

Concetti fondamentali della reazione a catena della polimerasi (PCR) - II



Agenda

Concetti fondamentali
della PCR Parte I

Concetti fondamentali di biologia
molecolare

Definizione di PCR

Le fasi della PCR

**Concetti fondamentali
della PCR Parte II**

Definizione di PCR in tempo reale

PCR in tempo reale qualitativa

PCR in tempo reale quantitativa

Concetti fondamentali
della PCR Parte III

Definizione di melt temperature

Analisi della curva di fusione

PCR in tempo reale



PCR in tempo reale (RT-PCR)

- La PCR in tempo reale è una normale reazione di PCR in cui si utilizza un ulteriore oligonucleotide marcato con una molecola fluorescente che prende il nome di sonda.
- La sonda è un DNA a singolo filamento corrispondente a una sequenza bersaglio
- La sonda fluorescente emette un segnale fluorescente quando viene attivata dall'ibridazione
- Una copia di DNA bersaglio attiva una molecola di sonda, quindi il segnale fluorescente sarà direttamente proporzionale al numero di copie di DNA bersaglio generate
- Esempi di sonde utilizzate per la PCR in tempo reale: sonde TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion...

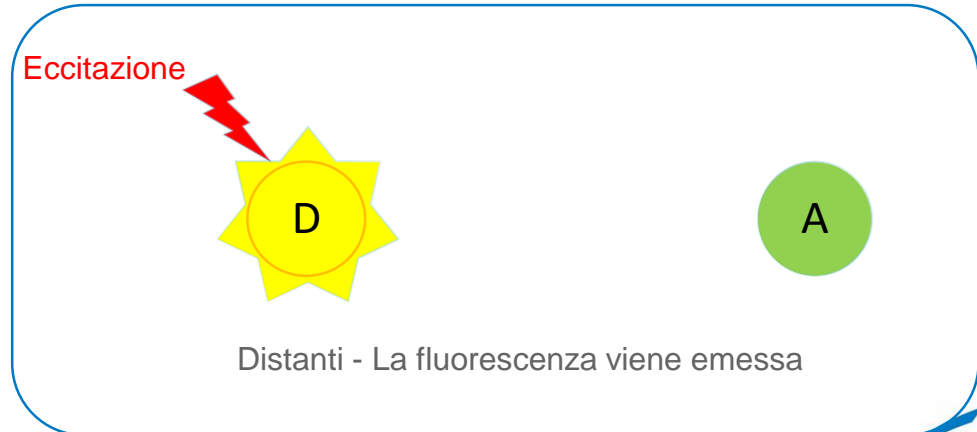
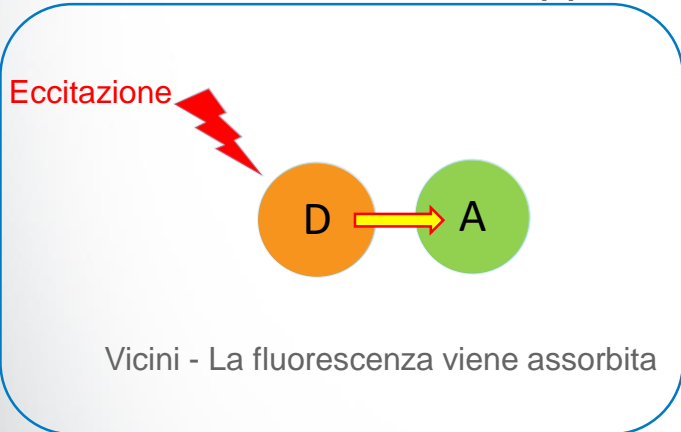


Sonda

Tecnologia FRET

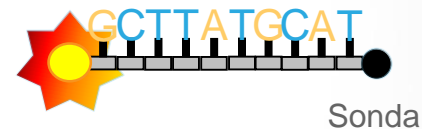
- Il trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) è un'interazione tra due molecole di colorante dipendente dalla distanza.
- L'energia di eccitazione viene trasferita da una molecola donatore a una molecola accettore senza emissione di un fotone.
- La FRET ha molte applicazioni, tra cui la PCR.

D = Donatore/Reporter
A = Accettore/Quencher



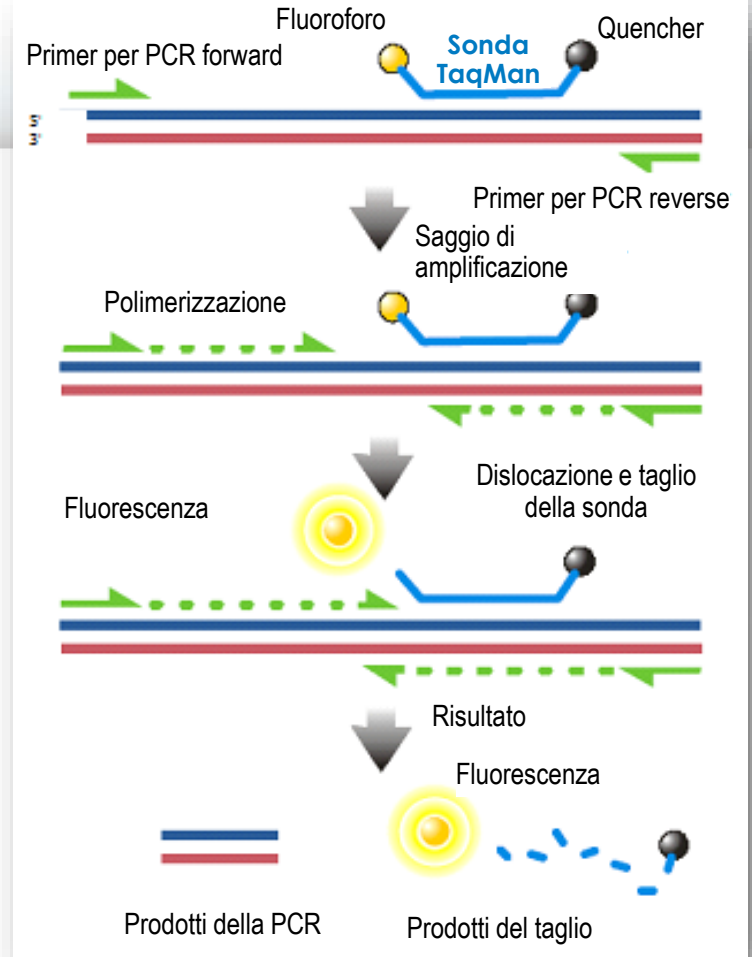
Sonda TaqMan

- La sonda TaqMan è una sonda a oligonucleotidi corti (da 15-30 basi) marcata con un colorante fluorescente all'estremità 5' e un quencher all'estremità 3'.
- Fino a quando il reporter e il quencher si trovano in stretta vicinanza, il quencher assorbe la fluorescenza dal reporter
- La sonda è progettata sulla sequenza di DNA in modo da appaiarsi al bersaglio
- Nella fase di estensione della PCR, la Taq polimerasi degrada la sonda
- In questo modo il reporter e il quencher si separano fisicamente, consentendo l'emissione e la misurazione della fluorescenza



1 fluoroforo
libero/amplicone di
DNA

Sonda TaqMan



Sonda TaqMan



Sonda TaqMan



Primer forward



Sonda TaqMan

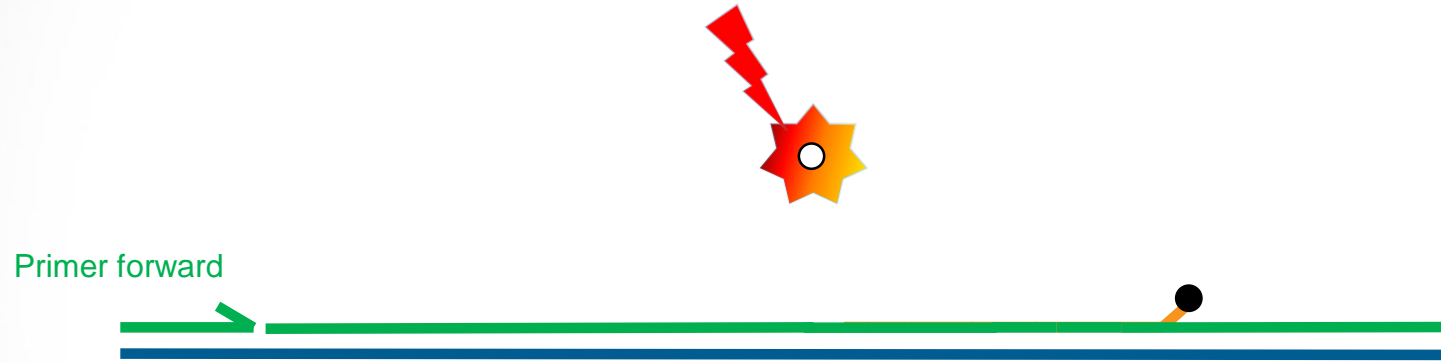
Primer forward

Reporter

Quencher



Sonda TaqMan



Sonda Molecular Beacon

- Una sonda Molecular Beacon è una molecola a forma di forcina, costituita da un fluoroforo (reporter) e da un quencher
- La sequenza della sonda è lunga all'incirca da 17 a 21 basi. La sequenza dello stem deve essere ricca di GC (>80% della sequenza totale) ai fini della formazione di un duplex stabile di lunghezza compresa fra 5 e 8 basi
- Quando sono libere in soluzione, le due estremità sono vicine tra loro e la fluorescenza si spegne
- In presenza di DNA bersaglio, la sonda si appaia al bersaglio e allontana il fluoroforo dal quencher, determinando l'emissione della fluorescenza

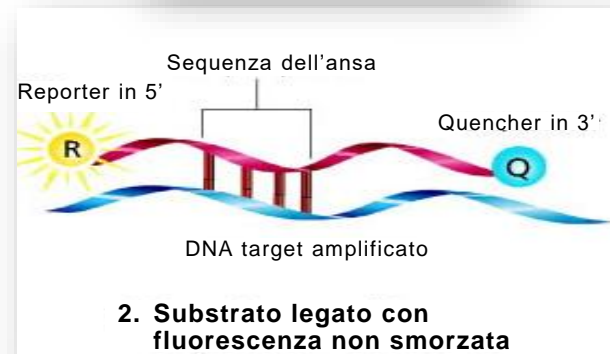
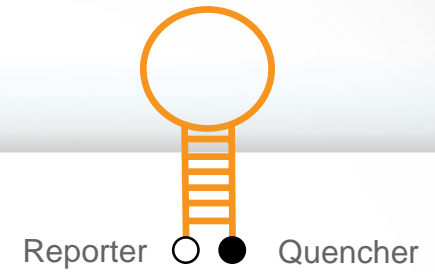


Immagine: Sigma-Aldrich

Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



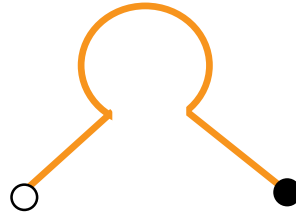
Sonda Molecular Beacon



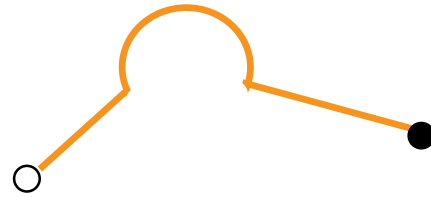
Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon

Primer forward



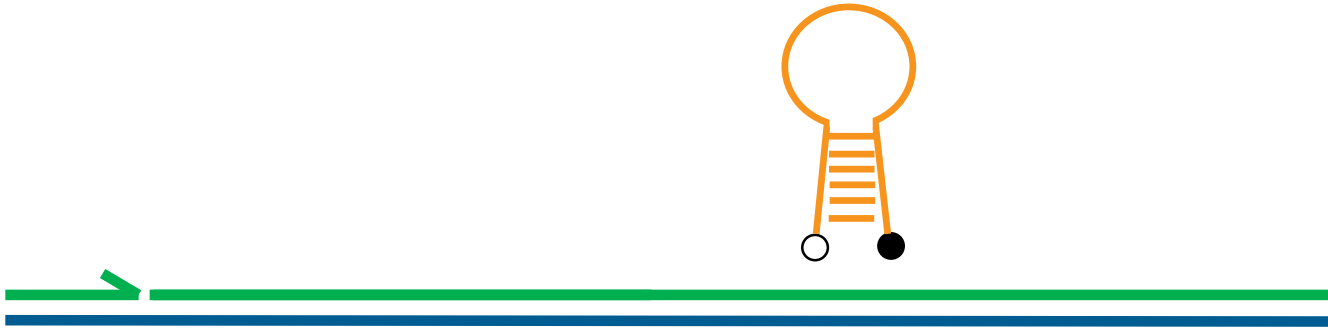
Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon

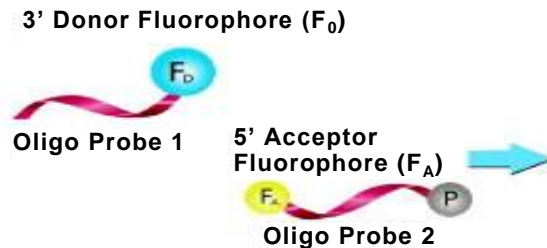


Sonda Molecular Beacon



Sonda FRET

- Le sonde FRET sono una coppia di oligonucleotidi con un fluoroforo donatore e un fluoroforo accettore
- Quando viene eccitato dallo strumento, il donatore trasferisce l'eccitazione all'accettore che a sua volta emette la fluorescenza. La fluorescenza viene rilevata dallo strumento
- Quando le sonde sono libere in soluzione, questo fenomeno non avviene perché le sonde non sono vicine tra loro
- Durante la fase di annealing della PCR, le sonde si appaiano in stretta vicinanza tra loro e ciò determina il trasferimento di energia, nonché l'emissione e la misurazione della fluorescenza



1. Probes in solution emit low fluorescence

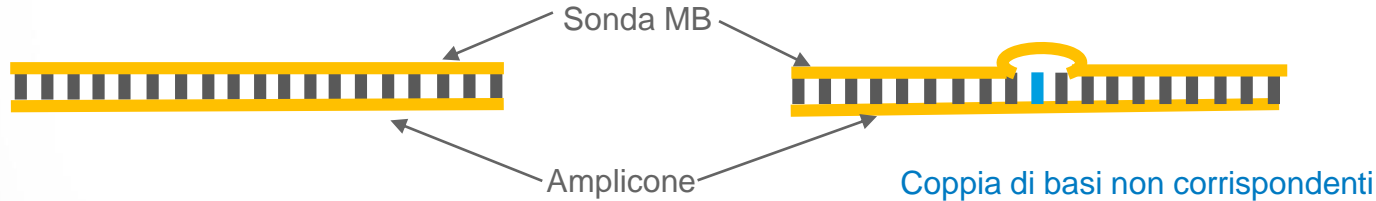


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

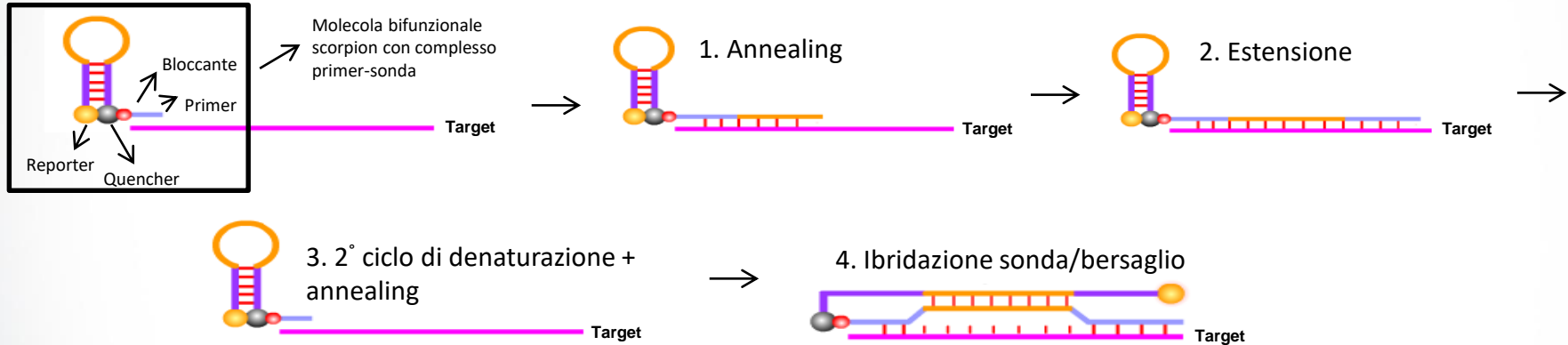
Imagine: Sigma-Aldrich

Faro molecolare “sloppy”

- I fari molecolari “sloppy” posseggono sequenze (da circa 30-40 basi) di sonde relativamente lunghe, che consentono loro di formare ibridi con gli ampliconi di molte specie differenti nonostante la presenza di **coppie di basi non corrispondenti**.



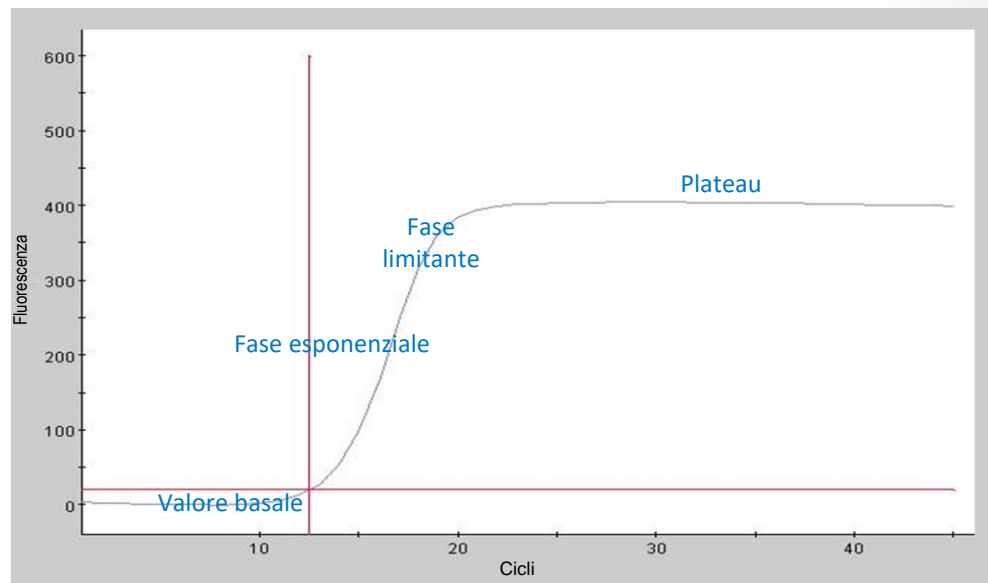
Sonda scorpion



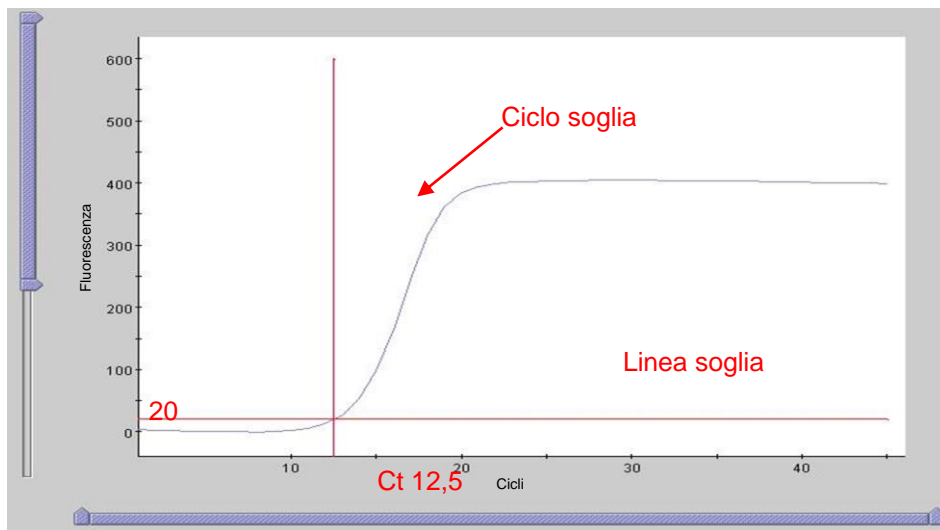
La sequenza della sonda deve essere lunga da 17 a 27 basi.

Variazioni di fluorescenza durante la PCR

- La curva di amplificazione comprende 4 fasi:



Definizione di Ct - basata sulla soglia



- Ciclo soglia (Ct): il primo ciclo che interseca la linea soglia in corrispondenza di un valore di fluorescenza definito
- Il valore di questo ciclo può essere frazionario

Criteri di convalida di una PCR: intervallo Ct e fluorescenza all'end-point

- Intervallo Ct
 - È l'intervallo accettabile per un valore Ct
 - È delimitato dai valori Ct_{\min} e Ct_{\max}
- Fluorescenza all'end-point
 - Il valore della fluorescenza al termine della PCR (Plateau)







Per quanto riguarda i test Xpert, la curva di amplificazione non è stata convalidata per valori al di fuori dell'intervallo, quindi per tali valori non può essere fornito un risultato

PCR multiplex

- La PCR multiplex è l'amplificazione simultanea di **più DNA bersaglio**
 - Ogni bersaglio ha il proprio set di primer
 - Ogni bersaglio viene rilevato o quantificato attraverso la relativa sonda marcata con un diverso colorante, che a sua volta viene rilevato ad una specifica lunghezza d'onda della fluorescenza
- Quando si progetta una PCR multiplex, è necessario evitare la competizione tra i bersagli

Rilevamento di più coloranti: 6 coloranti fino al 2020

- Si selezionano diversi coloranti (reporter)
- Vengono eccitati ed emettono a lunghezze d'onda diverse

Analita	Reporter	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Bersaglio 1	Colorante 1	375-405	420-480 
Bersaglio 2	Colorante 2	450-495	510-535 
Bersaglio 3	Colorante 3	500-550	565-590 
Bersaglio 4	Colorante 4	630-650	665-685 
SPC	Colorante 6		> 700 
Bersaglio 5	Colorante 5	565-590	606-650 

Rilevamento di più coloranti: oggi 10 coloranti

- Si selezionano diversi coloranti (reporter)
- Vengono eccitati ed emettono a lunghezze d'onda diverse

		Rilevamento iCore			
Canali ottici iCore		Blu + IR (420-477 nm + > 700 nm)	Verde + rosso intenso (510-535 nm + 660-680 nm)	Giallo (565-585 nm)	Rosso (620-645 nm)
Eccitazione iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Blu (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Verde (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Giallo (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Rosso (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

Quantificazione mediante PCR in tempo reale

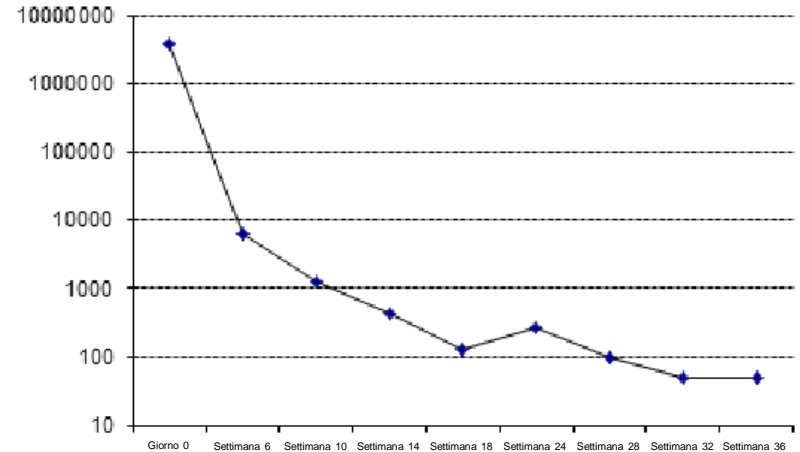


Quantificazione

- Quantificazione assoluta: il risultato viene indicato sotto forma di concentrazione (copie/mL, UI/mL ecc.):

Xpert HIV-1 VL ed Xpert HCV

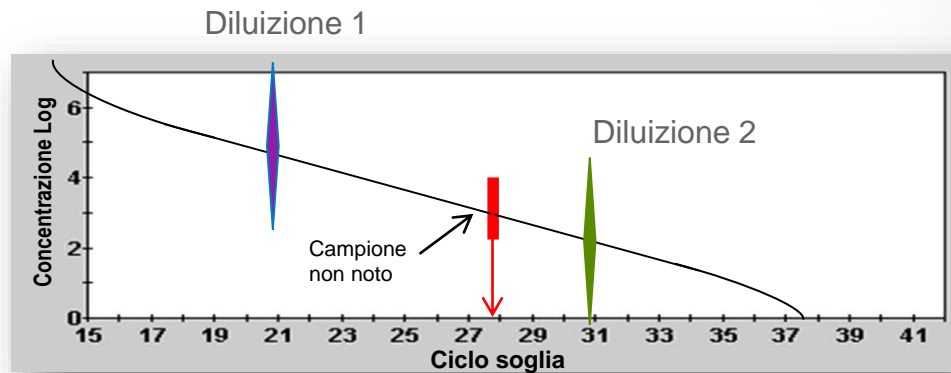
- Quantificazione relativa: il risultato viene indicato sotto forma di rapporto: Xpert BCR-ABL



Riduzione della carica virale dell'HIV-1 VL all'ART (metodo diverso dal GeneXpert).
Grafica: hivbook.com

Quantificazione assoluta con standard esterni

1. Preparare le diluizioni di un campione contenente il DNA bersaglio a concentrazione nota.
2. Queste diluizioni verranno utilizzate nella stessa sessione insieme al campione non noto, ciascuna in una provetta separata
3. Per ciascuna diluizione viene riportato il Ct
4. Si disegna la curva standard: Ct rispetto a concentrazione
5. Il Ct del campione non noto viene utilizzato per estrapolare la concentrazione del campione dalla curva standard



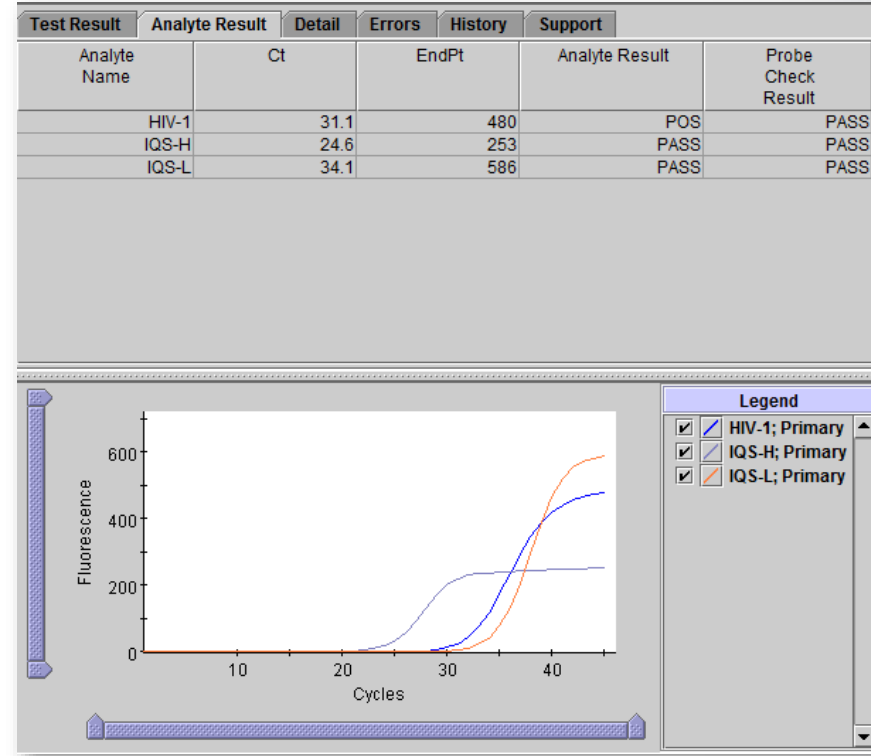
Nell'intervallo lineare della concentrazione sono sufficienti 2 standard

Quantificazione assoluta con standard interni

Per Xpert HIV-1 VL

Per calcolare la concentrazione del campione si utilizzano 2 standard:

- 1 standard ad alta concentrazione (IQS-H) = 10^6 copie/mL
- 1 standard a bassa concentrazione (IQS-L) = 10^3 copie/mL
- Il software GeneXpert calcolerà la concentrazione del campione non noto in base ai Ct e alla concentrazione nota di ciascuno standard e al Ct del campione non noto.



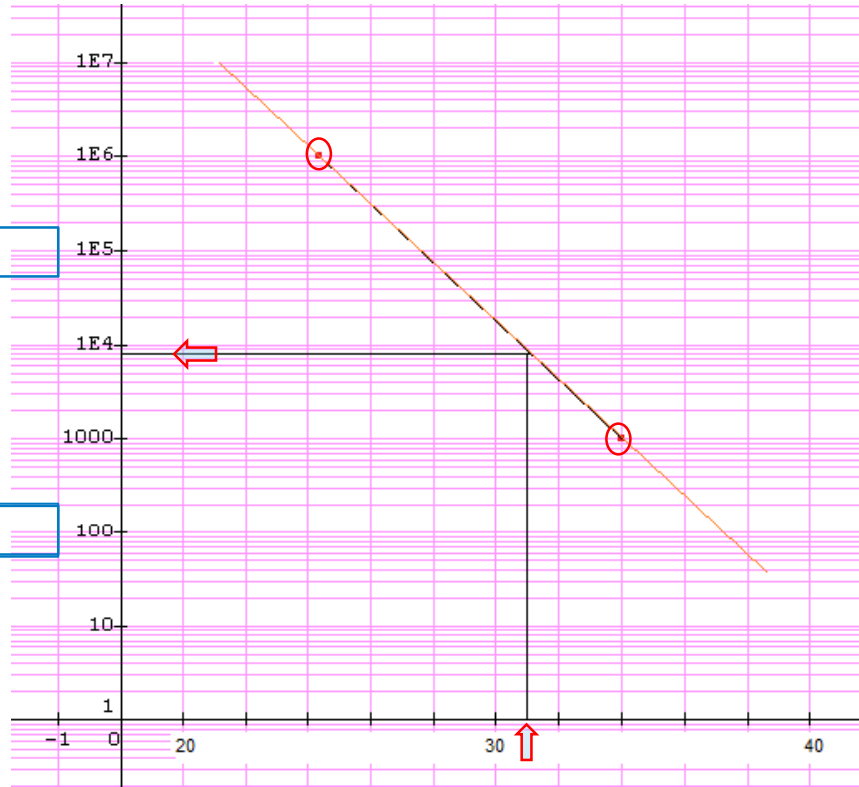
Calcolo della concentrazione del campione

$y = \text{carica virale}$
(copie/mL)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

IQS-H

IQS-L

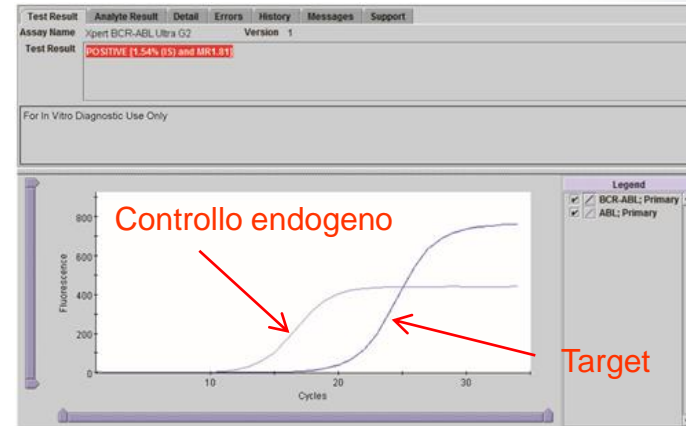


$x = Ct$

Quantificazione relativa con PCR in tempo reale

(Es.: Xpert BCR-ABL)

- La quantificazione relativa misura il livello di un bersaglio e lo esprime rispetto al livello di un controllo interno (gene di riferimento)
- Il gene di riferimento può essere endogeno e in quanto tale può garantire anche che la quantità di campione utilizzata nel test sia sufficiente.
- Il controllo endogeno, grazie alla sua bassa variabilità, può anche essere utilizzato per indicare l'inibizione della PCR.



Esempio di risultato del test Xpert BCR-ABL Ultra

Conclusione

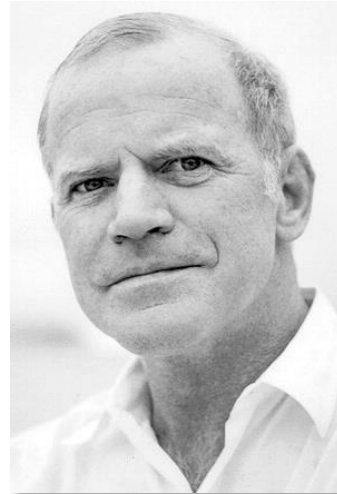
La RT-PCR ha le seguenti caratteristiche:

- Rapidità
- Sensibile
- Precisione
- Facilità di esecuzione
- Può essere quantitativa

“

Ogni anno la scienza produce sistematicamente una nuova moltitudine di fatti straordinari e dispositivi sorprendenti.

Kary Mullis





Grazie.



www.Cepheid.com