

Evoluzioni della tecnica PCR

Biotechnologie applicate all'ispezione
degli alimenti di origine animale

Dip. di Medicina Veterinaria e Produzioni animali

tiziana.pepe@unina.it

E' una variante della tecnica di PCR end-point.

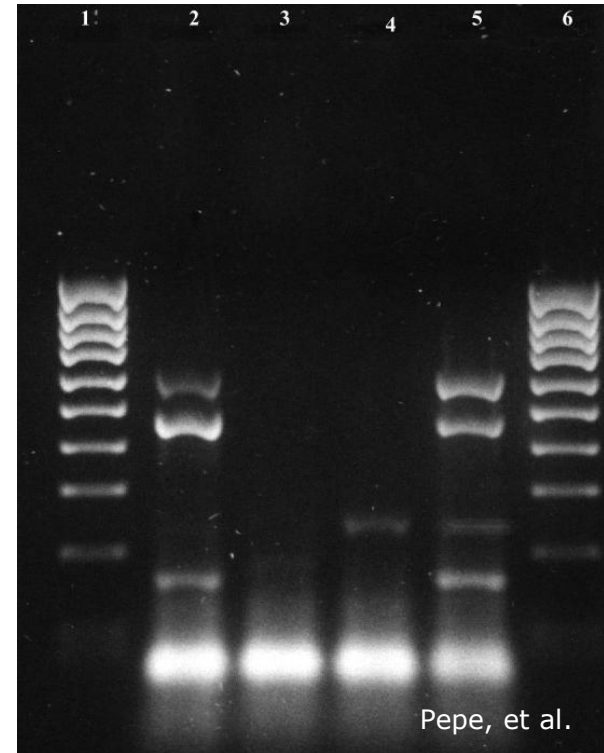
Prevede due distinte e successive reazioni di amplificazione:

- I) Nella prima amplificazione si utilizzano primers più esterni al frammento di DNA da amplificare
- II) Nella seconda amplificazione si utilizzano primers che amplificano un frammento interno a quello amplificato nella reazione I

Se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.

- Consiste nell'utilizzo di diverse coppie di primers nella stessa reazione di amplificazione.
- Pertanto risulterà possibile amplificare più frammenti di DNA nella stessa reazione di amplificazione.
- Tale tecnica consente di amplificare nella stessa reazione più frammenti di geni caratteristici per una specie, oppure più frammenti specifici appartenenti a specie diverse.

Corsa elettroforetica di frammenti di geni che codificano per fattori di patogenicit  caratteristici di *Escherichia coli* O157 H7



In ogni pozzetto e' caricato il DNA estratto dei ceppi di *E.coli*

- Rappresenta un'evoluzione della tecnica di PCR end point, infatti permette mediante visualizzazione la misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato.
- La maggiore specificità di reazione consente di ridurre il numero delle repliche effettuate per ciascun campione, necessarie al fine di verificare la ripetibilità delle analisi.
- La PCR Real Time consente di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, potenziali fonti di inquinamento del campione.

La **PCR End point** fornisce solo una **stima qualitativa** della presenza di frammenti genici nel DNA da analizzare

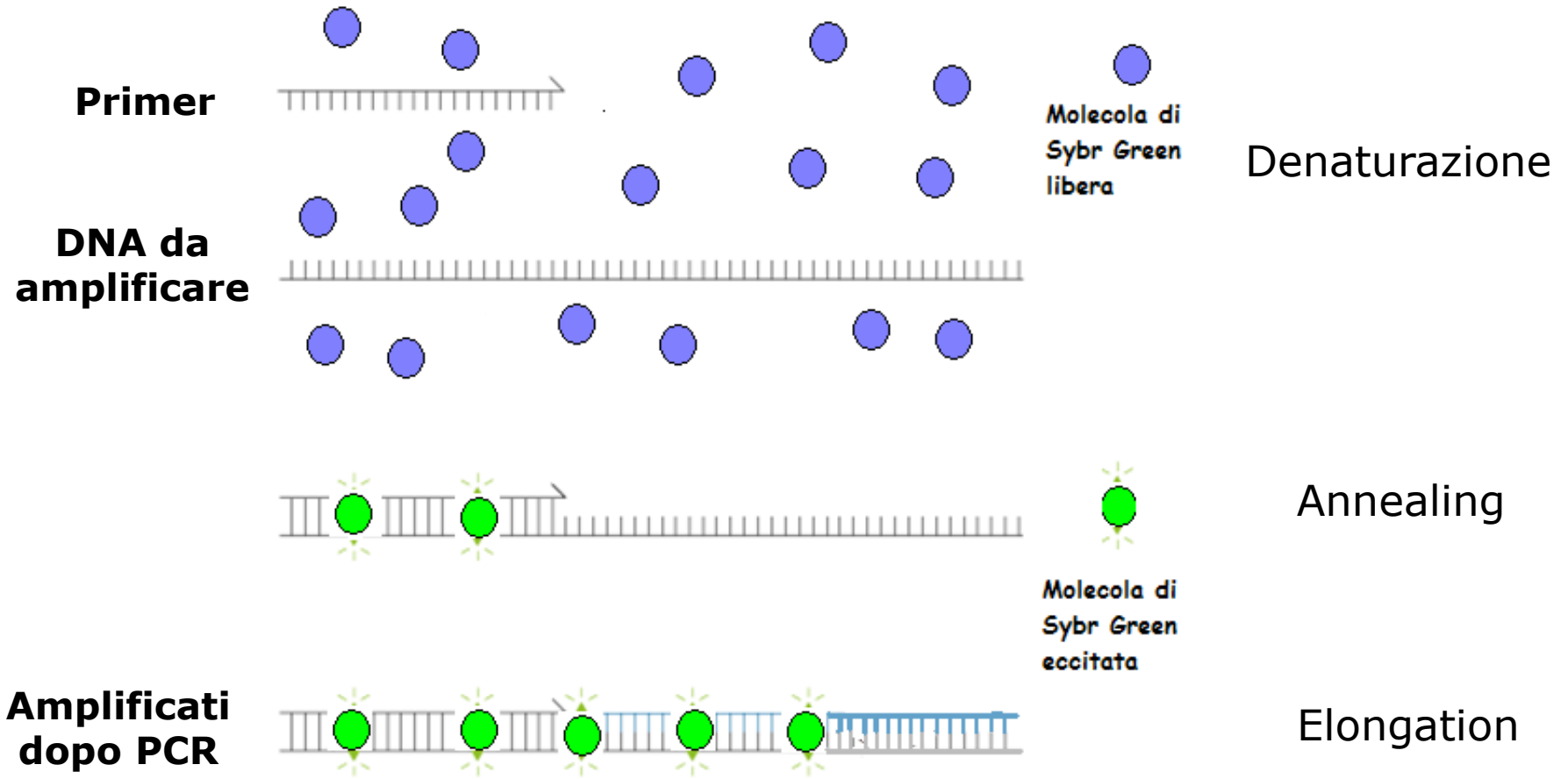
La **PCR Real time** permette anche una **valutazione quantitativa del DNA presente.**

La PCR Real-time può essere effettuata con due differenti chimiche di reazione:

- 1) utilizzo di **coloranti fluorescenti** che si intercalano nella doppia elica del DNA amplificato
- 2) utilizzo di **sonde fluorescenti** specifiche per il tratto di DNA da amplificare

Il Sybr Green dye è una molecola fluorescente che durante la reazione di PCR Real time si intercala all'interno del doppio filamento di DNA originatosi ad ogni ciclo di amplificazione

- La **miscela di reazione** contiene:
 - **DNA denaturato**
 - **primers**
 - **soluzione tampone**
 - **nucleotidi trifosfati**
 - **Sybr green**
- Nella **fase di denaturazione** il Sybr green è libero nella miscela di reazione
- Nella **fase di annealing** il SYBR Green si posiziona **in maniera aspecifica** nel solco minore del DNA.
- Nella **fase di elongation** si osserva la fluorescenza dovuta dalla presenza del Sybr green nella doppia elica degli ampliconi.
- La **fluorescenza** è dovuta al legame del Sybr green all'interno dell'acido nucleico a doppia elica.



Molecole del colorante Sybr Green nelle tre fasi di PCR

La molecola del colorante fluorescente si lega indistintamente a tutti i frammenti di acido nucleico a doppia elica.

Quindi per evitare risultati falsi positivi, i parametri di ogni reazione di amplificazione (scelta di primers specifici, concentrazione del campione, ecc.) devono essere ottimizzati.

Le sonde sono sequenze oligonucleotidiche rese fluorescenti da alcuni fluorocromi.

Le sonde più comuni utilizzate nelle reazioni PCR Real time sono:

- **Sonde Scorpion**
- **Sonde FRET**
(Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- **Sonde Dual-labeled**
(sonde TaqMan)
- **Molecular beacons**

La sonda dual-labeled più comune è la **sonda TaqMan**

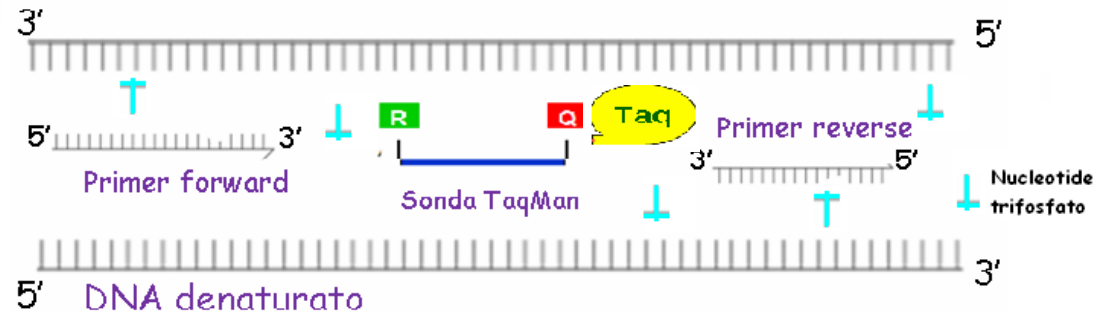
Tale sonda ibridizza un tratto di genoma interno al frammento di DNA amplificato dalla coppia di primers.

All' estremità 5' della sonda è legato il **Reporter**, fluorocromo ad alta energia

All' estremità 3' è legato il **Quencher**, fluorocromo a bassa energia

Quando i fluorocromi sono legati alla sonda, i fotoni emessi dal Reporter sono assorbiti dal Quencher, che ha minore livello energetico.

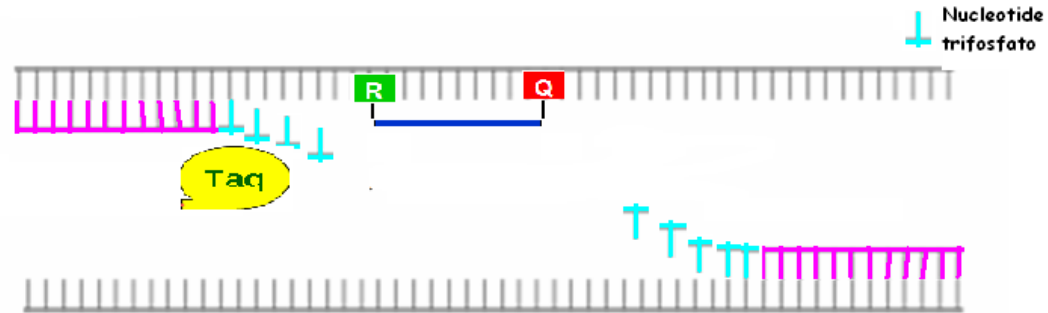
- Nella fase di denaturazione non vi è emissione di fluorescenza



Fase di denaturazione

- Durante l'annealing, i primers e la sonda si uniscono ai tratti di DNA ad essi complementari.

- Reporter e Quencher sono ancora legati alla sonda.

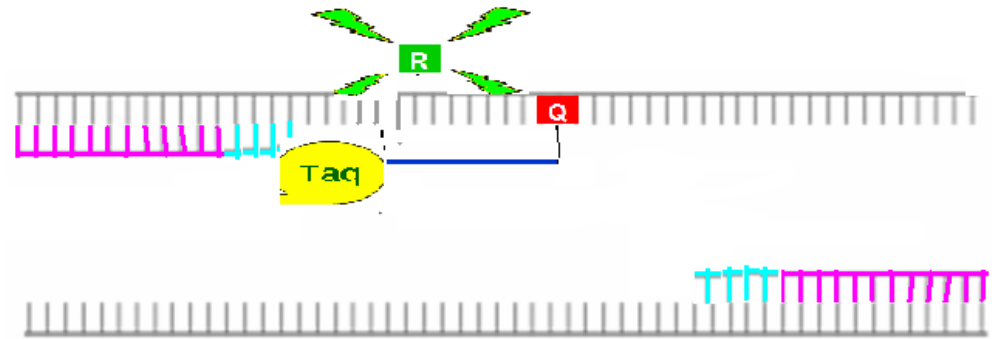


Fase di annealing

- Nella fase di estensione, l'attivazione della Taq e il conseguente appaiamento dei nucleotidi trifosfati raggiunge la sonda.

- Il Reporter, all'estremità 5', si stacca dalla sonda.

- I fotoni del Reporter non sono più assorbiti dal Quencher ed emettono fluorescenza.



Fase di extension

- Quando la sonda emette fluorescenza si ha la conferma **in tempo reale** dell'amplificazione del tratto di DNA ricercato.

- L'esame di Real Time PCR avviene in **termociclatori** in grado di registrare la fluorescenza.

- Rispetto alla PCR end-point non c'è più bisogno di analizzare i risultati dell'amplificazione tramite corsa elettroforetica.



Termocicizzatore per PCR Real Time

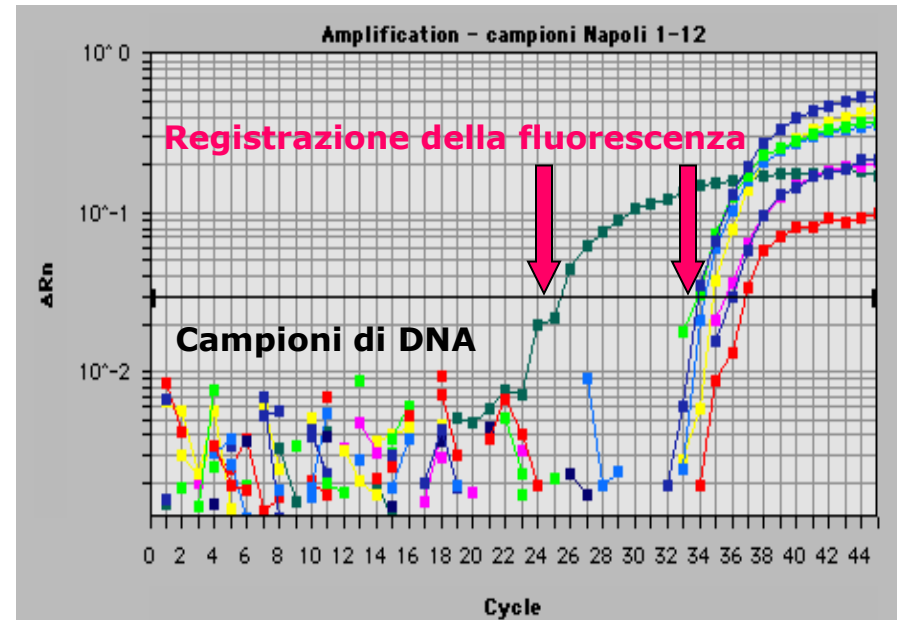
da www.appliedbiosystems.com

- La fluorescenza emessa in fase di amplificazione è registrata da software dedicati che visualizzano il segnale di fluorescenza come curve di amplificazione.

- Le curve sono riportate su monitor collegati al termocicizzatore.

- L'emissione di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente.

- Per elevate concentrazioni di DNA le curve di amplificazione si registrano già dopo i primi cicli di PCR



Cicli di PCR