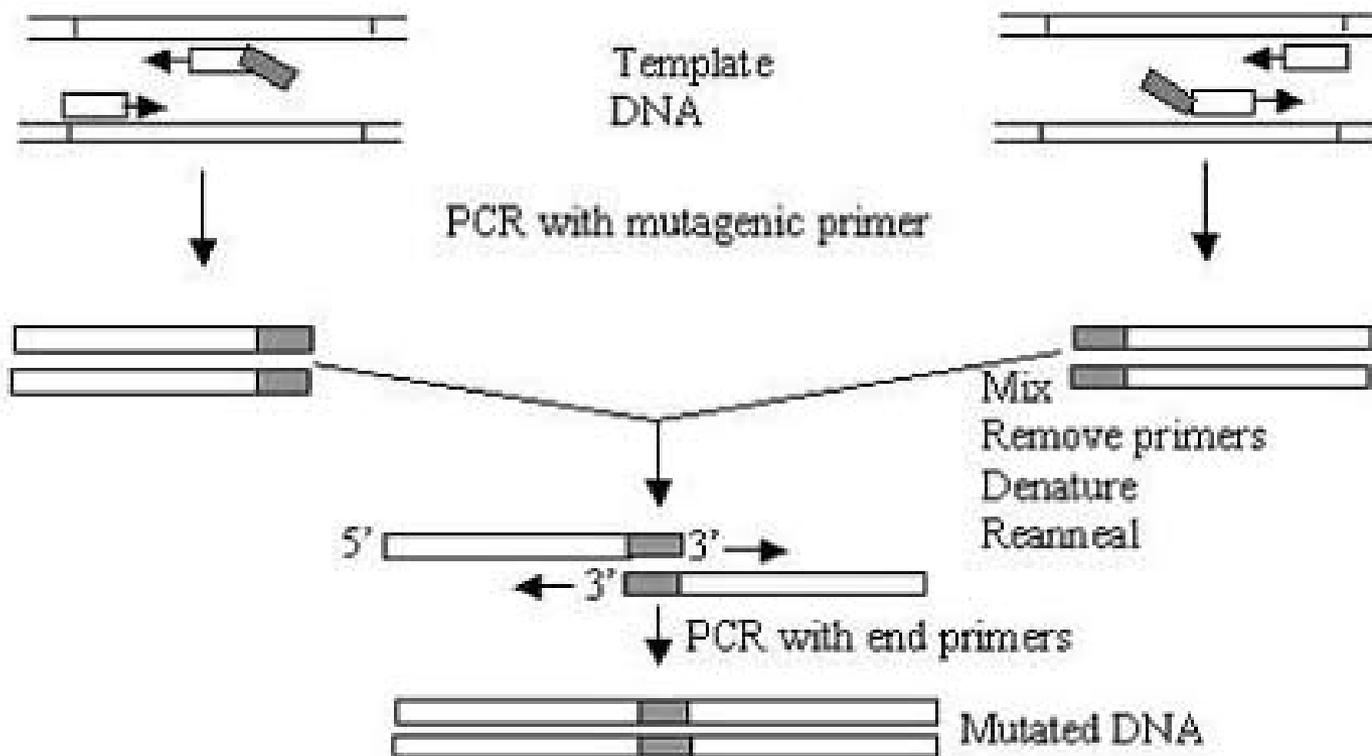




Megaprimer PCR



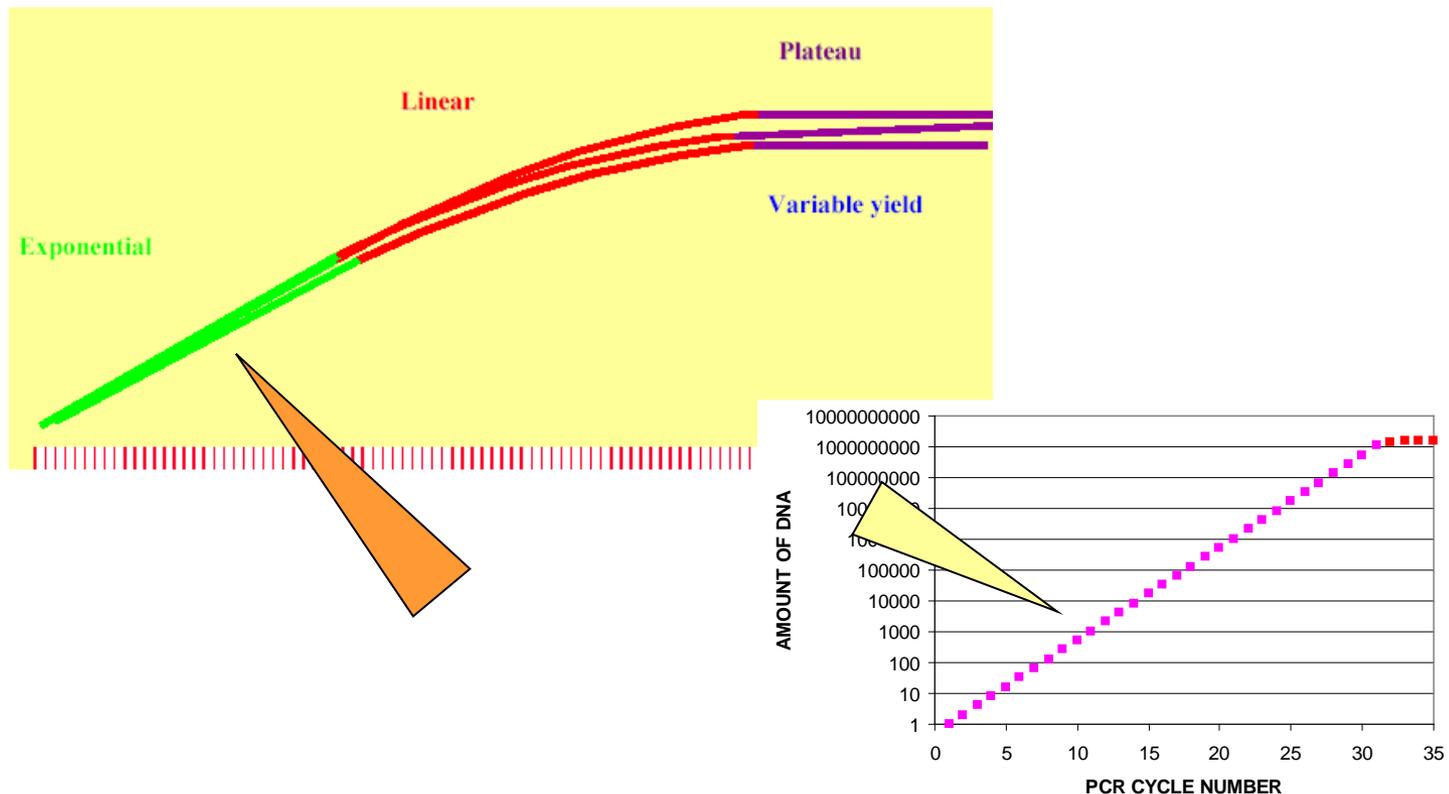
Insertion Mutagenesis by PCR Overlap Extension



Quantitative aspects of PCR

PCR Quantitativa : Real-Time PCR

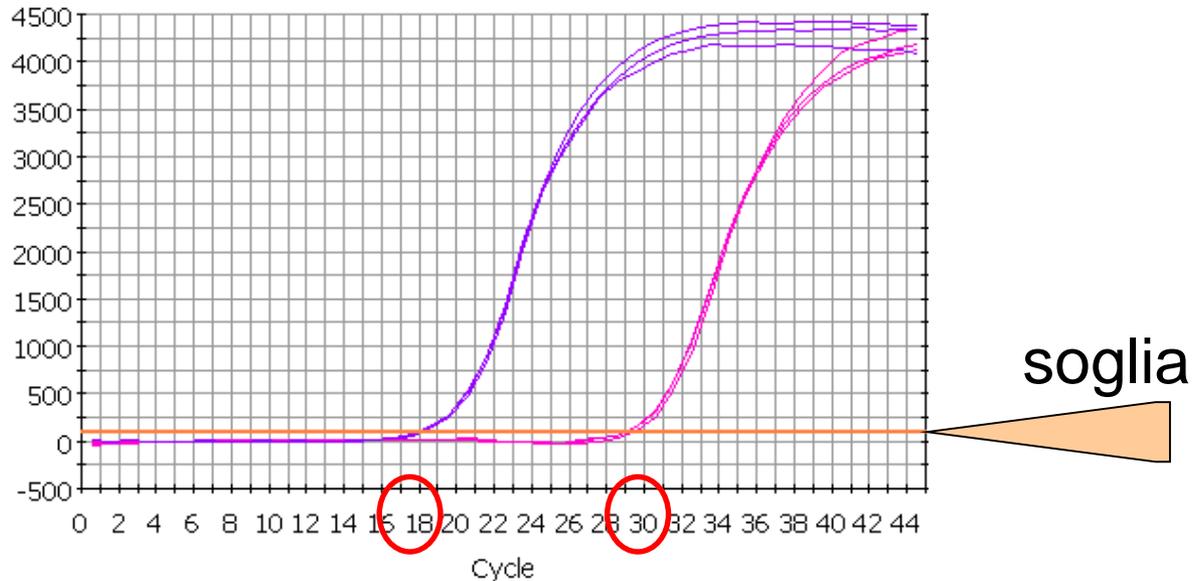
Durante la fase esponenziale della PCR, la **quantità di copie prodotte** è proporzionale al **numero di copie di partenza**; ciò è rilevabile grazie alla misurazione in “tempo reale” della fluorescenza emessa da fluorofori usati durante l’amplificazione



PCR Quantitativa : Real-Time PCR

Principio base:

Maggiore è il numero delle “molecole stampo” presenti all’inizio della reazione e **minore** sarà il numero di cicli necessari per raggiungere un determinato valore minimo di ammontare di prodotto (Cycle threshold **Ct** - ciclo soglia).



Real-Time PCR: Detection chemistries.

Ovvero i fluorofori che permettono la quantificazione dell'amplificato.

DNA Binding Dyes.

sequenza indipendente

Hybridization Probes.

Hydrolisis Probes.

Hairpin Probes.

Scorpion Probes.

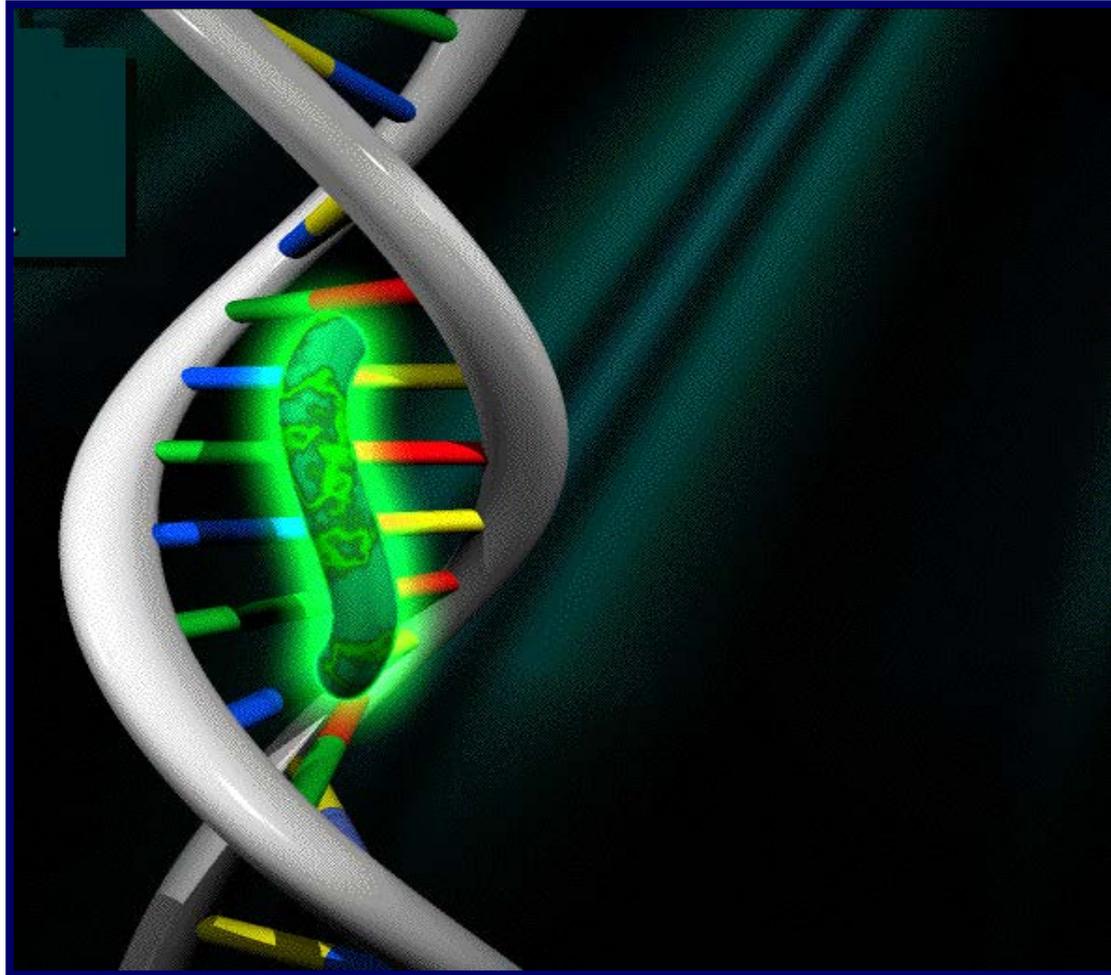
FRET Probes.

sequenza specifiche



DNA Binding Dyes: e.g. : SYBR Green

molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA

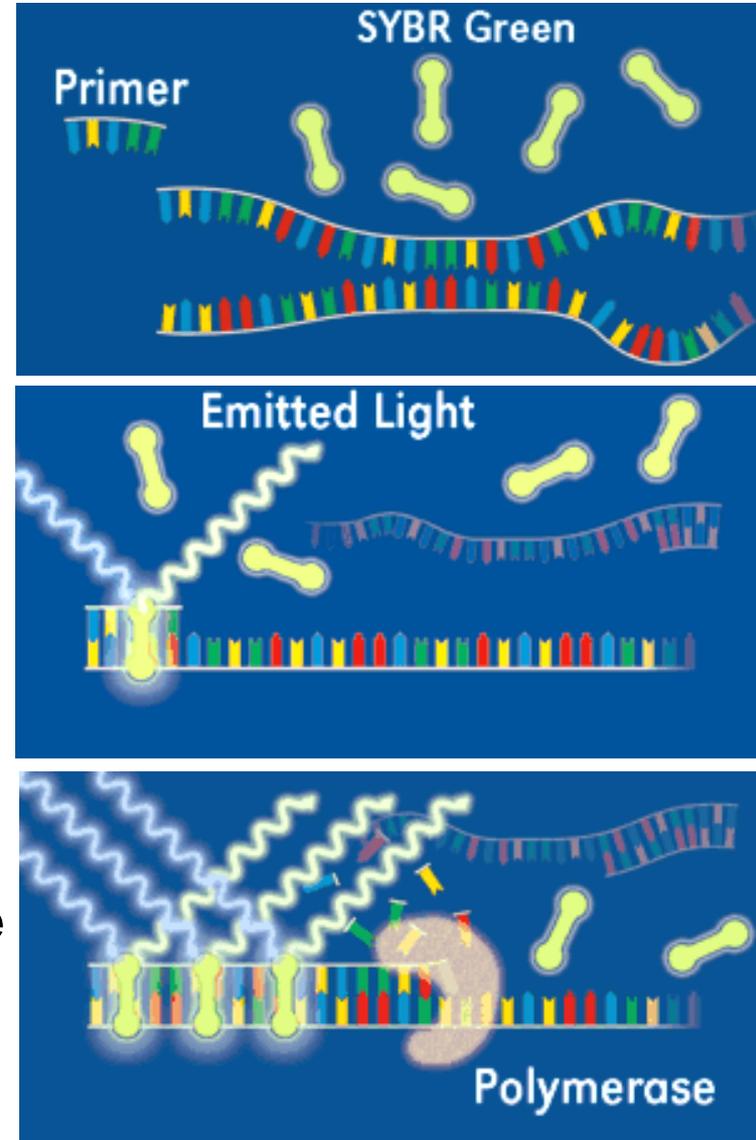


DNA Binding Dyes: e.g. : SYBR Green

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

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

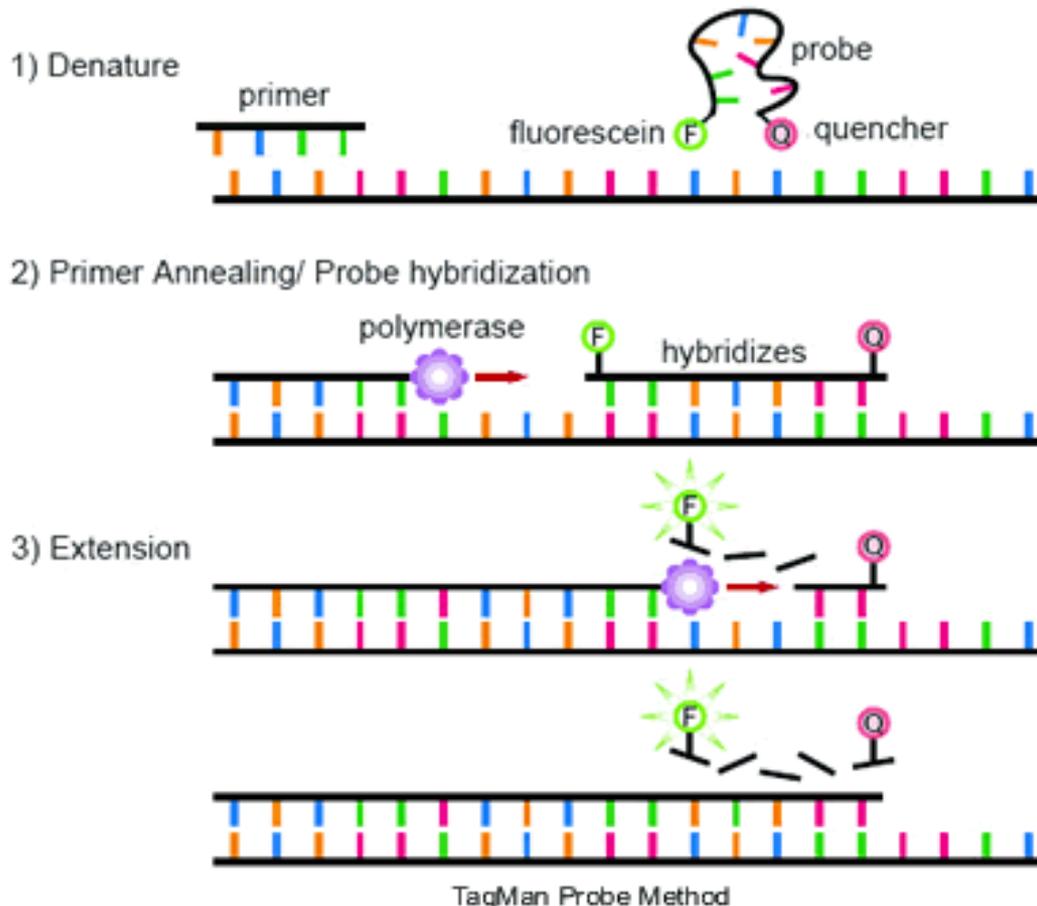
Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone



Hydrolysis Probes. e.g.: TaqMan Probes

Sonda alle cui estremità sono coniugati un reporter al 5' (che emette fluorescenza) ed un quencher al 3' (che blocca l'emissione).

L'idrolisi della sonda ad opera della polimerasi provoca il distacco del reporter dal quencher e la conseguente emissione di energia.



2 primers

1 sonda

attività 5'>3' esonucleasica

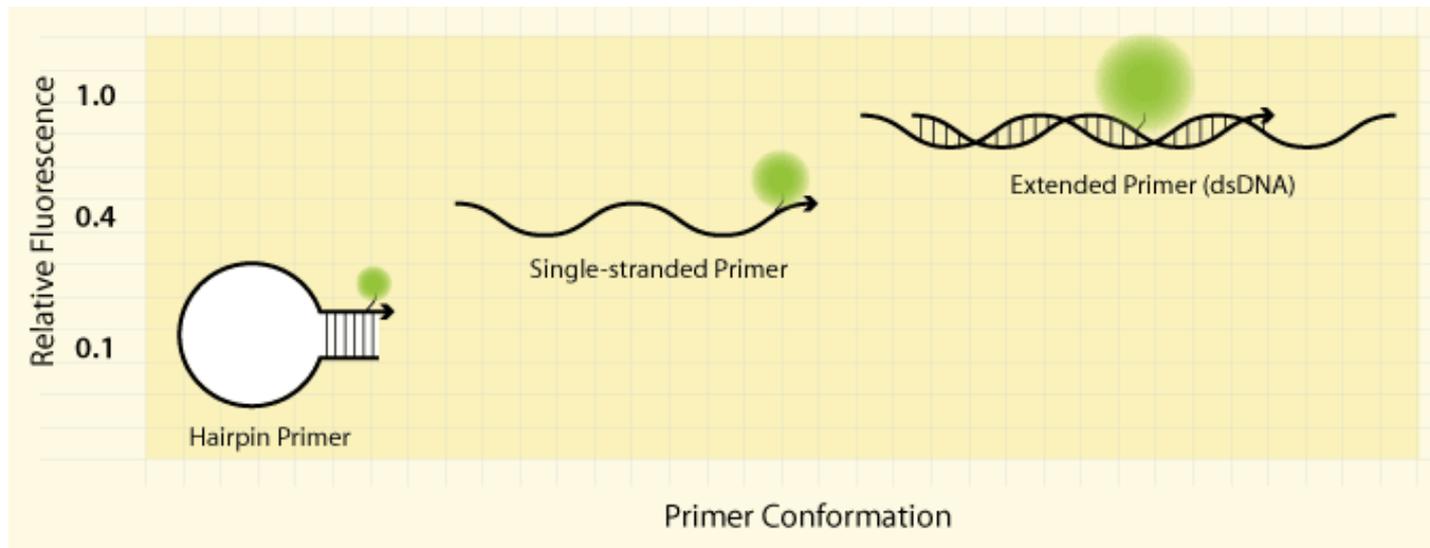
Hairpin Probes: e.g. : LUX Primers

Il fluoroforo è integrato in uno dei due primers.

Quando non risulta incluso nel dsDNA l'emissione è minima.

Sono sequenza-specifiche.

E' conveniente verifica (corsa su gel) della presenza di un solo prodotto di PCR.



2 primers (uno dei quali marcato)

Real-Time PCR: Quantificazione

L'approccio quantitativo può essere di due tipi :

- **ASSOLUTO**
- **RELATIVO**

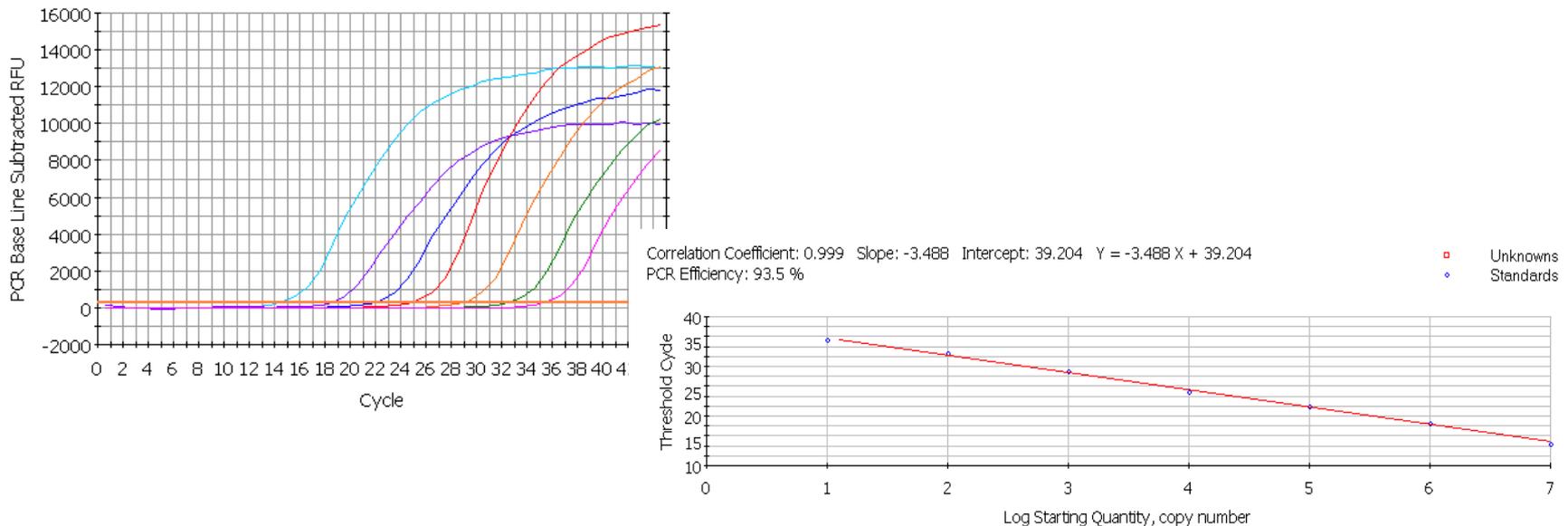
Real-Time PCR: Quantificazione

Quantificazione assoluta:

Il dato è indicato come valore assoluto (e.g.:copie,ug/ul,etc)

Utilizza una retta di calibrazione derivata da diluizioni seriali di uno standard di riferimento.

Uno standard di riferimento può essere un frammento di dsDNA, o ssDNA, o cRNA prodotti in vitro (tramite vettori plasmidici ad es.) e che ricalchi la sequenza di interesse.



Real-Time PCR: Quantificazione

Quantificazione relativa:

- Esprime la variazione nei livelli di espressione dell' mRNA di un campione –TARGET- in relazione ai livelli di un mRNA di controllo.
- I risultati dell'elaborazione non sono espressi come quantità di mRNA/DNA presenti nel campione, ma come **RAPPORTO tra TARGET/CONTROLLO.**

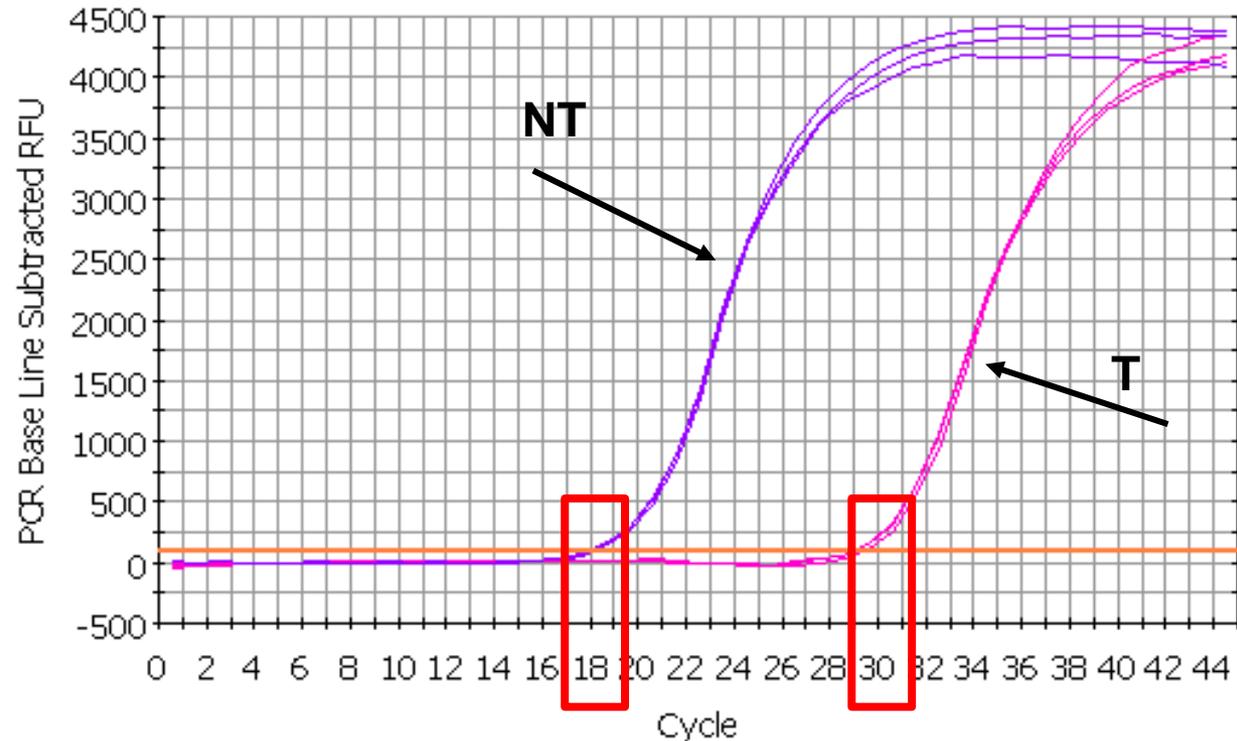
Real-Time PCR: Normalizzazione

Come discriminiamo variazioni nei livelli di espressione dalle variazioni nella quantità iniziale di campione?

Gene FVII

Sample1 NT
Ct value: 18

Sample2 T
Ct value: 29.5

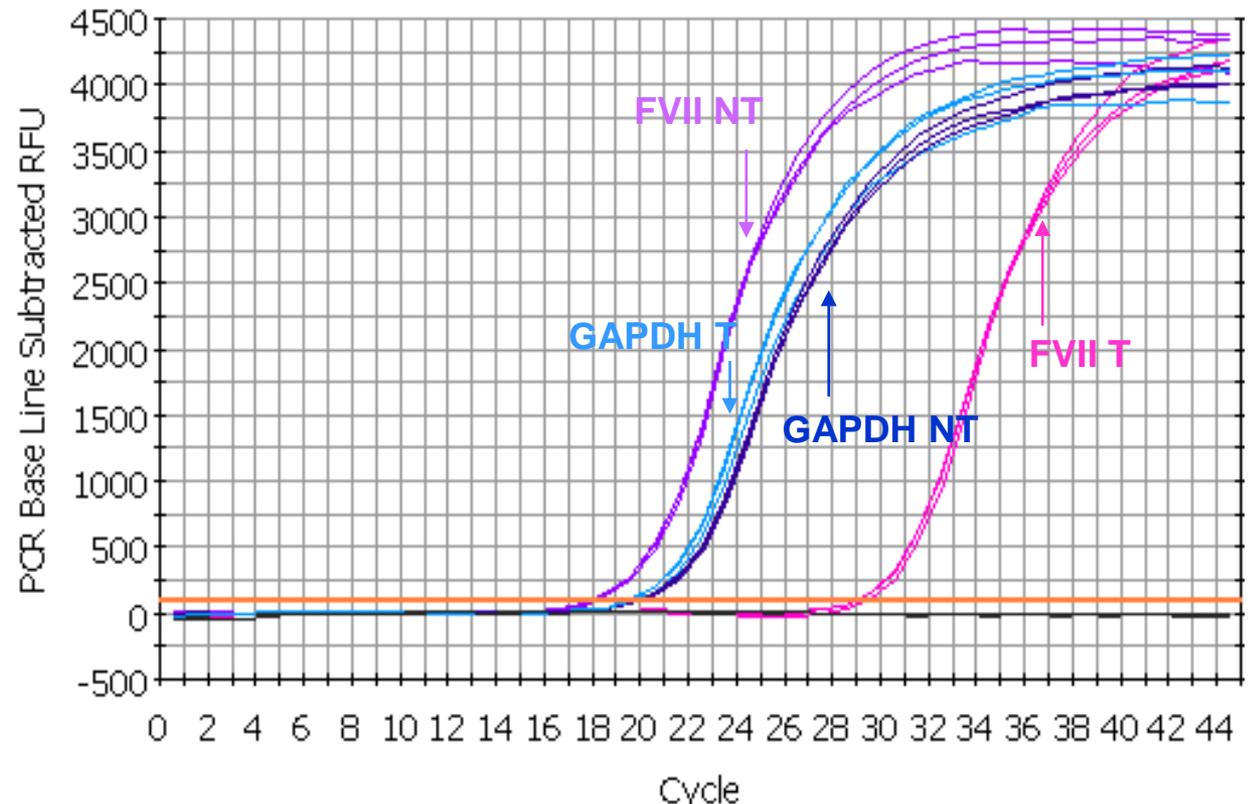


La variazione tra T e NT è imputabile al trattamento ?
o era presente in partenza più mRNA nel campione NT?

Real-Time PCR: Normalizzazione

La normalizzazione si pone come obiettivo quello di minimizzare gli errori dovuti a differenti quantità nel materiale di partenza.

Co-amplificando un gene esogeno (housekeeping) con il nostro target in modo da normalizzarlo.



Real-Time PCR: Quantificazione

Meglio una quantificazione assoluta o relativa?

ASSOLUTA:

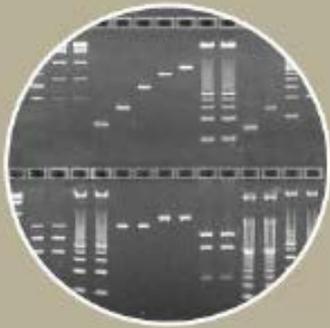
- Più impegnativa
- Richiede costruzione di una curva riproducibile
- Deve essere ripetuta ad ogni saggio

RELATIVA:

- Valori di Ct applicabili solo ai campioni in esame
- Non sono dati “assoluti”
- Non possono essere considerati per esperimenti svolti nell’arco di giorni

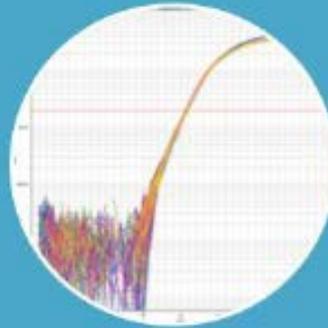
Digital PCR

PCR Evolution/Revolution



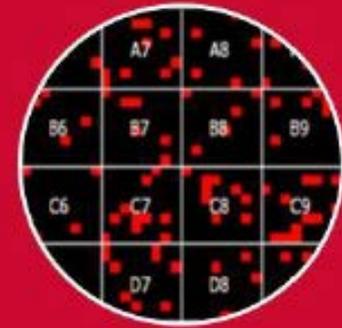
Generation
One

Endpoint PCR



Generation
Two

Real-Time PCR



Generation
Three

Digital PCR

Performance

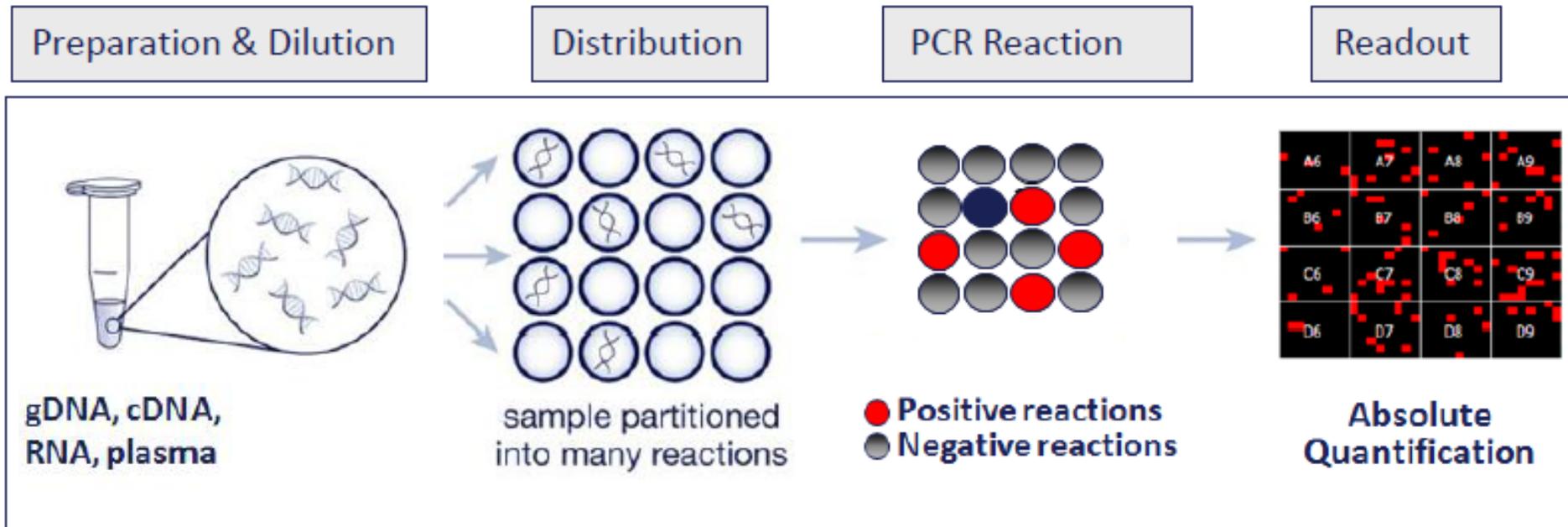


Introduction – Digital PCR as a complement to qPCR

- Digital PCR is a new approach to PCR quantification which provides greater precision and sensitivity relative to real-time PCR
- Samples are partitioned across hundreds to thousands of reactions
- Digital PCR is ideal for rare events detection
- Digital PCR enables direct absolute quantification of nucleic acids in a sample

Digital PCR Overview

Digital PCR is an analytical technique for absolute quantification of nucleic acid samples based on PCR amplification of single template molecules



Use the ratio of **positive (red)** to **negative (Black)** PCR reactions to count the number of target molecules

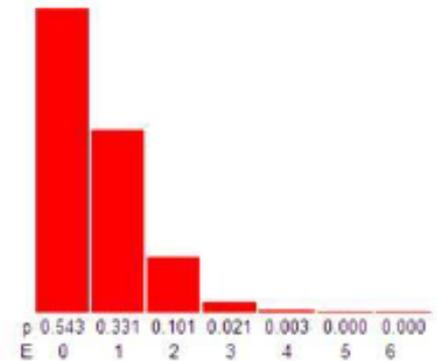
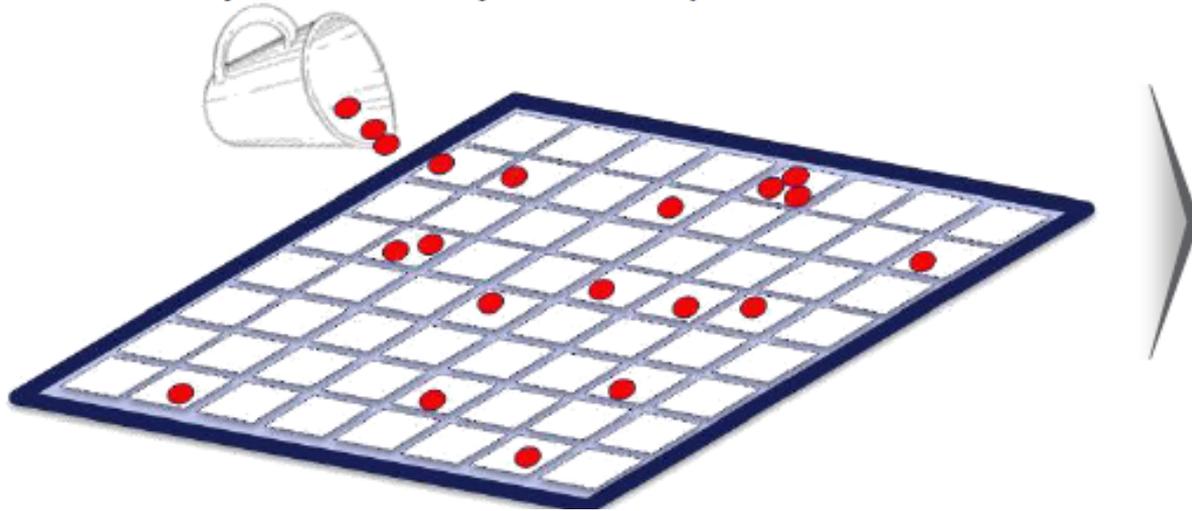
When the entire set of divided reactions is counted, the total number of **‘positive’ reactions** is equal to the **number of original target molecules** in the entire volume, and the **total number of reactions multiplied by the individual reaction volume** equals the **total volume** assayed. Thus, the **absolute concentration** of the target is easily calculated as being equal to the total number of target molecules divided by the total measured volume.

dPCR platforms which divide the sample into a **larger number** of compartments will have the **highest accuracy**, by directly counting single molecules

dPCR performed using **higher numbers** of compartments provides the **highest sensitivity**—with limits of detection approaching 1 in a million

Molecule Counting Requires A “Correction” Factor

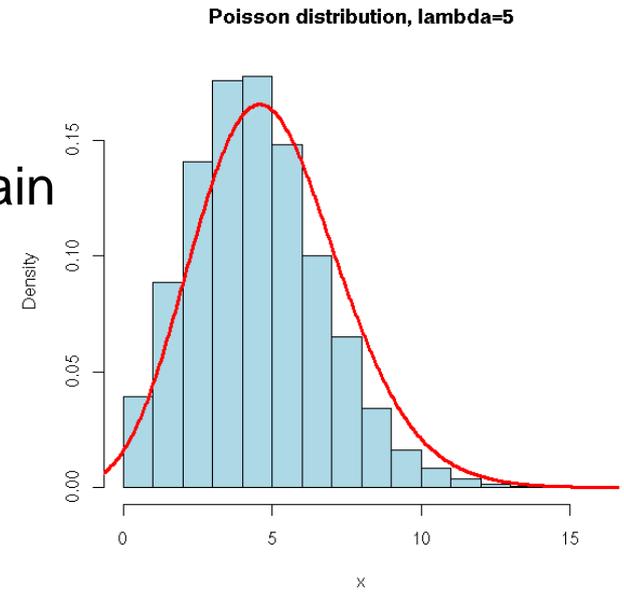
- **Problem:** Due to random assortment, we cannot be assured that each positive reaction received only a single molecule
 - Must have at least one negative reaction (reaction with no molecule)
 - Probability of a reaction receiving zero, one, two, three etc. copies is described by the **Poisson model**
 - Poisson statistics “corrects” for reactions containing multiple molecules and provides a “probability” that our answer is correct



When the number of target molecules is significantly smaller than the number of compartments (low occupancy), the **chance of co-compartmentalization is small**. Poisson statistics can be used either as a **small correction factor** (at low occupancy) or it can be used to **calculate an estimated concentration** (at high occupancy).

It is based on **Poisson distribution**

...suppose someone typically gets 4 pieces of mail per day on average. There will be, however, a certain spread: sometimes a little more, sometimes a little fewer, once in a while nothing at all.



Given only the average rate, for a certain period of observation (pieces of mail per day, phonecalls per hour, etc.), and assuming that the process, or mix of processes, that produces the event flow is essentially random, the Poisson distribution specifies how likely it is that the count will be 3, or 5, or 10, or any other number, during one period of observation. That is, **it predicts the degree of spread around a known average rate of occurrence.**

DNA Sequencing

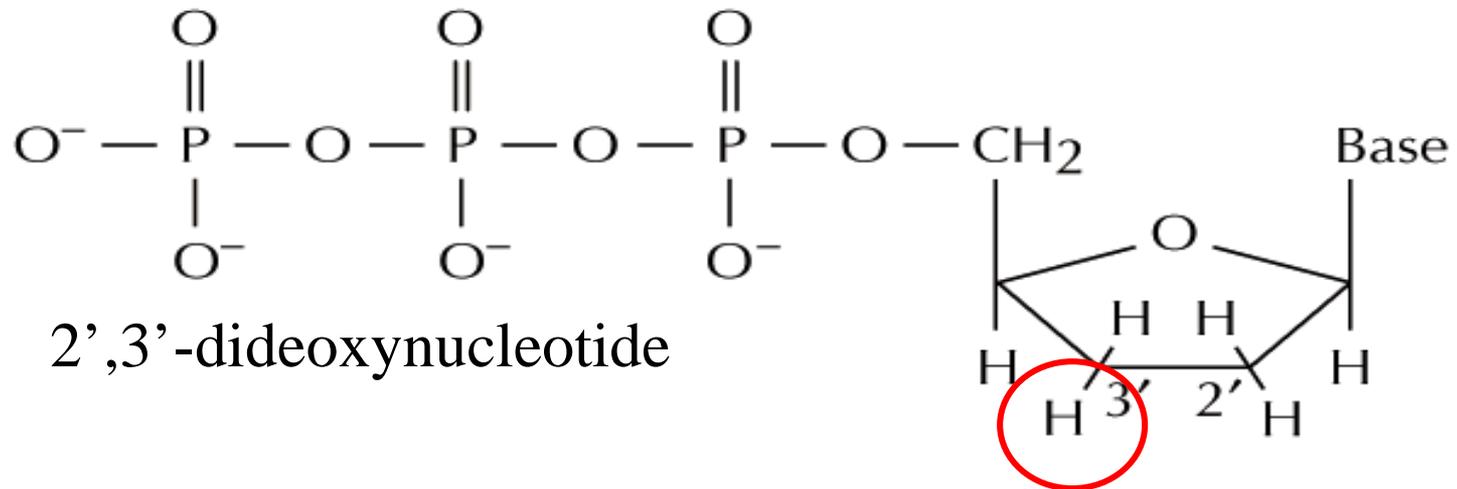
- Extremely important technique for understanding organisms
- Can now determine sequence of whole genomes - including human
- Technique is based on enzymatic DNA synthesis using dideoxynucleotides

DNA Sequencing - Sanger Method

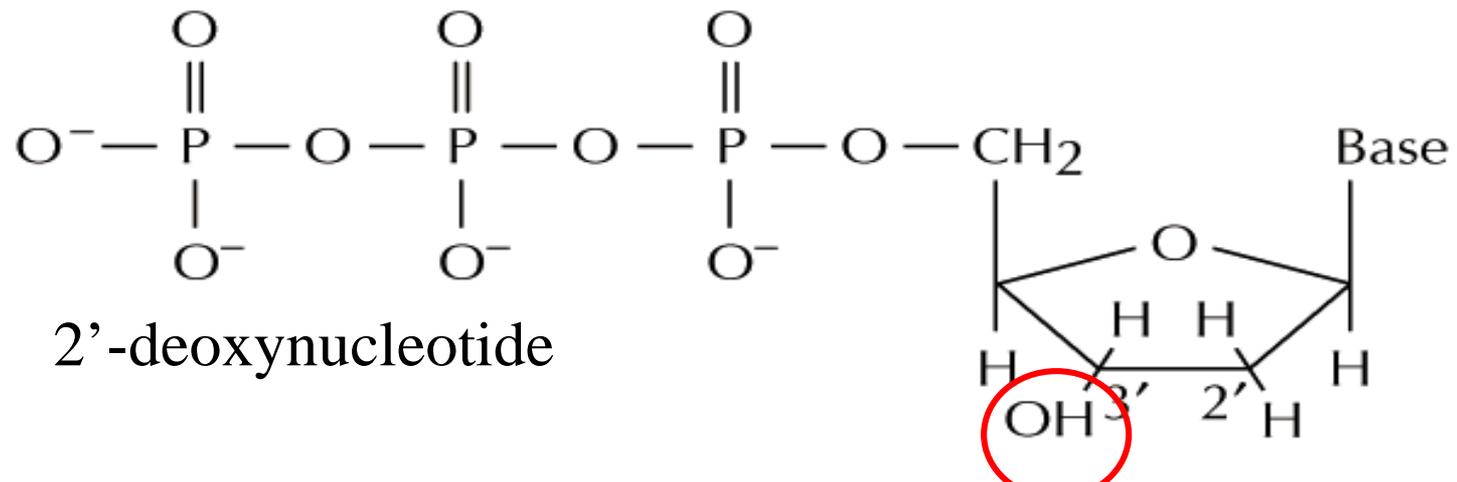
- Reaction mix:
 - DNA Polymerase
 - Primer
 - Template
 - 2' deoxynucleotides (dNTP)
 - 2',3' dideoxynucleotides (ddNTP) also used
 - Mix of dNTPs and ddNTP (at lower conc.)

Deoxy- and dideoxynucleotides

A

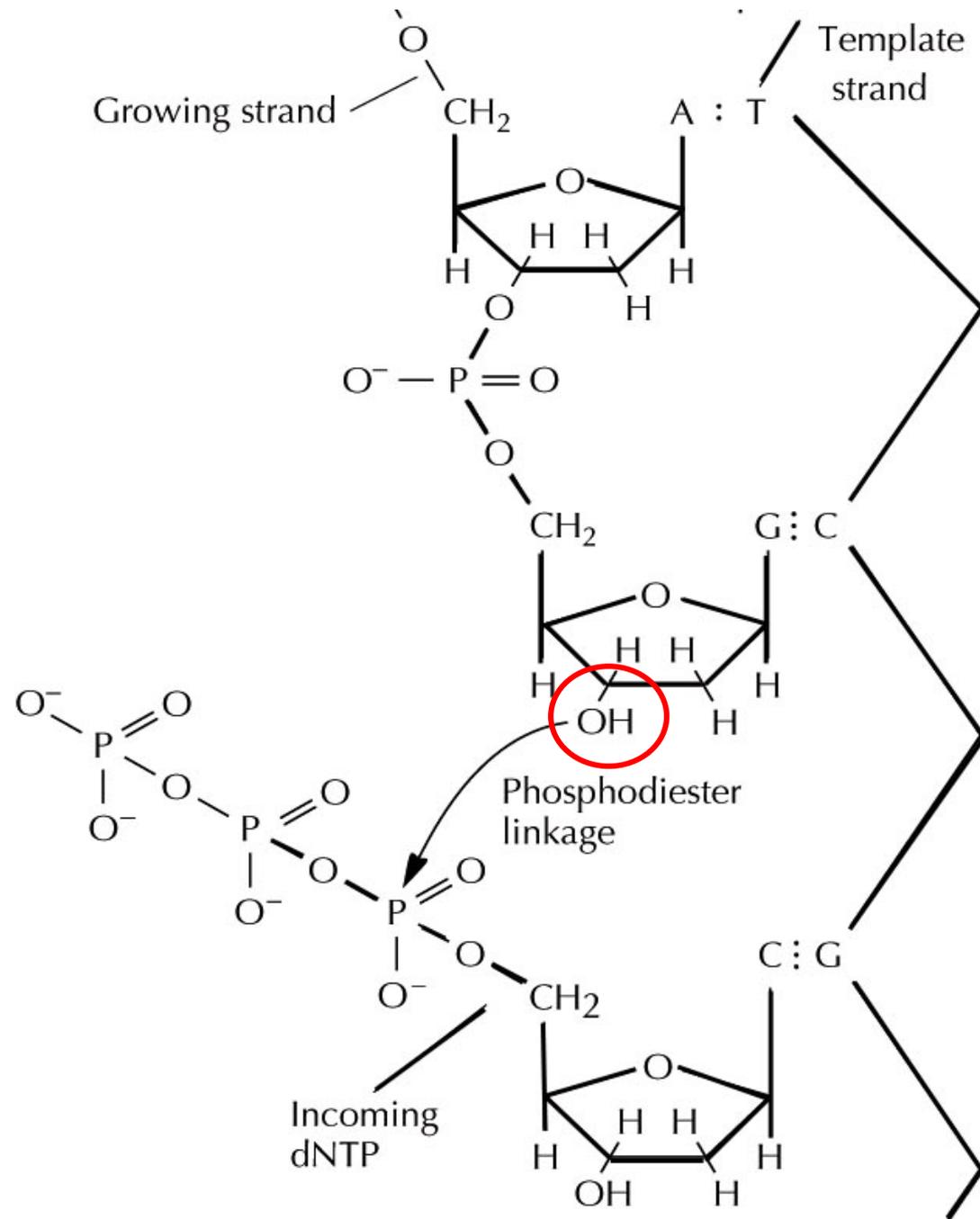


B

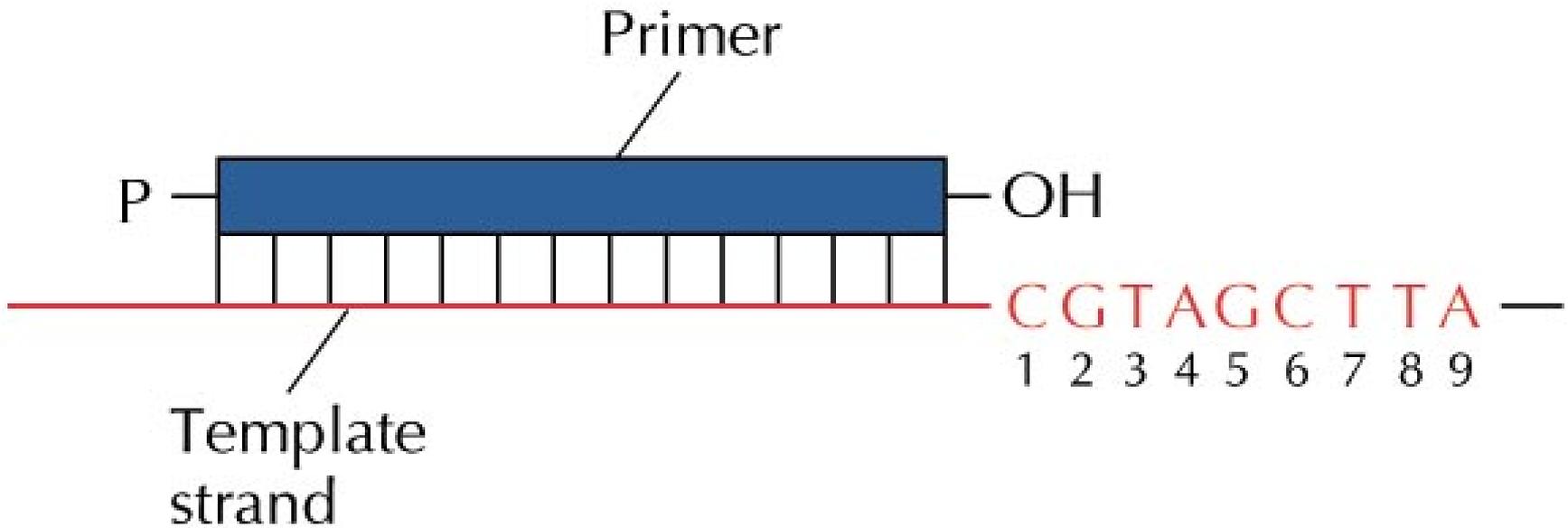


Normal DNA Synthesis

Link forms between
3'OH and 5' PO₄



Primer Extension during DNA synthesis



ds DNA template is denatured
temperature lowered to allow basepairing of primer

DNA Sequencing

Primer



■ GATCACTGTCGACGTAATCGGCATTGCAACGT

Template



Polymerase extends primer until a ddNTP is incorporated



CTAGTGACAGCTGCA****

■ GATCACTGTCGACGTAATCGGCATTGCAACGT



CTAGT****

■ GATCACTGTCGACGTAATCGGCATTGCAACGT



CTAGTGACAGCTGCATTAGCCGTAAGCTTG****

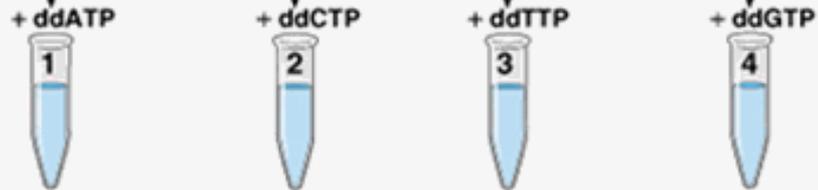
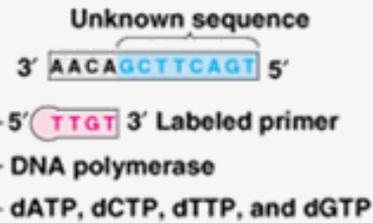
■ GATCACTGTCGACGTAATCGGCATTGCAACGT



CTAGTGACTGCAGCATTAGCCC****

■ GATCACTGTCGACGTAATCGGCATTGCAACGT

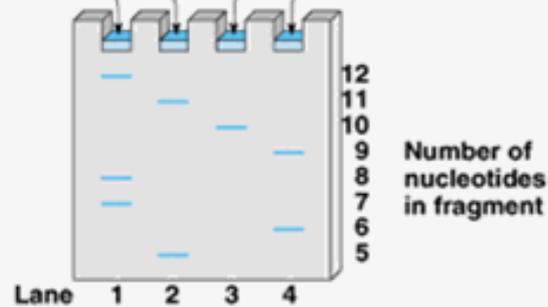
- 1 Incubation of single-stranded DNA with unknown sequence in DNA synthesis reaction mixtures containing dideoxynucleotides



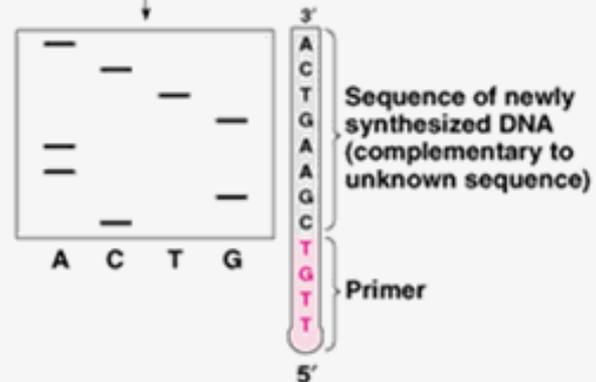
- 2 Products of the reactions



- 3 Electrophoresis of reaction mixtures

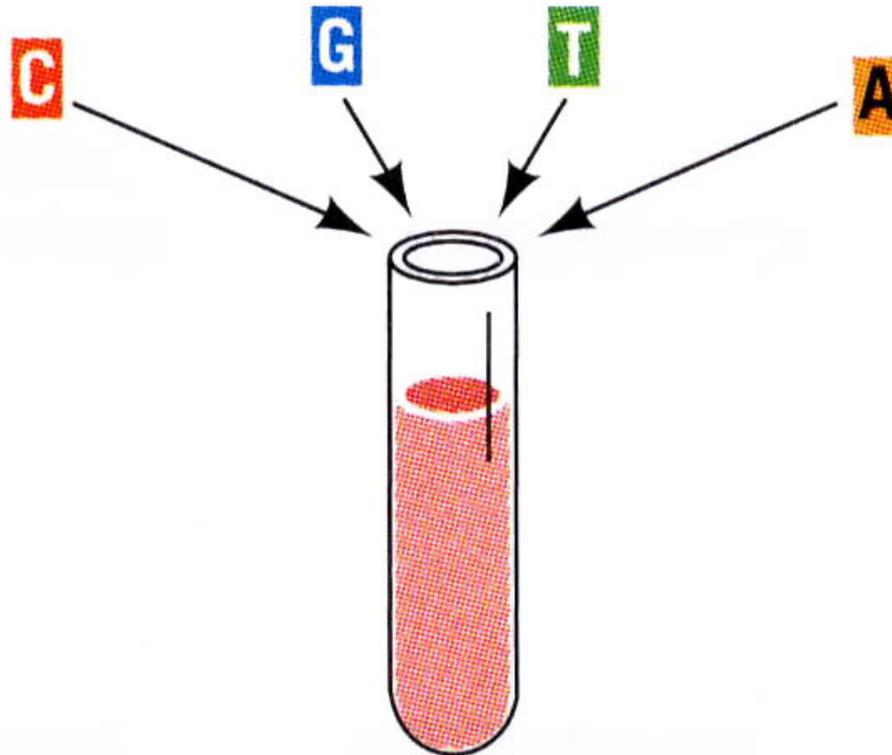


- 4 Autoradiography to visualize bands and deduction of 5' → 3' sequence of newly synthesized DNA strand by reading order of bands from bottom to top

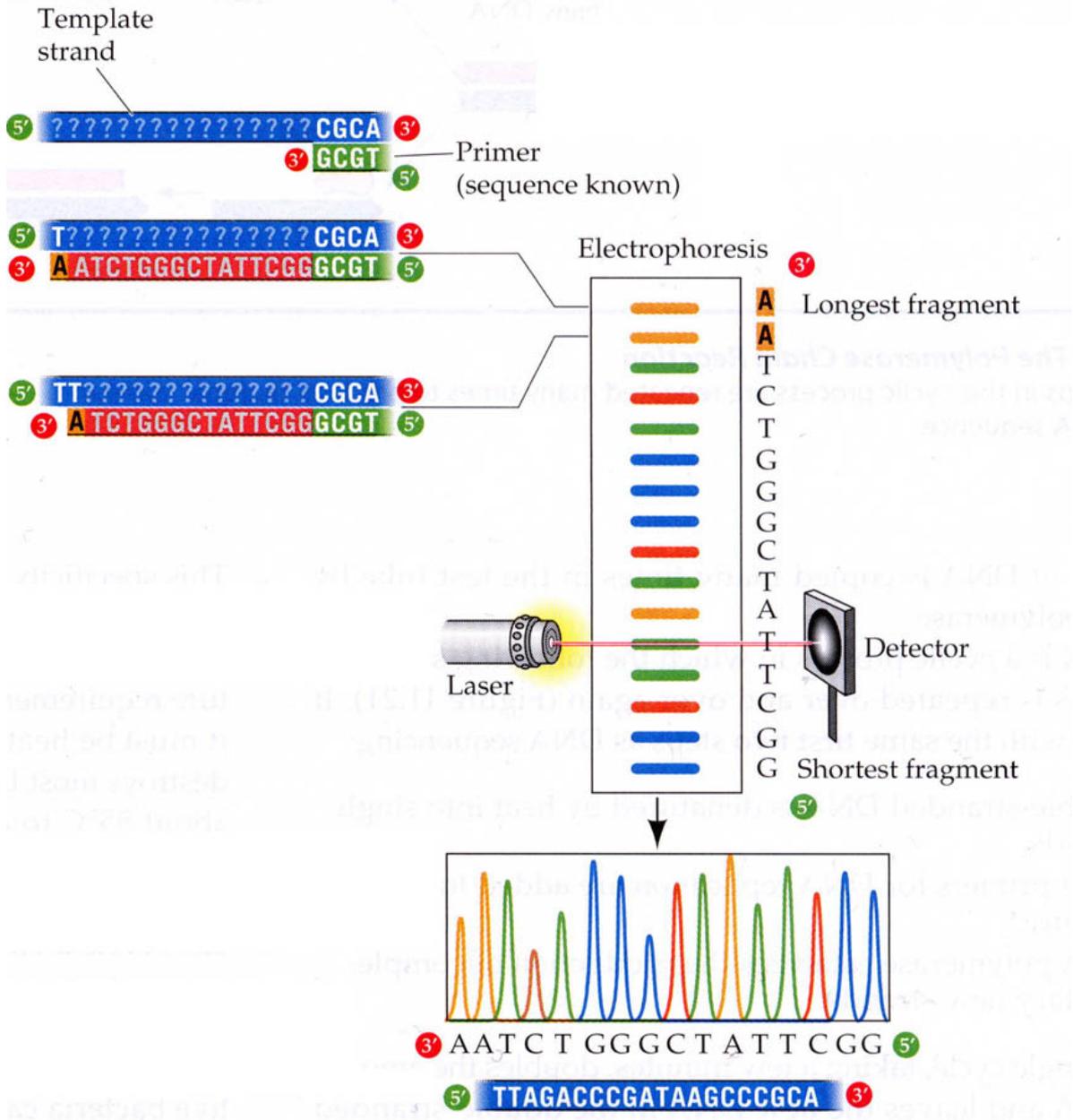


Fluorescent ddNTPs

ddCTP ddGTP ddTTP ddATP

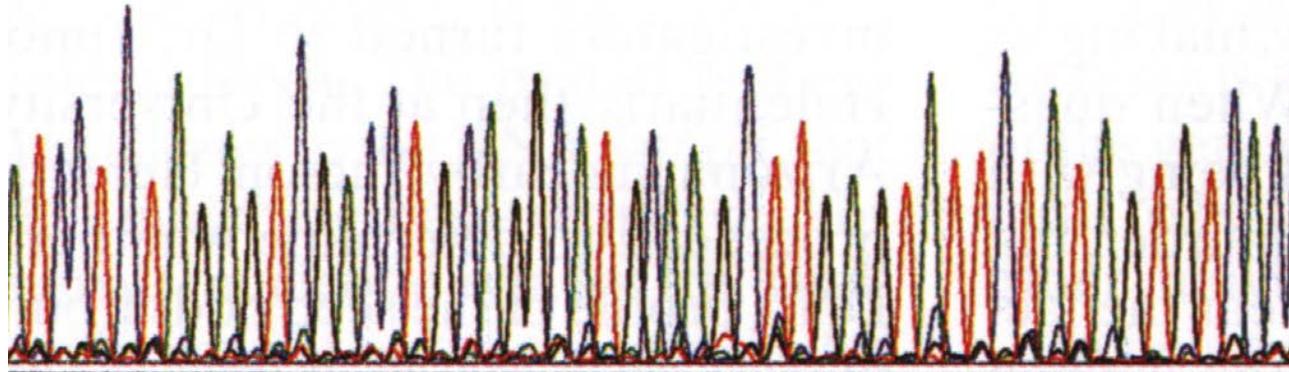


Plus: a preponderance of dNTPs

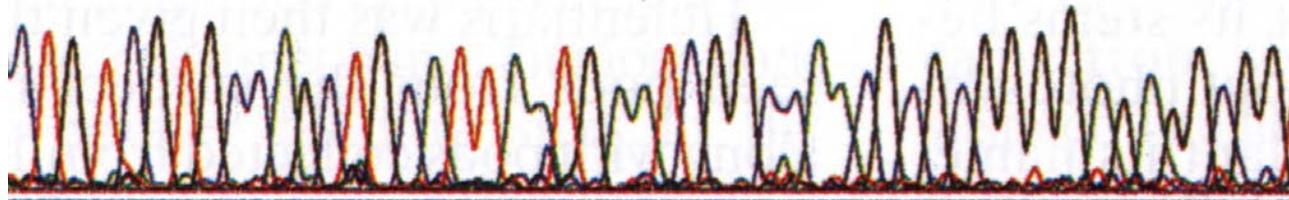


Automated Fluorescence Sequencing

A TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA TGCAAGCTTGA GTATTCTA TAGTGTCACT
50 60 70 80 90 100



CTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
280 290 300 310 320



Pyrosequencing

Note: No actual houses are burned down in pyrosequencing



Pyrosequencing (Life Sciences / Roche 454)

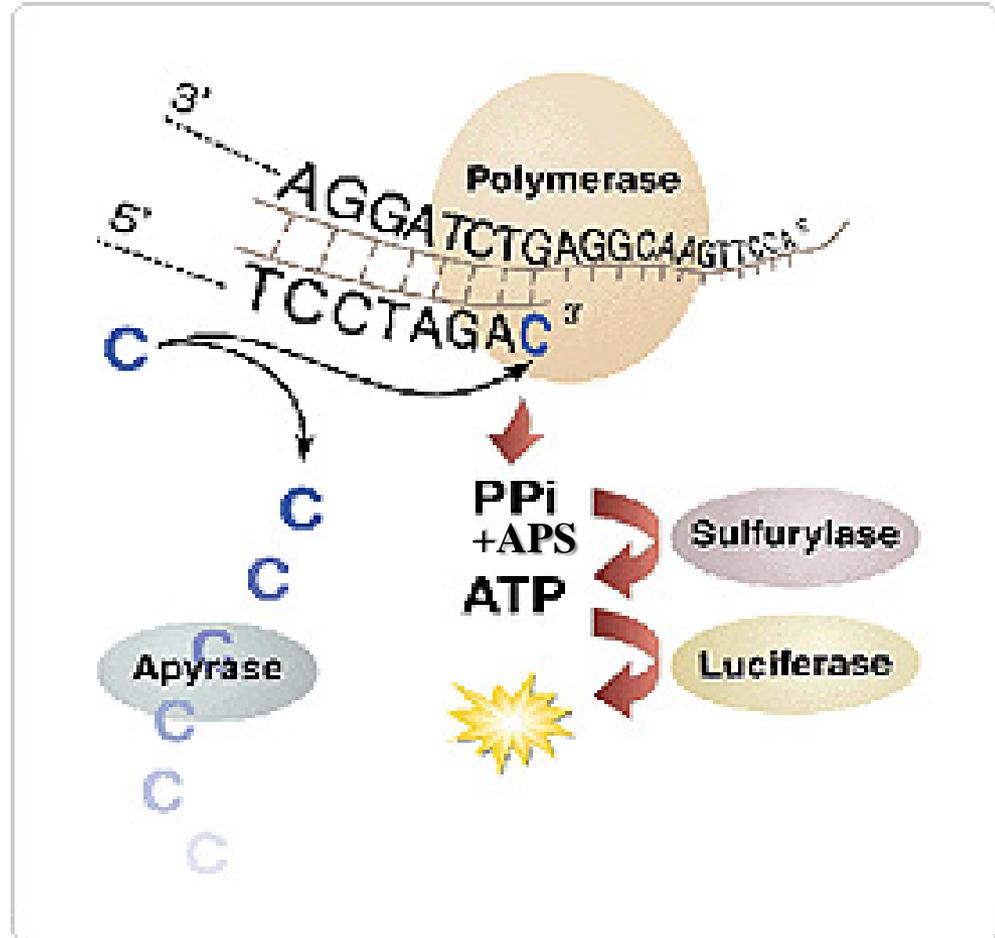
- A **luciferase** is an enzyme which emits light in the presence of ATP.



Several organisms, such as the American firefly and the poisonous Jack-o-lantern mushroom, produce luciferases.

Detecting polymerase activity

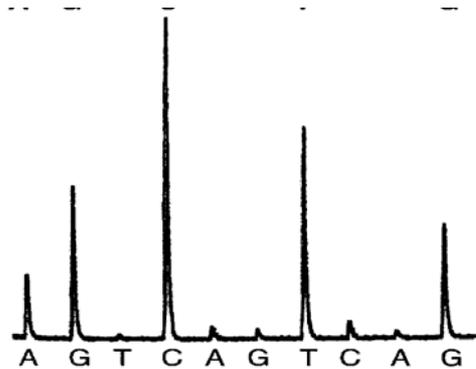
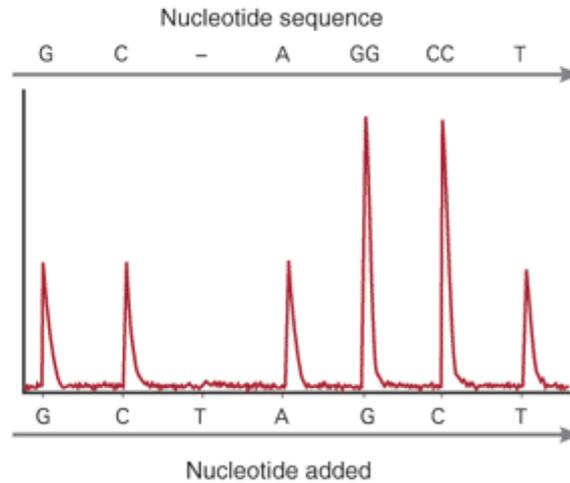
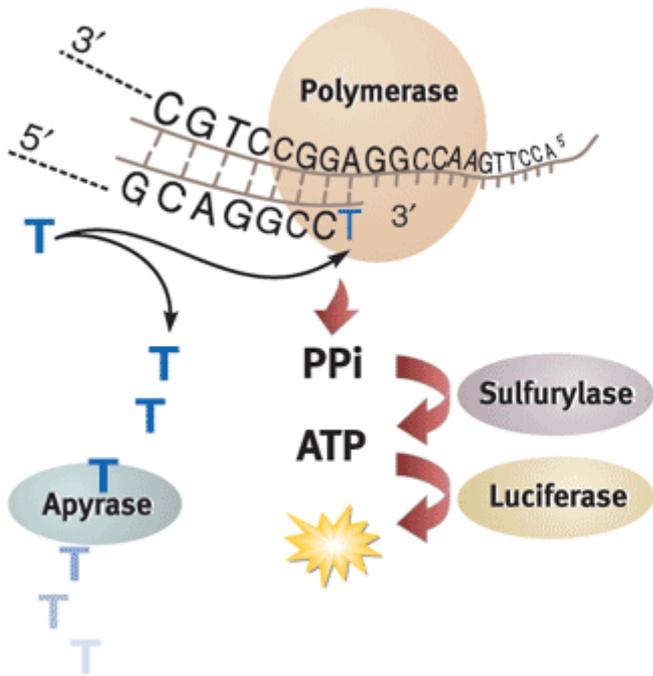
- Recall: Pyrophosphate is also known as PPi , also known as “two phosphate groups stuck together”. During replication, each addition of a dNTP releases pyrophosphate
- In the reaction mixture, PPi allows adenosine phosphosulfate (APS) to be converted to ATP; this ATP allows luciferase to luciferate (emit light).
- Measures strand extension as it happens



Pyrosequencing cycle

- Add dATP. If light is emitted, your sequence starts with A. If not, the dATP is degraded (or elutes past immobilized primer).
- Add dGTP. If light is emitted, the next base must be a G.
- Then add T, then C. You now know at least one (maybe more) base of the sequence.
- Repeat!

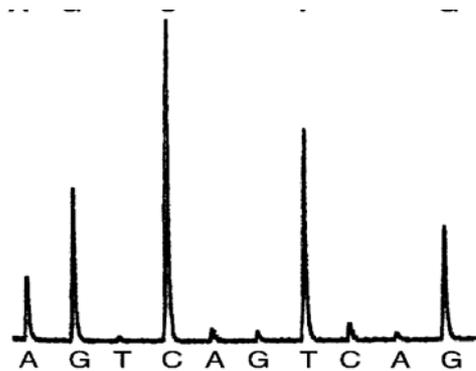
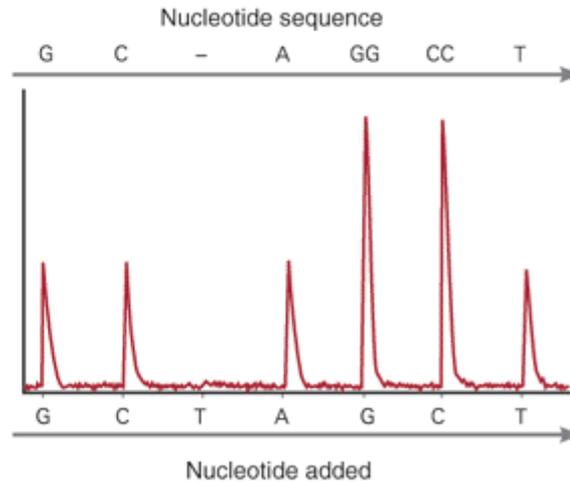
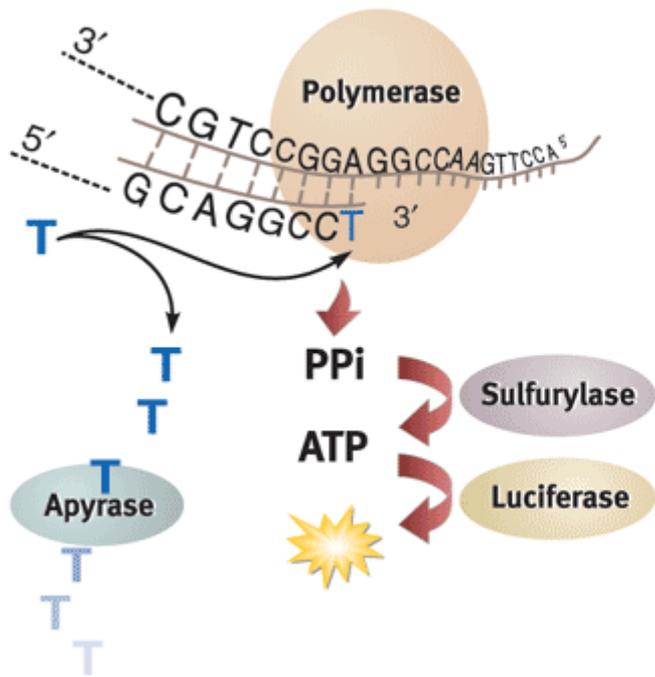
Pyrosequencing output



c)

?

Pyrosequencing output



c)

AGGCCCTTTGG