

# **TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

## **LA REAZIONE POLIMERASICA A CATENA** Principi teorici e aspetti pratici

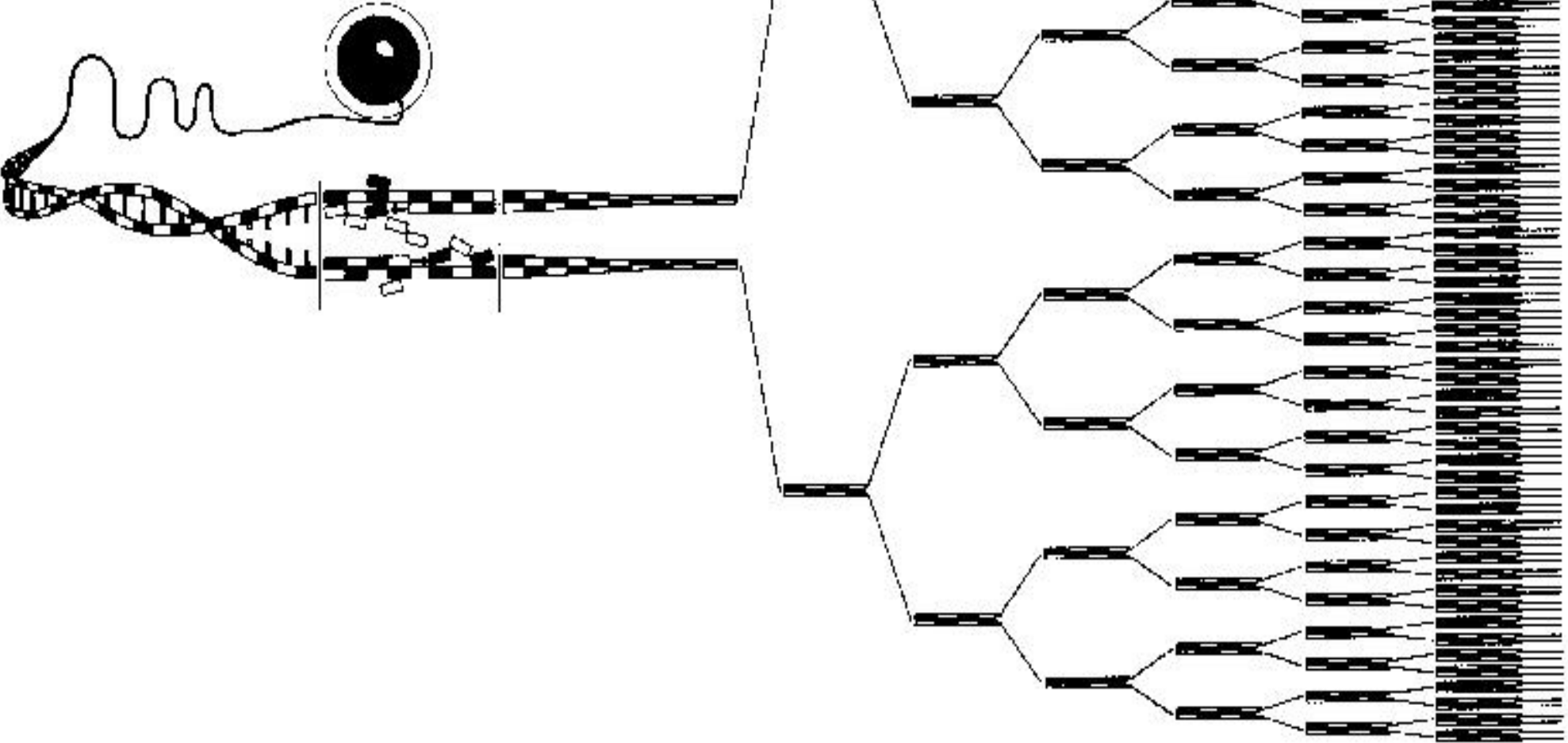
# Tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi o PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Introdotta da Kary Mullis alla metà degli anni '80

- Consente di amplificare esponenzialmente *in vitro* una sequenza specifica di DNA
- Questa sequenza può essere rappresentata da un qualsiasi gene di interesse o da una regione non codificante di DNA
- Il materiale di partenza per la PCR è il DNA che contiene la sequenza che si vuole amplificare
- E' necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione

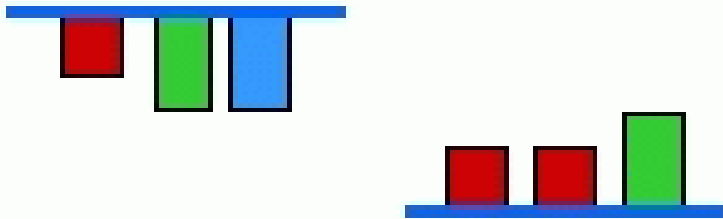


**POLYMERASE CHAIN REACTION  
(PCR)**



**1955 A. Kronembreg e coll. (Stanford University)  
scoprono la DNA-polimerasi cellulare**

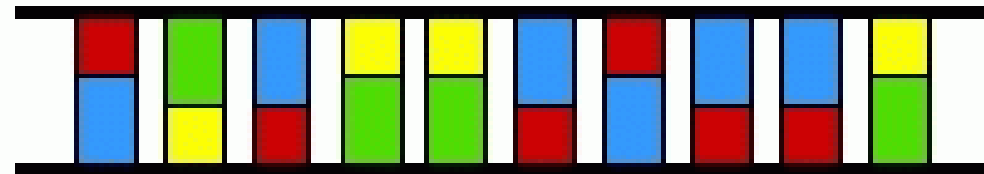
**primers**



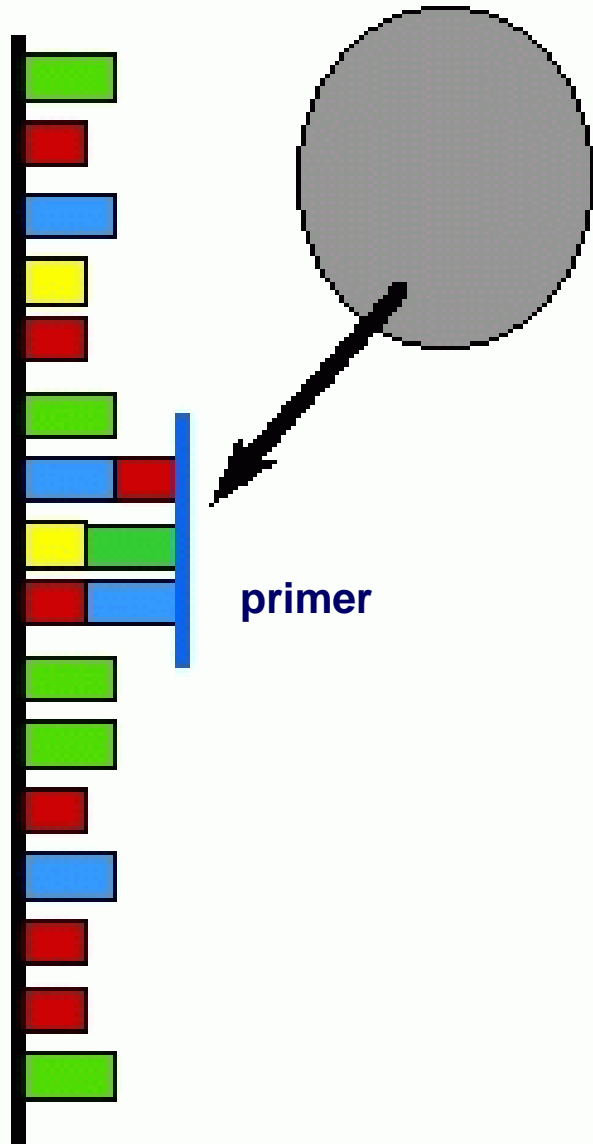
**DNA polimerasi**



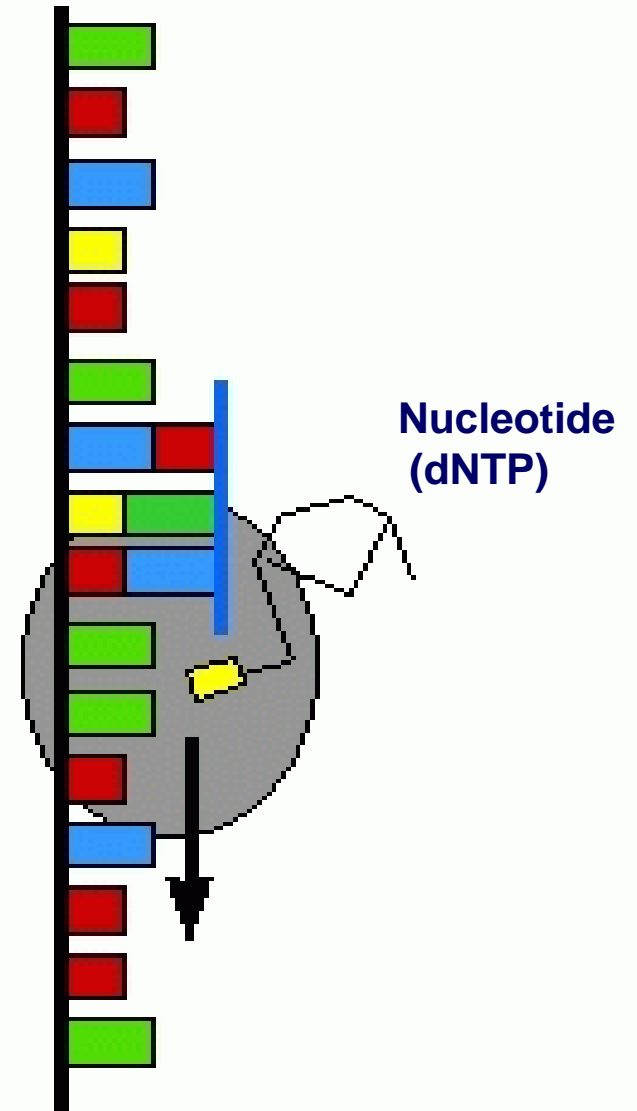
**DNA genomico**



# DNA polimerasi

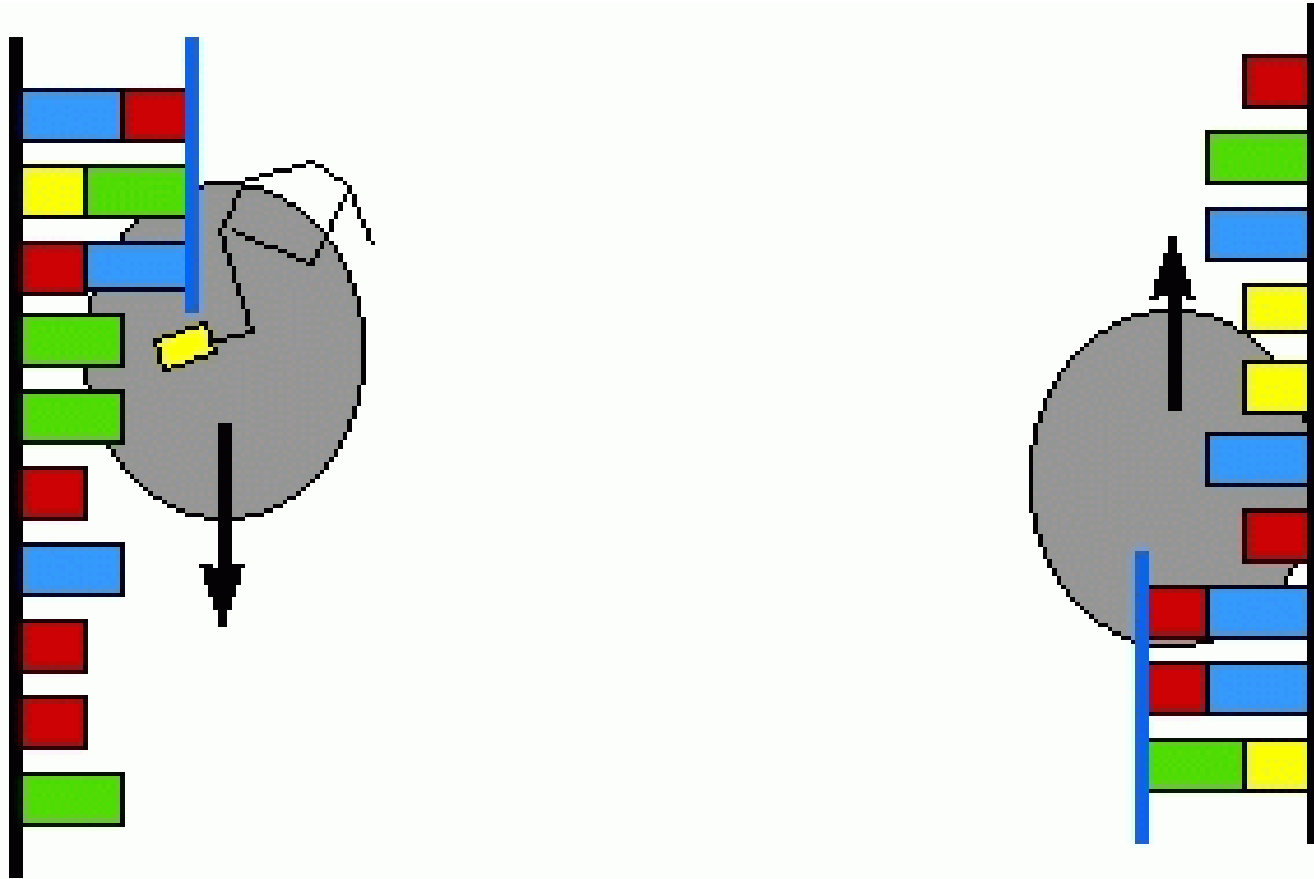


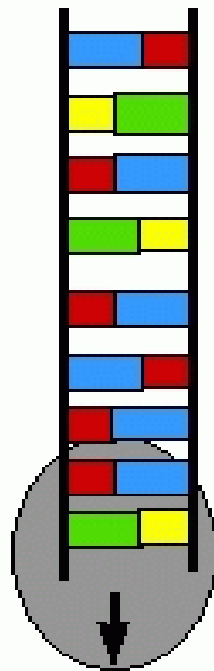
primer



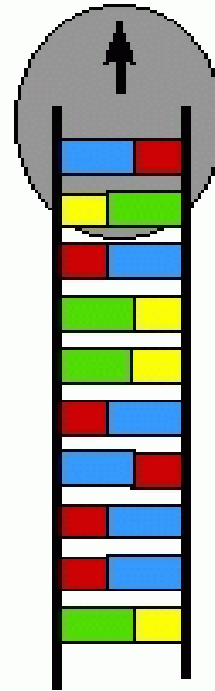
Nucleotide  
(dNTP)

## Scorrimento in direzione 5' – 3'



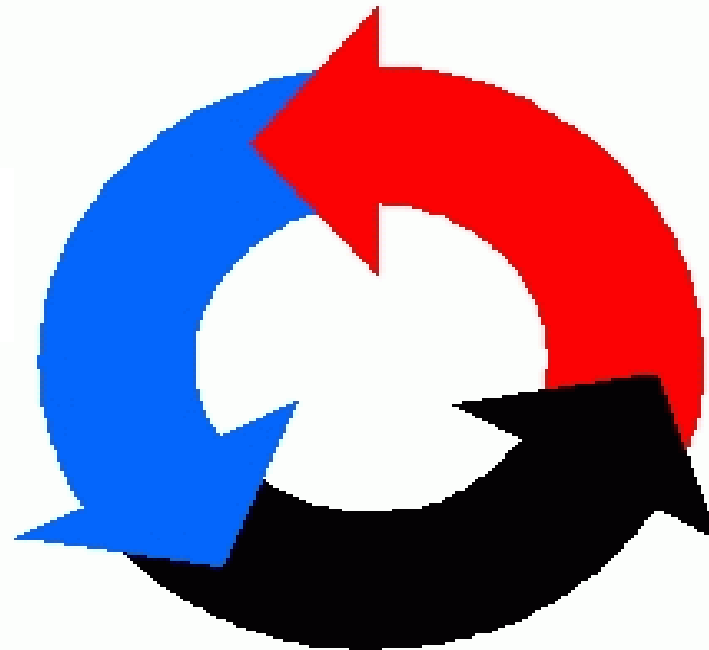


↑



**Nel 1983 K.B. Mullis utilizzò la DNA polimerasi in una  
reazione di polimerizzazione ciclica: la PCR**

**LEGAME DEI  
PRIMERS DI  
INNESCO**



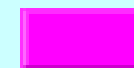
**APERTURA  
DOPPIA ELICA  
DEL DNA**

**DUPLICAZIONE  
DEL DNA  
STAMPO**



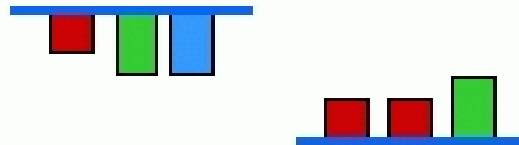
La PCR sfrutta alcune peculiarità della duplicazione del DNA ad opera della DNA polimerasi:

- 1) Necessità di un DNA a filamento singolo come stampo per la sintesi di un filamento complementare.
- 2) Necessità di un piccolo DNA innesco per iniziare la sintesi.
- 3) Sintesi del DNA solo in direzione 5' → 3'.



# ELEMENTI NECESSARI PER LA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

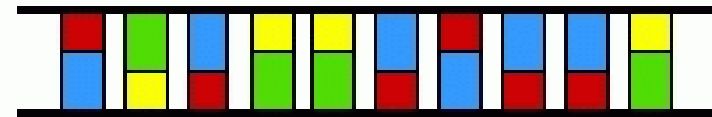
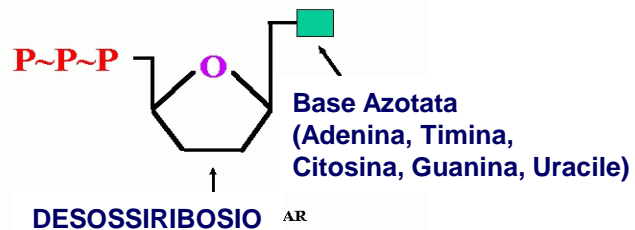
## Primers



## DNA polimerasi



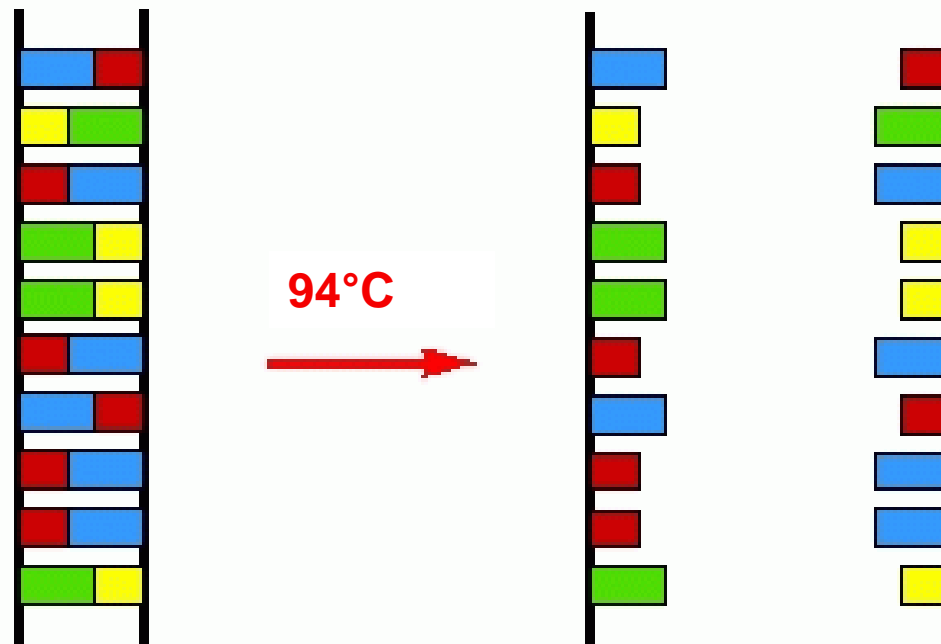
## Desossi Nucleotidi trifosfati (dNTP)



## DNA STAMPO

## fase 1: DENATURAZIONE

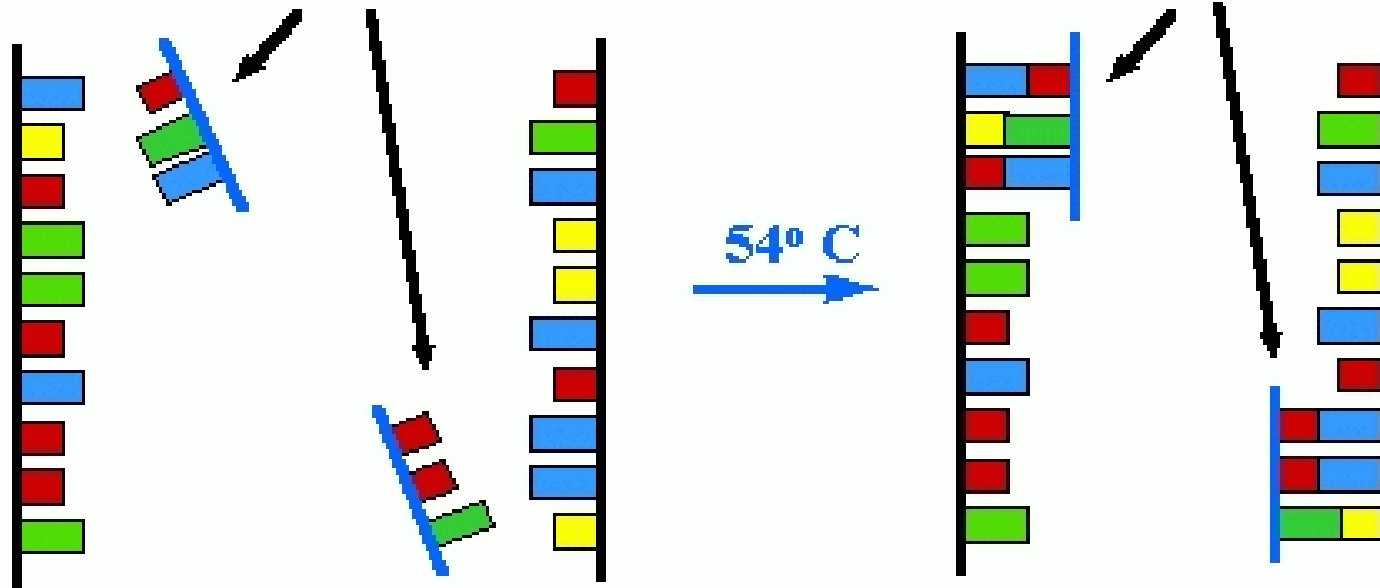
La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



fase 2:

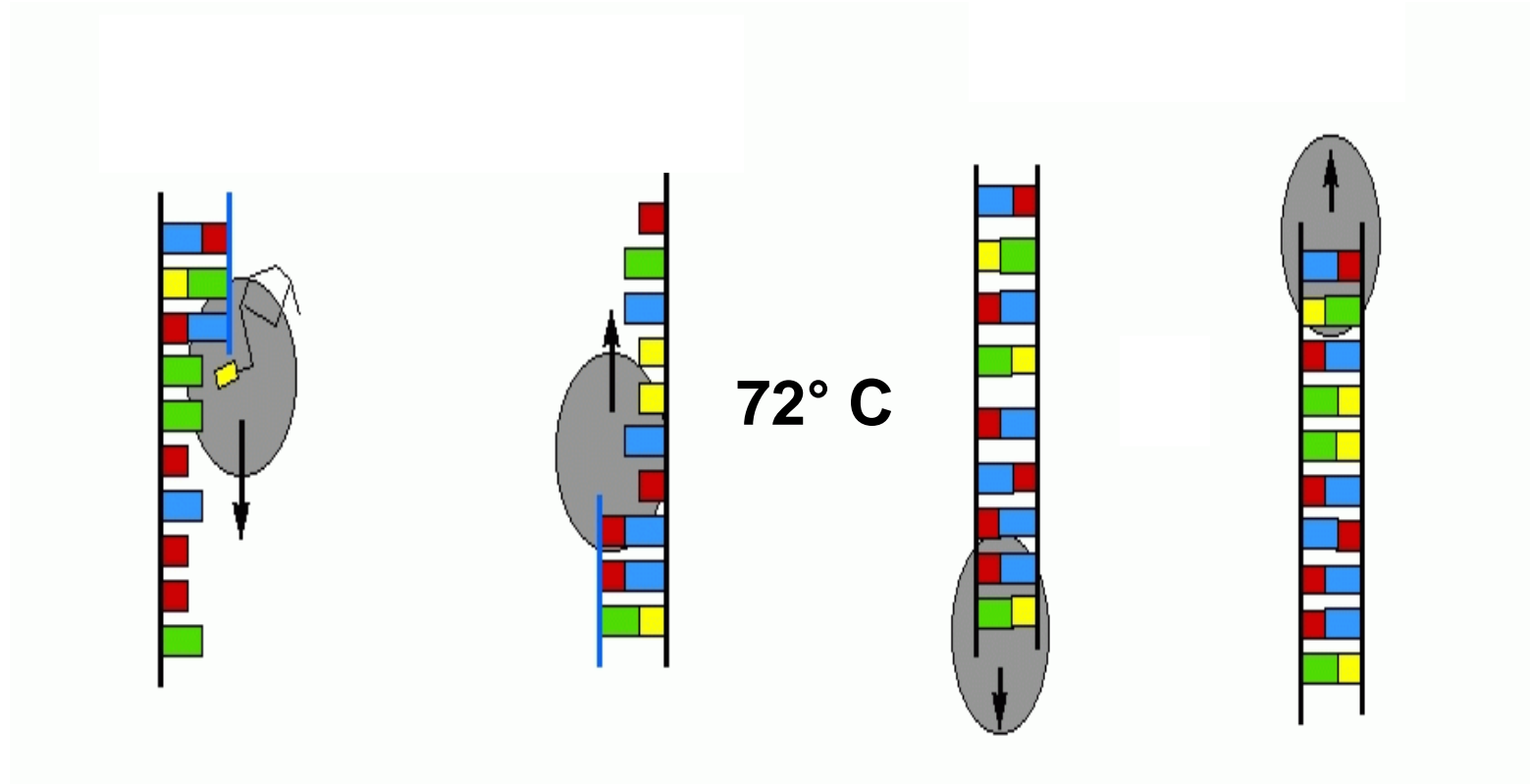
## ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

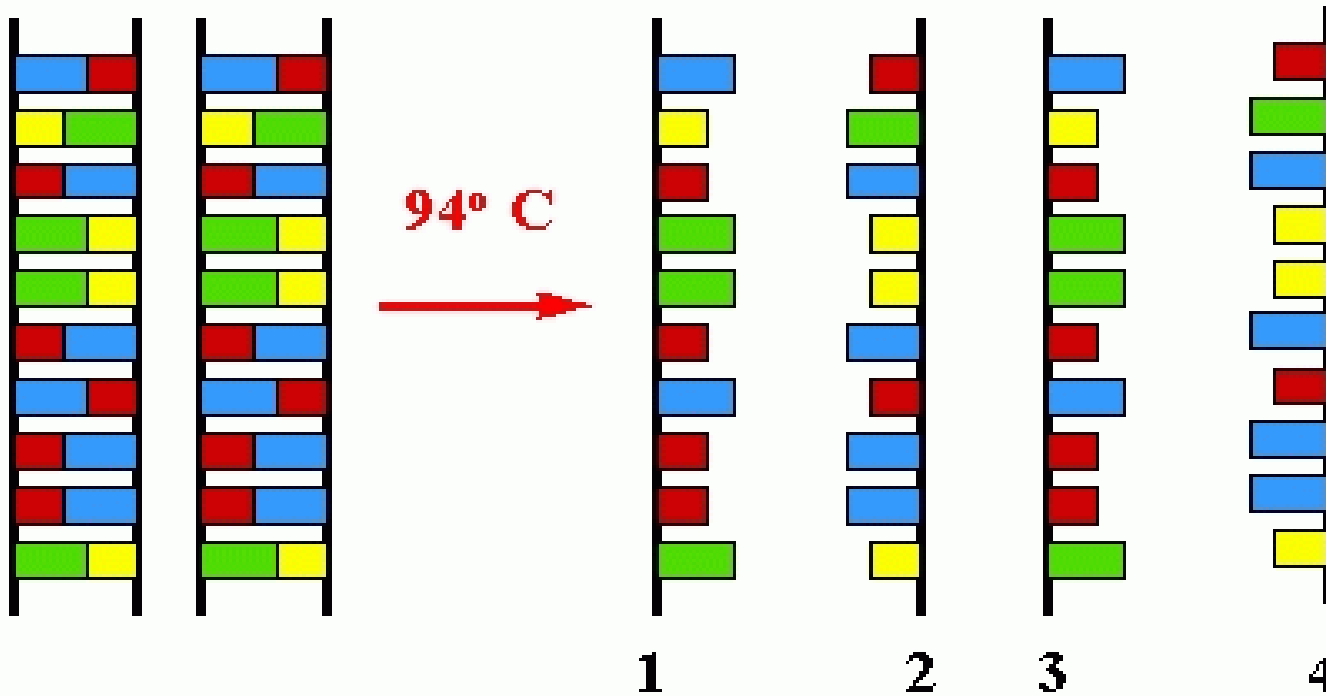


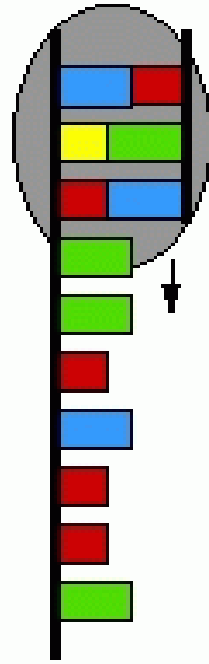
### fase 3: ESTENSIONE

La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA

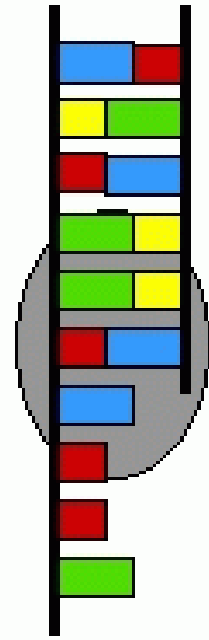


## IL PROCESSO SI RIPETE

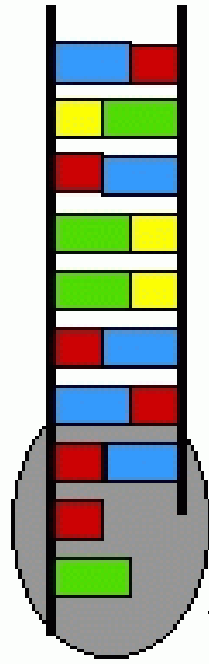




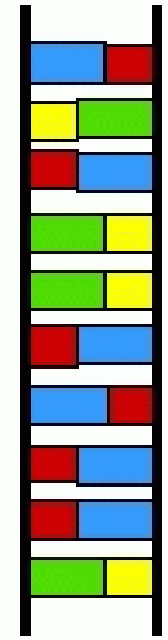
**1**



**2**



**3**



**4**

## Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA “copiato” raddoppia

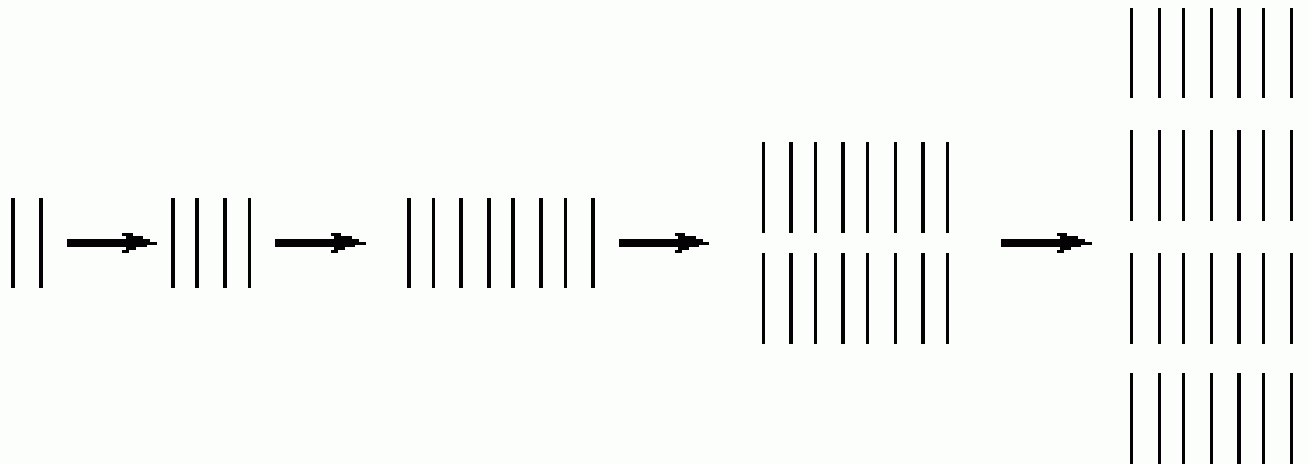
1

2

3

4

5

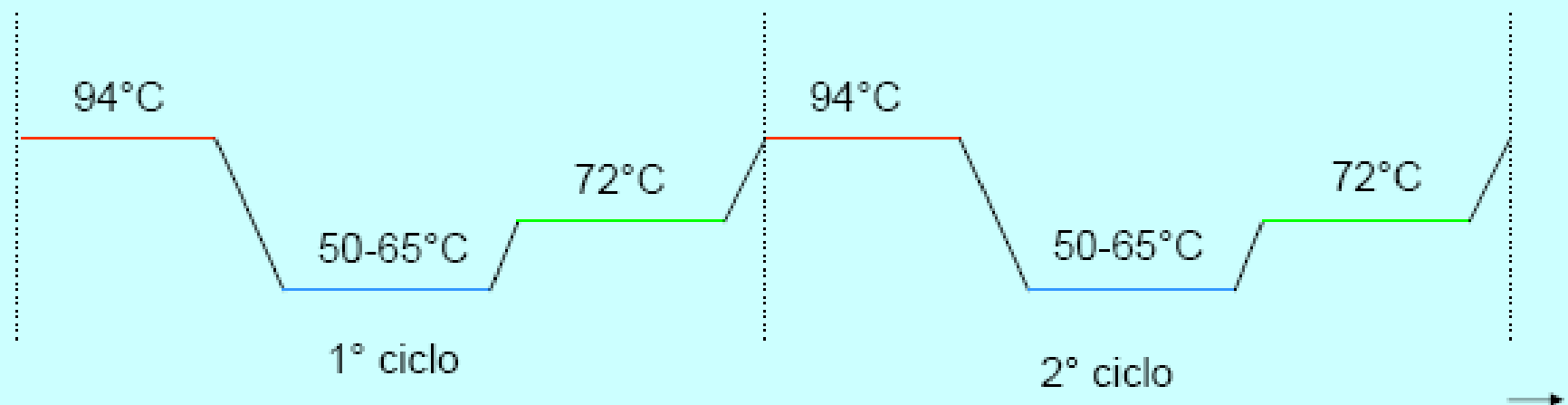


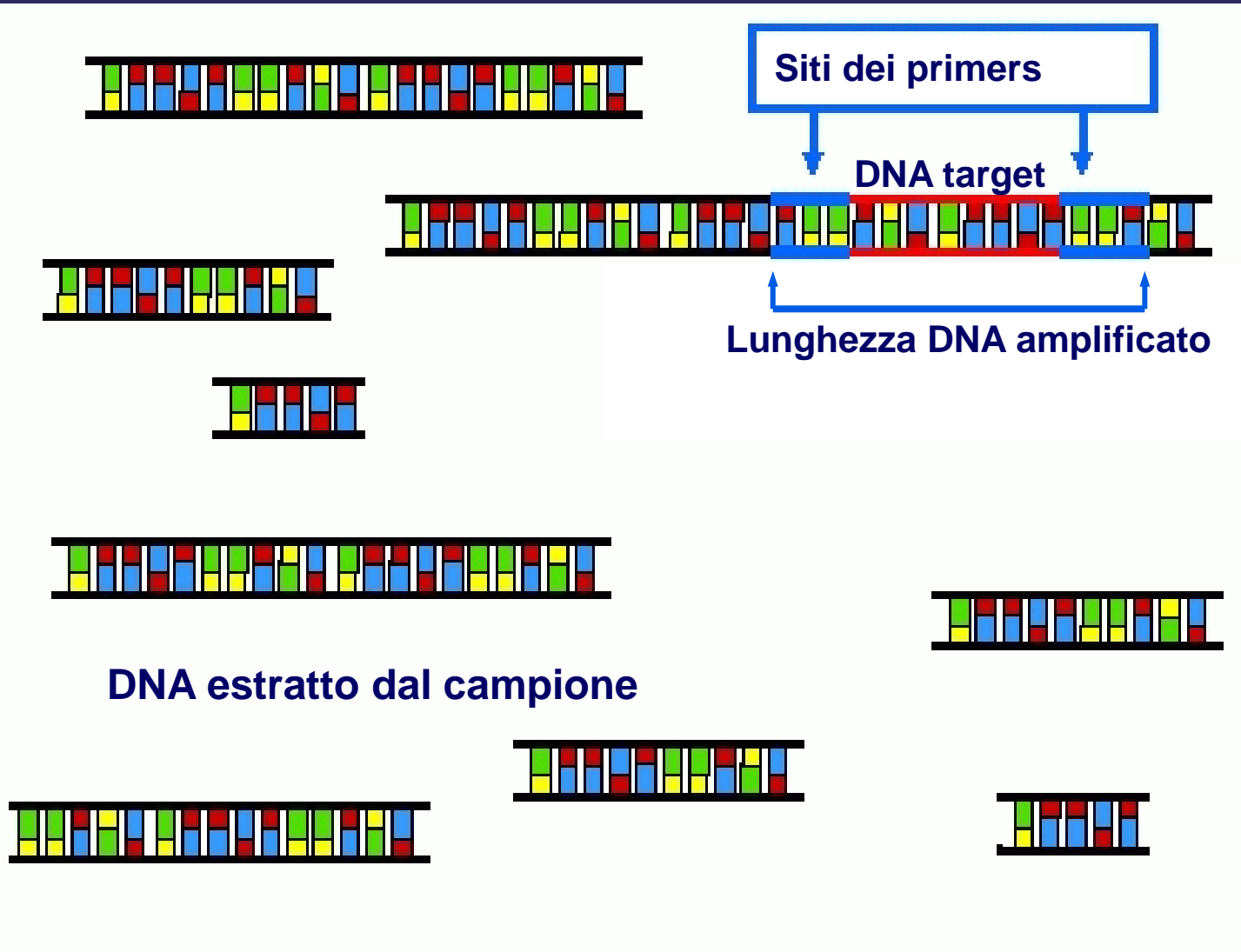


## Un tipico ciclo di PCR:



- **Denaturazione** al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato (circa 95°C)
- **Appaiamento** (annealing) di coppie di primer (50-65°C)
- **Estensione** da parte di DNAPol termoresistente a partire dai primer (72°C)





# Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

---

Numero di cicli	Numero di molecole di amplificati
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824

$$Y = N2^n$$

Y= numero molecole di DNA  
amplificato  
N= numero molecole di DNA  
di partenza  
n= numero dei cicli di PCR

# LA FORMULA DELLA PCR

---

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

Y = resa di amplificazione

N = numero di molecole di DNA di partenza

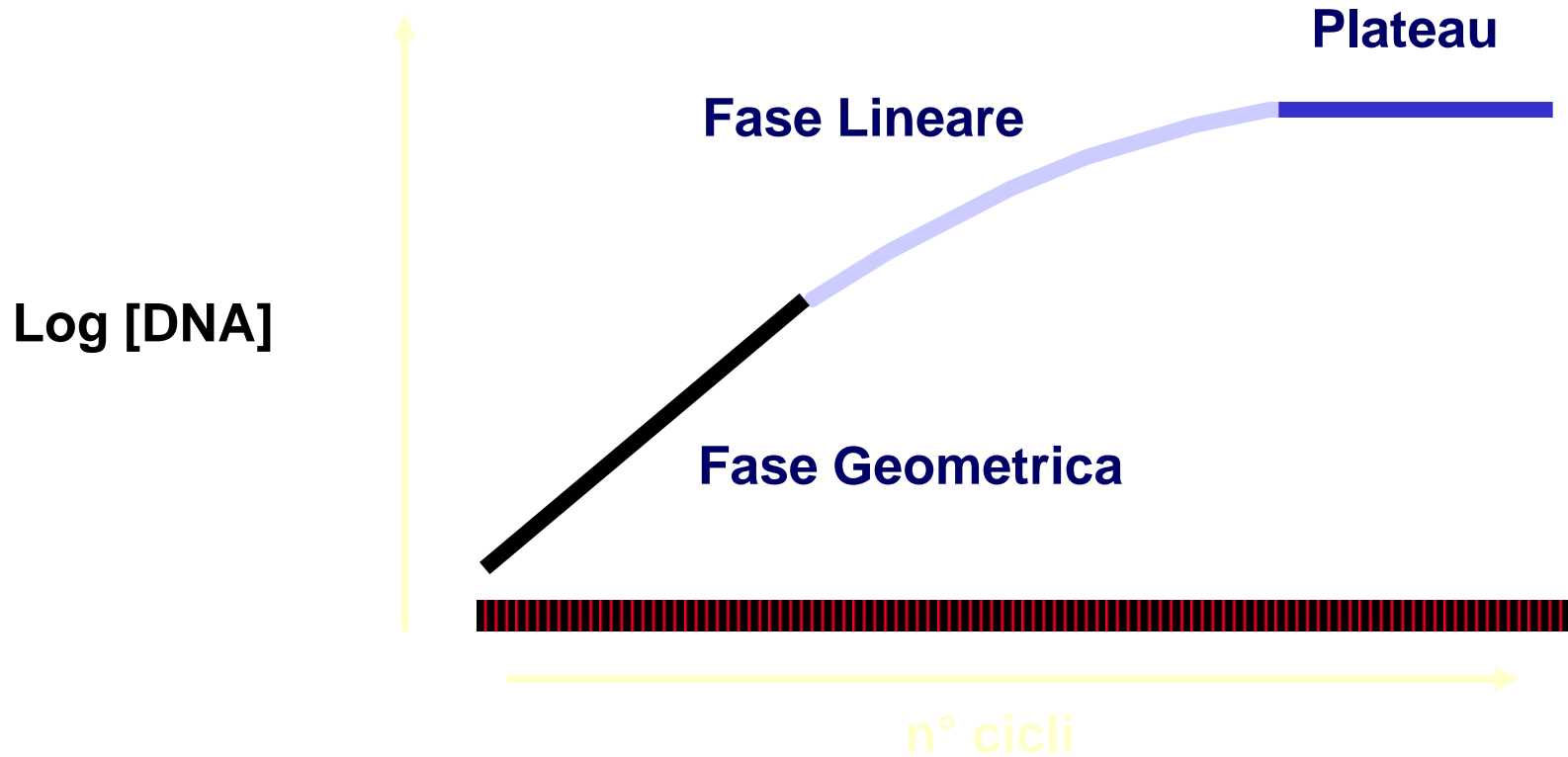
E = efficienza di reazione

n = numero di cicli di amplificazione

efficienza media	resa finale (20 Cicli)	% teorica max
100	1.048.576	100
95	631.964	60
90	375.900	36
85	220.513	21

# LA REAZIONE DI PCR

---



# CAUSE DELL'EFFETTO PLATEAU

---

- Competizione tra il prodotto dei cicli precedenti e i primers per l'ibridazione
- Inattivazione termica dell'enzima
- Riduzione del rapporto molare tra le concentrazioni della DNA-polimerasi e del DNA
- Riduzione progressiva dell'efficienza di denaturazione e/o di ibridazione
- Distruzione degli amplificati per l'attività esonucleasica 5'→3' della polimerasi
- Accumulo di pirofosfati (inibitori della polimerasi)
- Progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione (?)

# PRINCIPALI FATTORI CHE INFLUENZANO LA RESA DELLA PCR

---

<b>Specificità</b>	Scelta dei primers Condizioni di reazione Contaminazione
<b>Sensibilità</b>	Scelta dei primers Eterogeneità genomica Presenza di inibitori Tipo di campione Efficienza della reazione
<b>Riproducibilità</b>	Standardizzazione delle fasi del metodo: <ul style="list-style-type: none"><li>➤ preparazione del campione</li><li>➤ protocollo di PCR</li><li>➤ sistema di rivelazione</li></ul>

# PCR: PARAMETRI DI OTTIMIZZAZIONE

---

- Acido Nucleico TARGET
- Disegno dei Primers
- Temperatura di Annealing
- Concentrazione di Mg<sup>++</sup>
- Concentrazione di dNTPs
- Qualità e quantità di Enzima
- Forza Ionica del tampone
- Presenza di Cosolventi
- Parametri dei Cicli
- Numero di Cicli



# I REAGENTI DELLA REAZIONE DI PCR

---

# DNA TARGET

---

## NATURA:

- Omogeneo (plasmide purificato): ogni molecola è identica e rappresenta la sequenza da amplificare
- Eterogeneo (mix di diverse molecole di DNA, come il DNA genomico, sospensione cellulari o materiale biologico)

Purezza: intesa come assenza di componenti che diminuiscono l'efficienza della PCR

# DNA TARGET

---

## Inibitori della PCR

- Troppo DNA
- Troppo RNA
- Presenza di emoglobina
- Eparina
- Ioni metallici
- SDS
- Composti Aromatici
- Etanolo
- Urea
- Detergenti
- **Ecc.**

# DNA TARGET:

---

## QUANTITA' OTTIMALE

**0.1 a 1-2 ug di DNA genomico  
Per reazione di PCR**

Il DNA umano è costituito da circa  $3.3 \times 10^9$  bp, (1bp= 650 dalton)

Il DNA contenuto in una cellula pesa circa  $6.6 \times 10^{-6}$  ug

1 ug di DNA genomico corrisponde a circa  $5 \times 10^{-7}$  pmoli

Circa 150.000 cellule umane contengono 1 ug di DNA

3 pg di DNA genomico contengono 1 copia di ogni gene umano

# OLIGONUCLEOTIDI O PRIMERS

---

## ➤ SPECIFICI

## ➤ UNIVERSALI

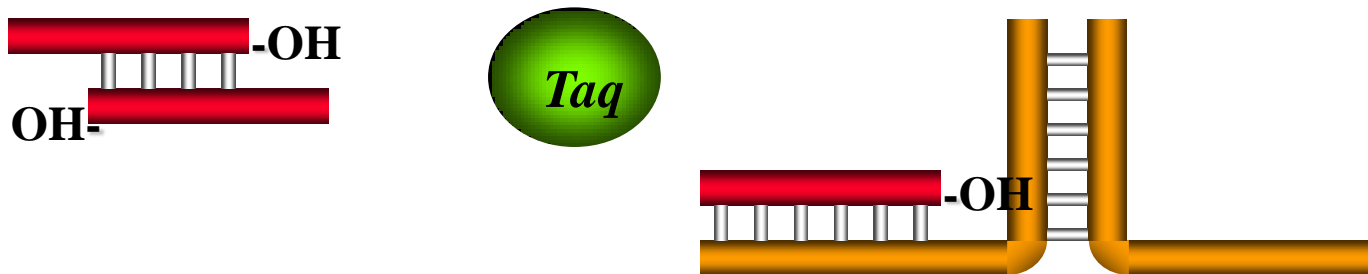
## ➤ DEGENERATI

- Estrema cura nella scelta della regione da amplificare
- Estrema purezza
- Lunghezza: 20-30 paia di basi (non meno di 16 bp)
- Equilibrato rapporto AT/GC
- Tm comprese tra 45-68° C
- Tm simili (+/- 2 C)

# DISEGNO DEI PRIMERS

---

- Evitare sequenze inusuali come serie di purine o pirimidine
- Evitare sequenze palindromiche che provocano strutture secondarie (loop).
- Le estremità 3' non devono essere tra loro complementari: formazione dei "primers-dimeri"

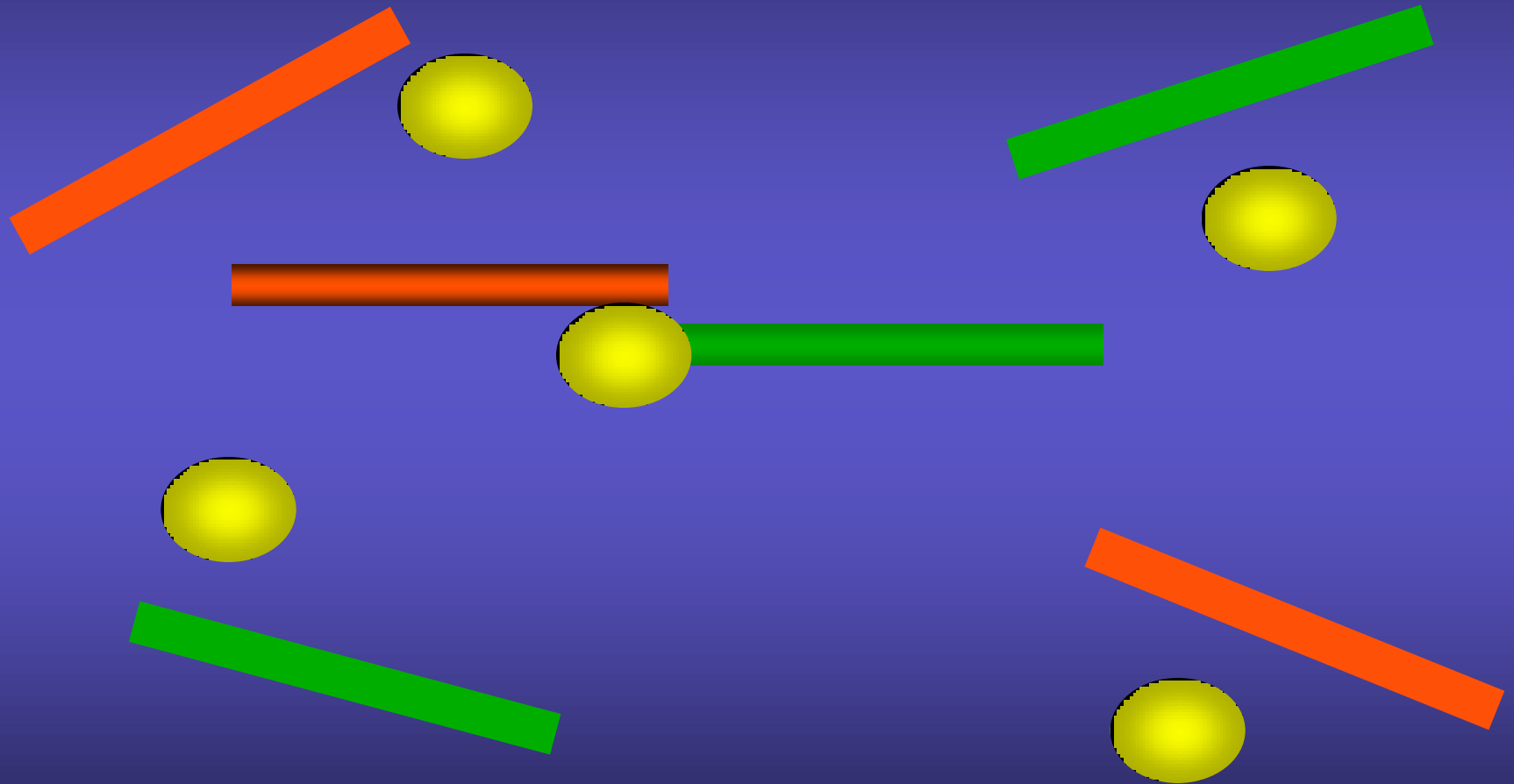


La concentrazione utilizzata è:  
0.2-1 mM (20-100 pmoli/reazione)

**PROVARE EMPIRICAMENTE IN FASE DI OTTIMIZZAZIONE**

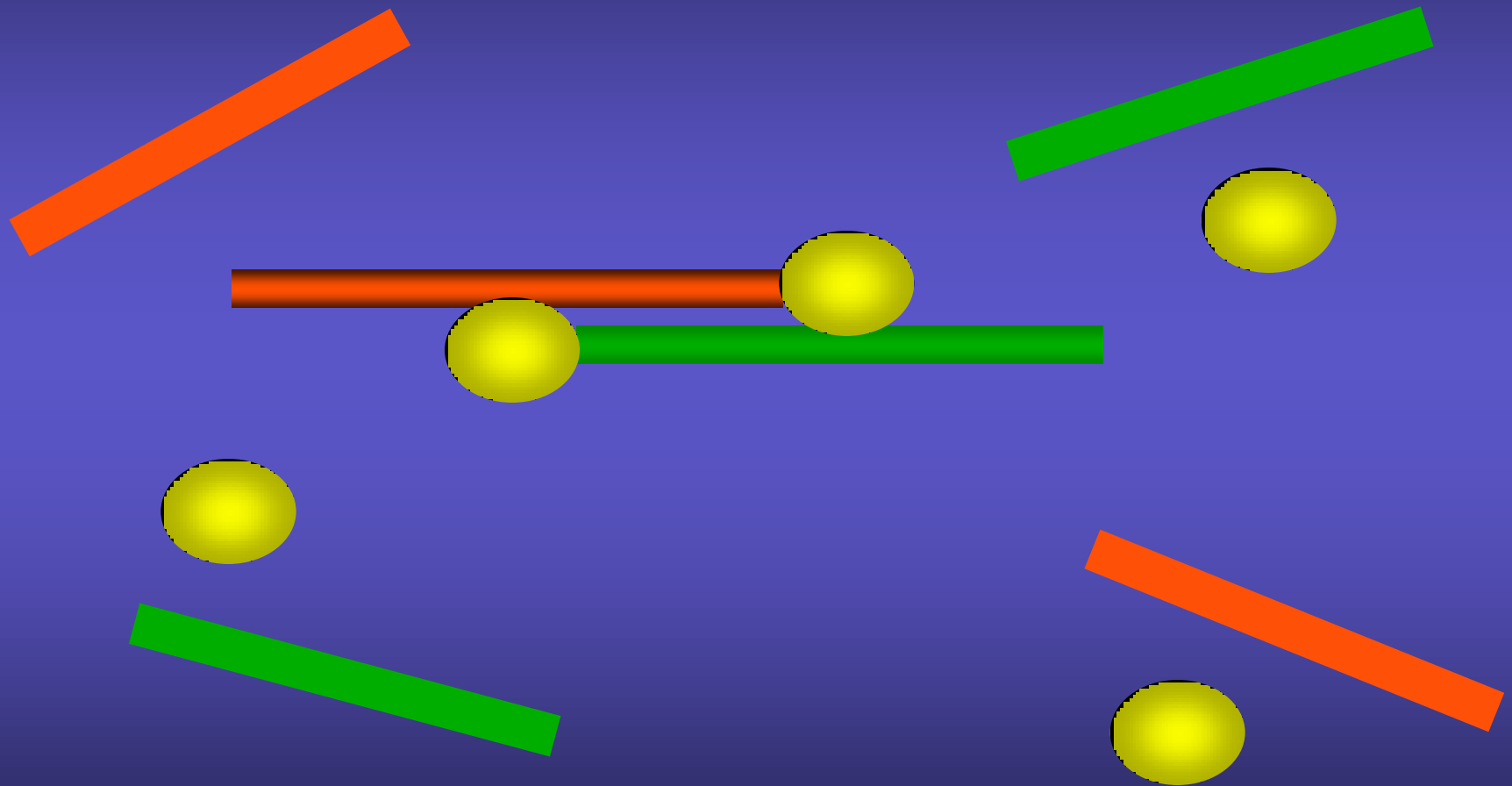
# FORMAZIONE DEI "PRIMERS-DIMERI"

---



# FORMAZIONE DEI "PRIMERS-DIMERI"

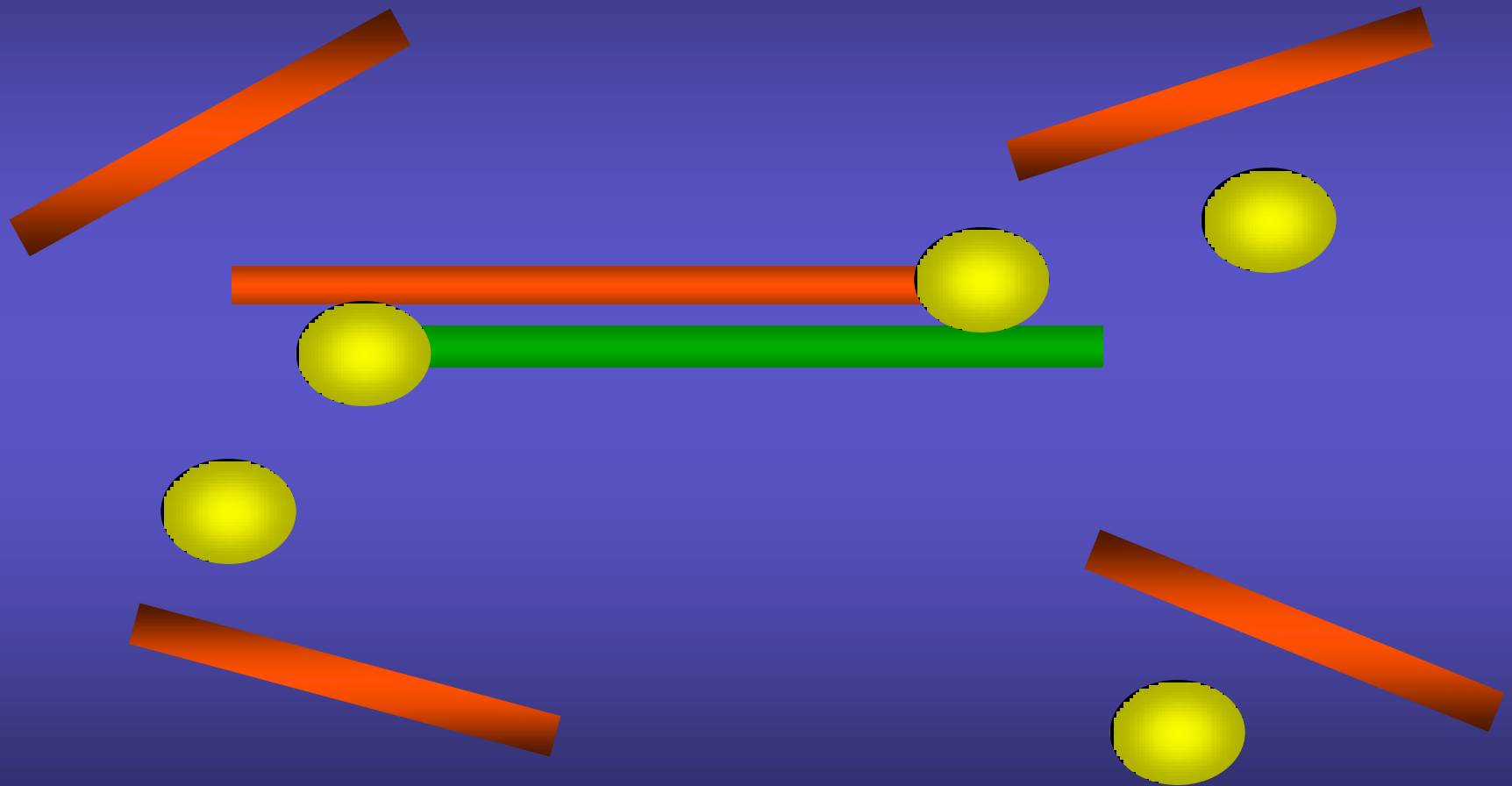
---





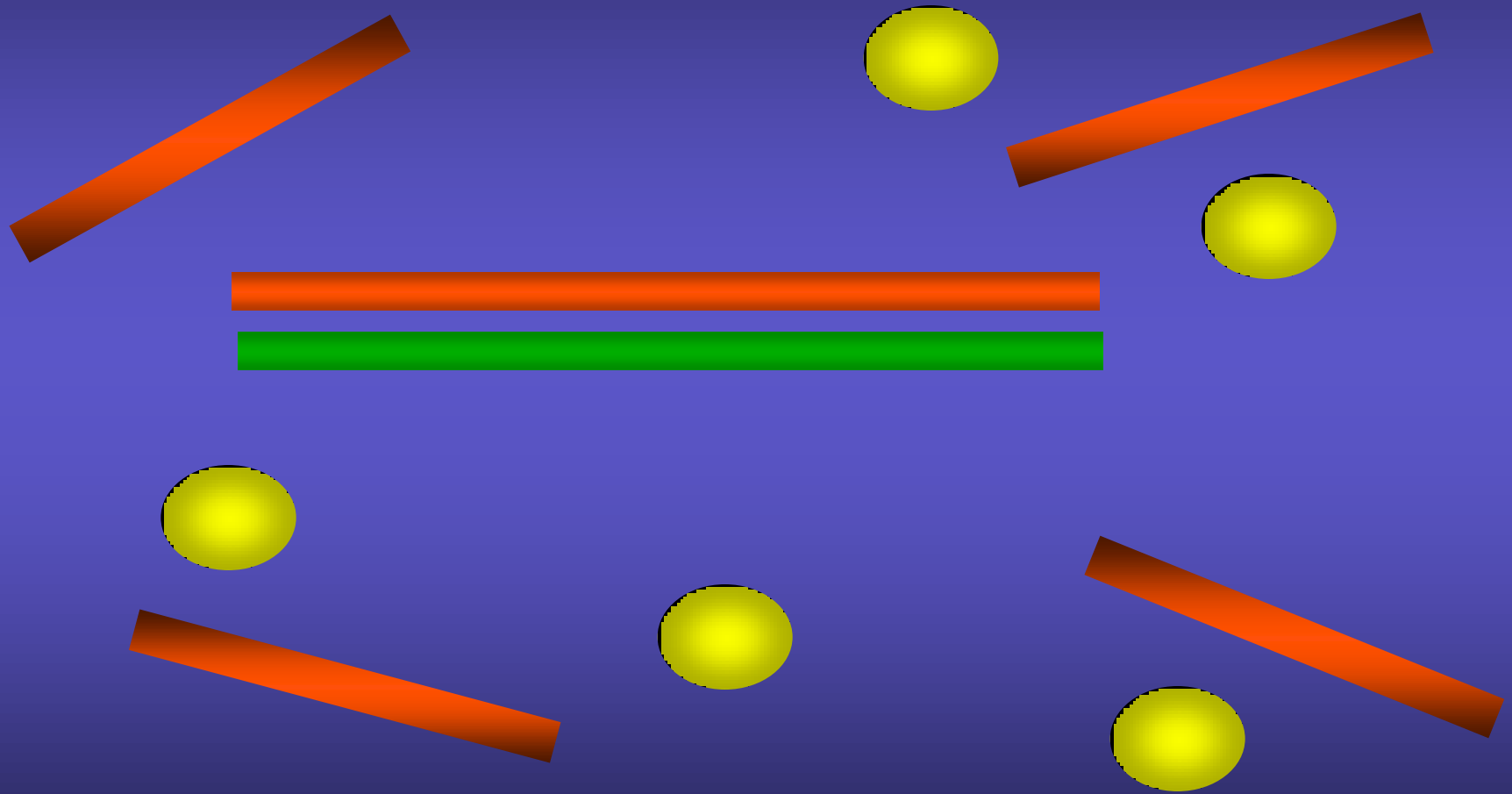
# FORMAZIONE DEI "PRIMERS-DIMERI"

---



# FORMAZIONE DEI "PRIMERS-DIMERI"

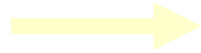
---



# TAMPONE DI REAZIONE

---

**Standard PCR  
1x *Taq* Buffer**



- 10mM Tris-HCl: pH 8.3 a t.a.
- 50mM KCl
- 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (!!!!)

- **controllo pH**  
(attività *Taq* polimerasi)
- **controllo forza ionica**  
(termostabilità *Taq* polimerasi)

Cosolventi: diminuiscono la temperatura di denaturazione e di annealing:  
DMSO, formamide, glicerolo

# CONCENTRAZIONE DI $MgCl_2$

---

- Necessario per l'attività enzimatica
- Stabilizza l'ibridazione del DNA
- Sottratto alla reazione da diversi fattori: DNA, EDTA, supporto in vetro (*In Situ*), dNTPs.
- Legato dai dNTP (gruppi fosfato)
- Concentrazione ottimale: dNTP+ primers+ DNA
- Effettuare sempre una "titolazione" di  $Mg^{++}$  quando vengono cambiati i parametri di reazione

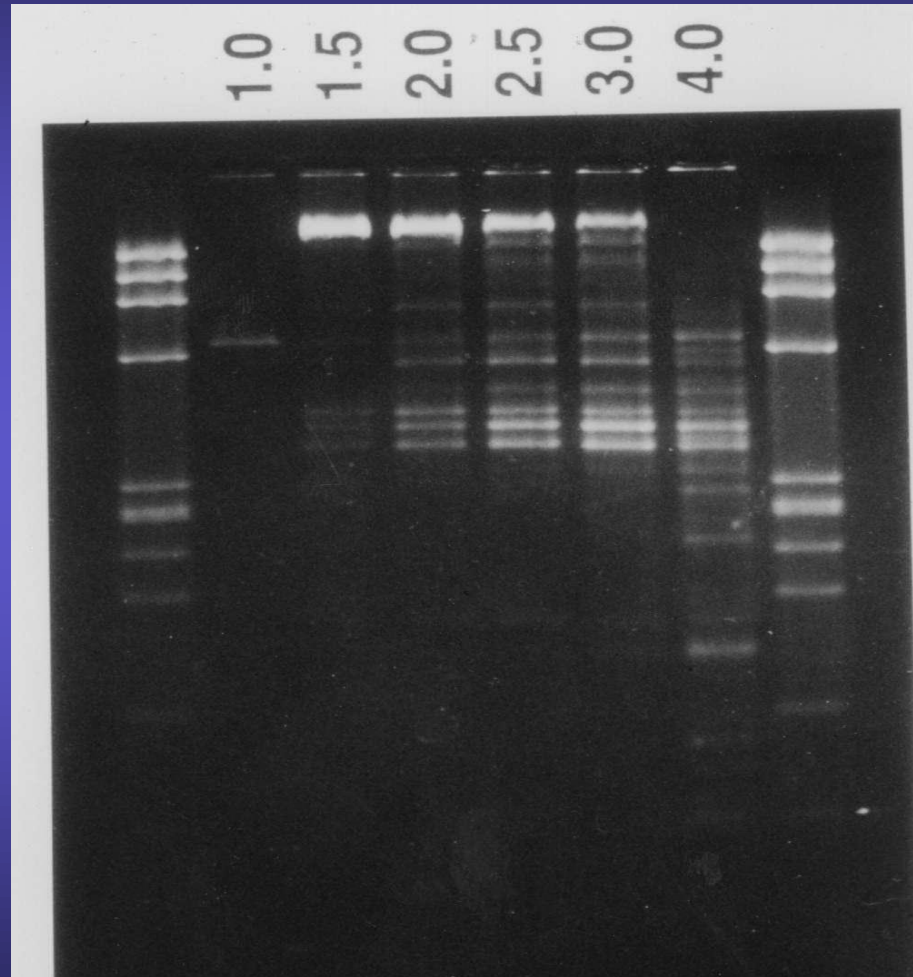
**La concentrazione utilizzata è:  
0.5-5 Mm (generalmente 1.5 mM)**

**PROVARE EMPIRICAMENTE IN FASE DI OTTIMIZZAZIONE**

# CONCENTRAZIONE DI $MgCl_2$

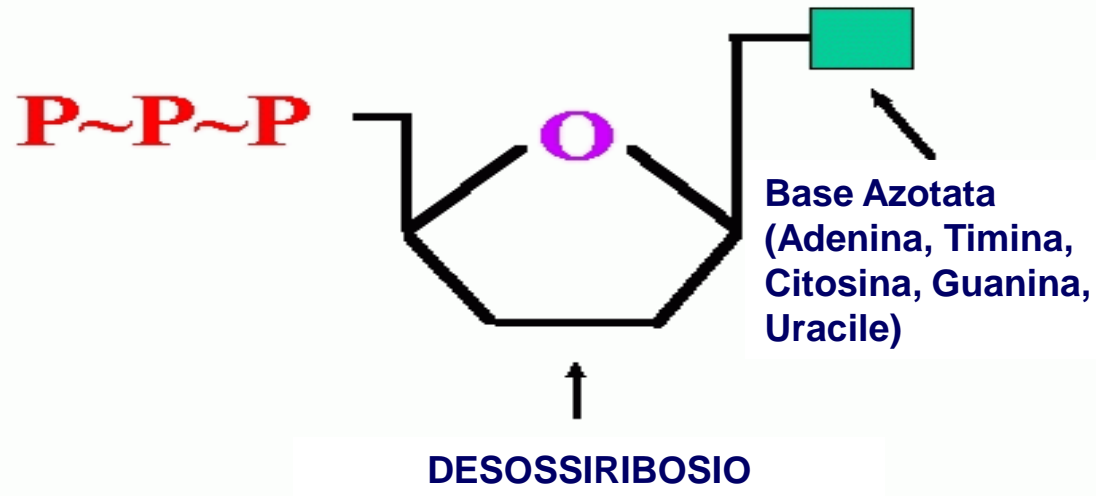
[ $Mg^{++}$ ] mM

→  
amplificato  
specifico



# deossiNUCLEOTIDI TRIFOSFATI: dNTPs

---

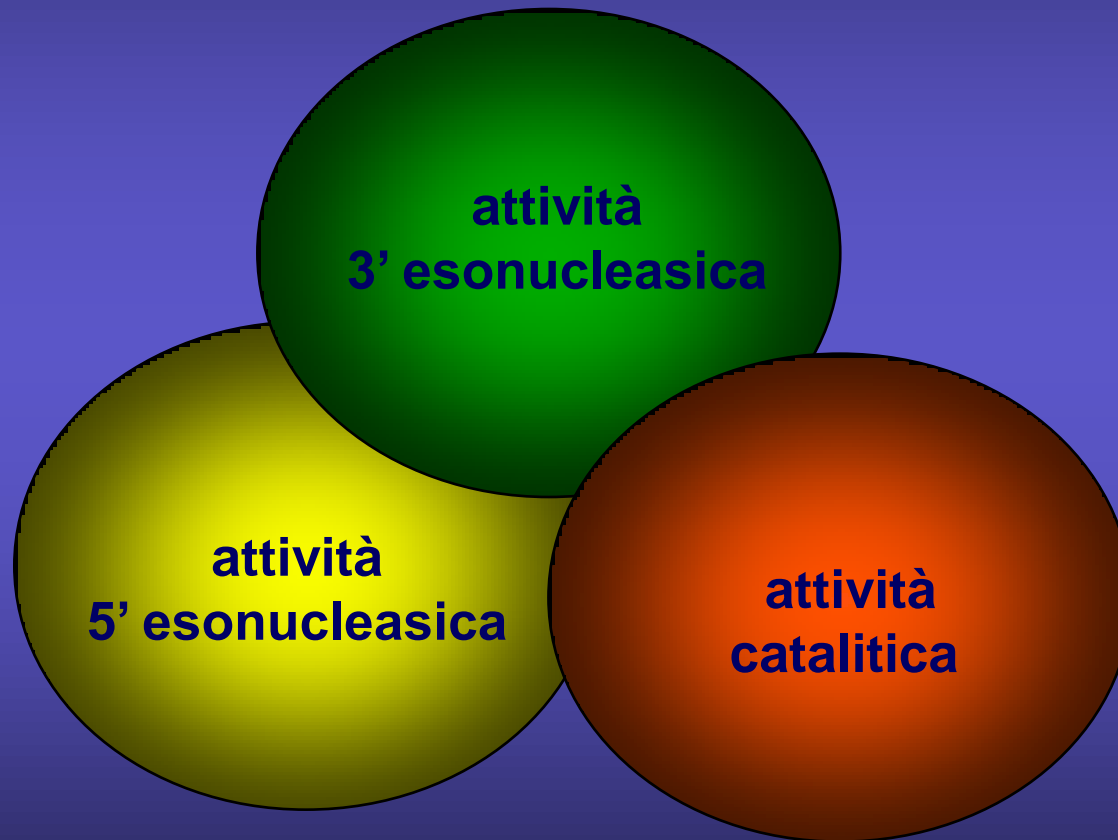


La concentrazione utilizzata è:  
**0.2 mM ciascuno (200uM)**

N.B. Usare dUTP ad una concentrazione 2-5 volte maggiore

# DNA POLIMERASI (Taq polimerasi)

---



# LE CONDIZIONI DI REAZIONE

---



# DENATURAZIONE

---

- **SEPARAZIONE DELLE DUE ELICHE DEL DNA TARGET**
  - mezzo di reazione (presenza di cosolventi)
  - natura del DNA target
  - denaturazione preliminare di 3-5 minuti

**94-95°C per 15-60 secondi**

# ANNEALING

---

- **INCONTRO E IBRIDAZIONE DEI PRIMERS CON IL DNA TARGET**
- **FASE PIU' DELICATA DELLA PCR**
- Calcolo della temperatura di annealing ( $T_m - 5^\circ\text{C}$ )
- La durata dipende dal tipo di strumento utilizzato

## **Calcolo della temperatura di annealing:**

- Uso di sofisticati algoritmi
- Uso della formula  $2(A+T) + 4(C+G)$



**provare  
empiricamente**

# ESTENSIONE

---

- **POLIMERIZZAZIONE DI NUOVE MOLECOLE COMPLEMENTARI AL DNA TARGET**
- Lunghezza della sequenza amplificata
- Tipo di strumento impiegato
- Estensione finale di 5-10 minuti

**72°C per 15-60 secondi**

# NUMERO DEI CICLI

---

➤ **Varia a seconda del numero di copie iniziali di DNA target e della sensibilità richiesta:**

➤ 1 ug DNA genomico (150.000 copie)	25 cicli
➤ 10.000 copie	30 cicli
➤ 1.000 copie	34 cicli
➤ 100 copie	38 cicli
➤ 10 copie	42 cicli

N.B. Oltre un certo numero di cicli non si ottiene più un aumento del numero di amplificati, per ottenere una sensibilità maggiore ricorrere ad altri sistemi (nested-PCR)

# I PARAMETRI DELLA REAZIONE DI PCR

---

Parametri	Condizioni di reazione
Buffer Taq polimerasi	KCl 50mM, tris-cloruro 10mM + MgCl <sub>2</sub>
DNA target	0,1-2 ug DNA o RNA (cDNA)
Primers	0,2-1 mM (20-100 pmoli per reazione)
MgCl <sub>2</sub>	0,05 e 5 mM
dNTP	0,2 mM ciascuno (200uM).
Taq polimerasi	0,1-4 U
Totale miscela di reazione	25 – 100 ul
Denaturazione	94-98°C
Annealing	37-72°C
Estensione	60-72°C
Numero dei cicli	25 – 40