

Polymerase Chain Reaction e sue applicazioni

La Polymerase Chain Reaction o PCR è una tecnica relativamente recente che ha rivoluzionato la Biologia molecolare.

Ideata da Kary Mullis intorno ai primi anni '80, è stata perfezionata e automatizzata al punto da sostituire molte tecniche di clonaggio tradizionale.

Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nell'ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.



The Nobel Laureate



In 1993 Dr. Kary B. Mullis was awarded the Nobel Prize in Chemistry for his development of this revolutionary technique during the mid-eighties



L'essenziale della PCR

La tecnica della PCR si basa sulla amplificazione di specifici frammenti, compresi tra le estremità 5' di due "primers" definiti dallo sperimentatore, mediante la reiterazione di un numero "n" di cicli ciascuno dei quali consta di una tappa di denaturazione, una di appaiamento ed una di estensione.

La reiterazione automatizzata della procedura, la possibilità di utilizzare alte temperature di esercizio e la possibilità di definire esattamente la sequenza da amplificare conferisce alla PCR grande sensibilità, specificità e versatilità.

L'amplificazione della sequenza bersaglio è, in teoria, uguale a 2^n . Cioè se vengono effettuati 32 cicli di PCR la sequenza bersaglio si sarà amplificata 2^{32} volte (= 1 073 741 824 ! di volte)

La sensibilità della PCR

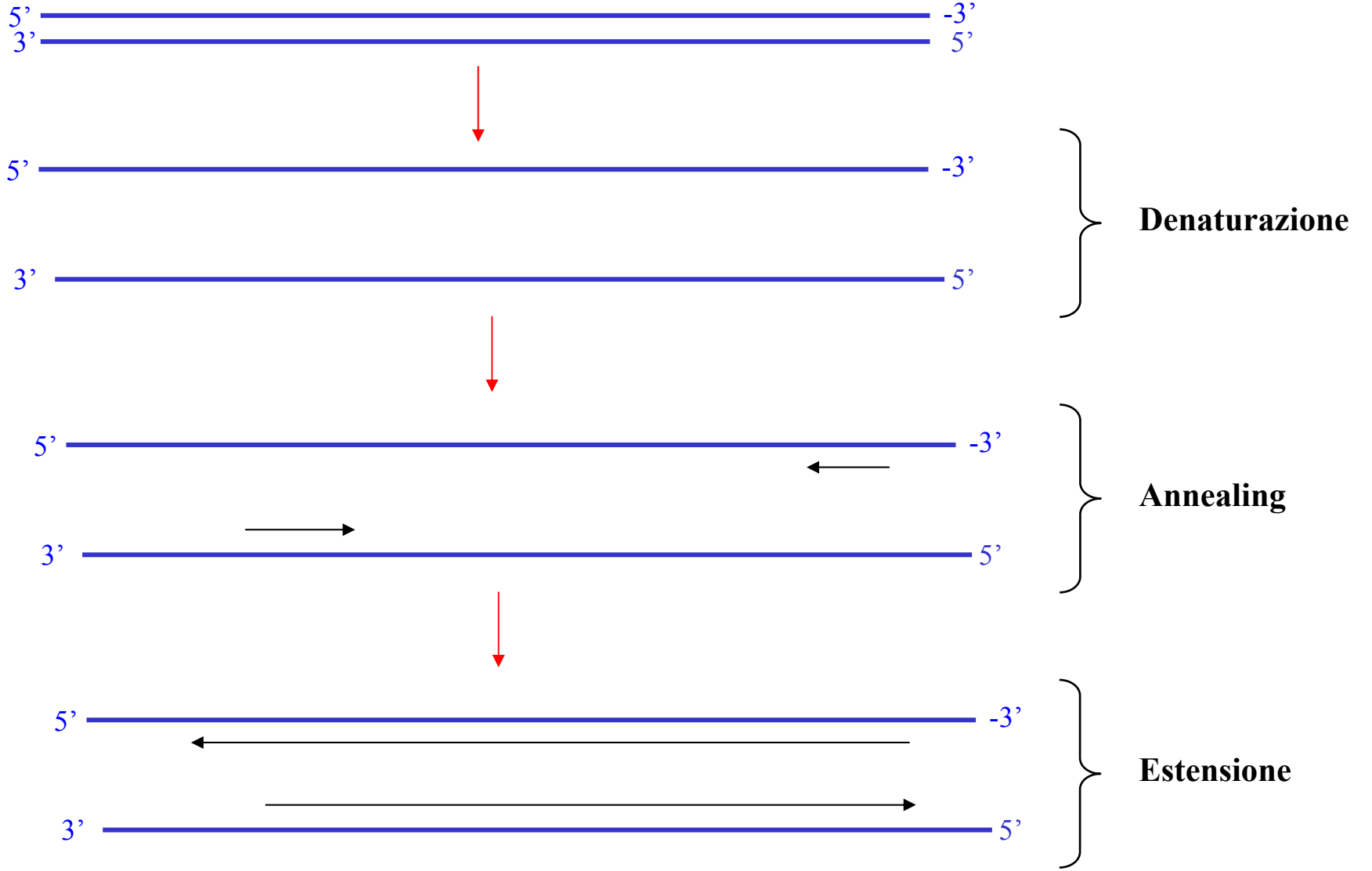
L'amplificazione esponenziale delle sequenze bersaglio e la selettività conferita dalla scelta dei primers conferiscono alla PCR una altissima sensibilità anche a partire da preparazione non purificate

In teoria questa tecnica ha le potenzialità per amplificare un gene unico da un'unica cellula!

In effetti si è già riusciti a determinare il sesso di nascituri a partire da singole cellule fetali, amplificando 149 bp di una sequenza (DZY1) altamente ripetuta e specifica per il cromosoma Y.

Un aspetto interessante è la capacità della PCR di funzionare a partire da preparazioni non purificate. Questa proprietà permette per es. di analizzare colonie batteriche trasformate, selezionando rapidamente le colonie positive da quelle negative (colony PCR).

Ma la capacità della PCR di utilizzare stampi grezzi va ben oltre! Nelle applicazioni forensi la PCR riesce ad amplificare correttamente sequenze di DNA provenienti da reperti legali come capelli o tracce di sangue secco. Ancora più sorprendentemente è stato possibile amplificare DNA amplificato da mummie egiziane e, addirittura, quello di una pianta preistorica, amplificata a partire da un reperto fossile risalente al Miocene, 18 milioni di fa!



Quali sono i fattori critici per ottenere una buona PCR?

Il modo migliore per rispondere a questa domanda è quello di esaminare i componenti della reazione di PCR e di comprendere in che modo essi contribuiscano alla reazione.

In teoria ciascun componente (fisico o chimico) della PCR può essere modificato allo scopo di incrementare la specificità o la sensibilità della reazione; è chiaro tuttavia che qualunque singola variazione ha un effetto globale sulla reazione in quanto i singoli “fattori” non sono indipendenti l’uno dall’altro

L'attrezzatura

La thermocycler deve:

-mantenere accuratamente e riproducibilmente le tre diverse temperature di incubazione della PCR

-cambiare da una temperatura all'altra in un tempo definito (ramping) e con variazioni continue

-ripetere i tre cicli in maniera riproducibile

è evidente che non voglio dire che una macchina sia migliore di un'altra (sono tutte buone), ma soltanto che ogni macchina ha delle caratteristiche specifiche che dobbiamo conoscere.

I tubi di reazione: ne esistono di vario tipo per volume e spessore della parete), il che influisce sulla velocità con cui il calore è trasferito dalla thermocycler alla miscela di reazione

Il profilo termico ed il numero dei cicli della reazione

Denaturazione iniziale: è molto importante che lo stampo di DNA sia completamente denaturato (altrimenti può rinaturarsi inficiando la tappa di annealing dei primers) per cui è buona regola partire con una tappa iniziale di denaturazione di qualche minuto (2 - 5 min).

Primer annealing: la temperatura di annealing viene calcolata in base ad una formula (che vedremo in seguito), la sua ottimizzazione avviene tuttavia in maniera empirica.

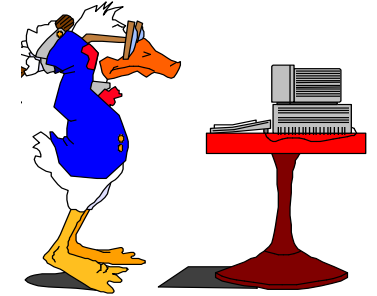
La scelta della temperatura di annealing è il fattore più critico per una buona riuscita della PCR; se troppo alta non si realizza l'annealing, se troppo bassa l'annealing è aspecifico

I primers e l'annealing

L'aspecificità di annealing può riguardare l'estremità 3' del/dei primer/s che si ibridizzano consentendone l'allungamento (aspecifico); oppure l'estremità 5' senza coinvolgere l'estremità 3' il che comporta il non allungamento.

Se i due primers presentano qualche complementarità di basi (1-4 basi) alle loro estremità 3' possono - a basse temperature di annealing- appaiarsi tra di loro ed estendersi reciprocamente (primer-dimers)

PROGETTAZIONE dei PRIMERS



Caratteristiche di un buon primer:

- ✓ **Lunghezza: 16 bp o più** ⇨

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.

- ✓ **T_m primer 1 \simeq T_m primer 2**

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

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ C$$

T annealing \Rightarrow $\sim 2-5^\circ C$ al di sotto della più bassa T_m dei due primers usati

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

- ✓ **Assenza di sequenze ripetute invertite** che possano far ripiegare il primers su se stesso o di **sequenze complementari fra i primers** che causano l'amplificazione di dimeri dei primers

Come disegnare i primers

Generalmente le sequenze dei primers devono avere le seguenti caratteristiche:

- Non devono presentare strutture secondarie interne**
- Devono avere un contenuto in GC compreso tra il 40 ed il 75%**
- una lunghezza di 14 - 40 nt**
- Non devono presentare domini (stretches) di sequenze di G o C o T o A; in ogni caso se non si possono evitare questi stretches la distribuzione di G/C e di A/T al loro interno deve essere bilanciata**
- Non devono presentare estremità 3' complementari.**

E' possibile inserire stretches di basi non presenti sullo stampo (ad esempio un sito di restrizione)

La concentrazione dei primers non deve essere così alta (rispetto a quella dello stampo) da causare ibridazione aspecifica né troppo bassa da esaurirsi prima della fine della reazione

...PROGETTAZIONE "COMPUTERIZZATA" dei PRIMERS

5' CTTTTGGCATAGACCACATGCCA

$T_m = 58.6$

5' TGTTACAAGTGTGGATGGATGCC

$T_m = 56.1$

```
GGCCAGTGAATTCAGCTCACGCCCCAAATATGCAGCTTCCAGTCCAGTTTCATCCGGCGCGCTGA
AGATTTTTTAGAGCATGCTCTATTATGCAGCGTCCGTTGGAATGCTCTTTTAACTCCGCGCGCGC
TAAACTTGC GATTTTTTGGGCGCGCGCTGATATTGGGCGTCTGTTGAAGATGCTCTTAAGTGGC
CACAAGGGAGATGGGTCTGGGCTAAGGTTTCATATCTTACAATATAAAGTTGAAGACGATTTGTGGC
ACCCAGGGGCGGGAGACGCATGCATGCAGCTGCATGATTGCACCAAGATCCGAAGAGTGGTTTA
TGGTTTGAGCTTAATTAAGTGCATGCATGCAACTTTTTGGTACAACCTTTGGCATAGACCACATGCC
ATCCACCTCCCATGCTTTTCATTTTTACTTGTAAATTTGGATCTATTATATCTTTTGAATCAAAAGT
TCAATTTATATTTCTGTTTGC GTATTCTTGTCCCTTGTGTCGAGAGCTTTGAAACAAGCCCACTTTG
AATACGTTTTGACAAATTCTAAAACTTAAGTGAGTTTCAACTGCTAAAACTTGATAGAATGAATGA
AAAATTTAGCAAGTTTCAAAGACTAAAACTGAAACCCTAAGCCCTTAGCCCTAGATCCTAAGCCCT
AAGCCGGAAGTCCTAAACCGTATGCCCTAACA
```

$T_m = 83.6$

?

Clear

Open file

Calculate

Minimum stem size:

Minimum 3' overlap:

Optimal annealing temperature is 56.7. 3' end of oligo 1 pairs to positions 5 to 10 of itself.

Il problema dei falsi positivi

A causa della sua elevata sensibilità la PCR può dare **falsi positivi**, per evitare i quali, devono essere osservate alcune precauzioni.

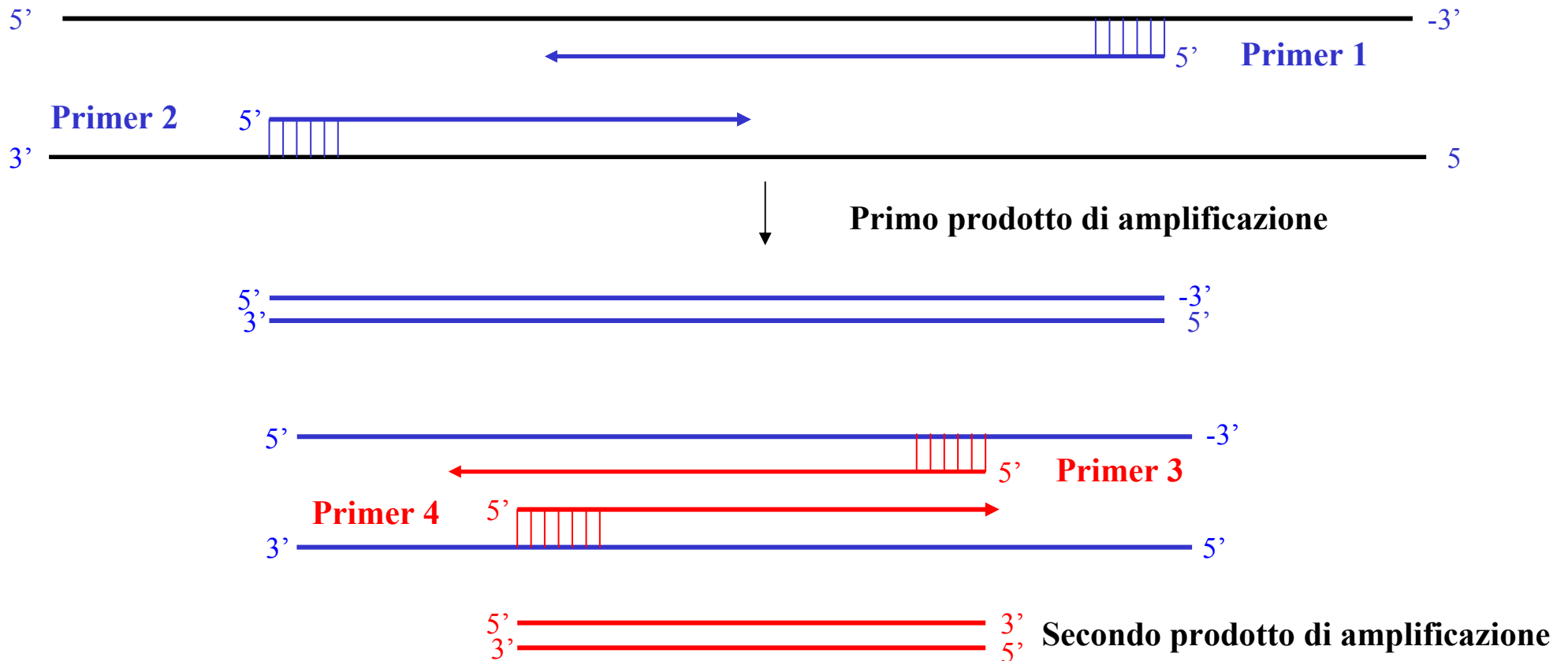
In presenza di genomi complessi, specie a temperature poco stringenti, i primers possono appaiare in regioni non omologhe. Se entrambi i primers appaiano su uno pseudo-target, questo può essere selettivamente amplificato.

Per minimizzare questo problema si ossevano alcune precauzioni di carattere generale, come quello di preparare la reazione a bassa temperatura, usare pipette Gilson protette da filtri o lavorare in cappe a flusso laminare, o effettuare, quando opportuno, PCR “annidate” (nested PCR; vedi dopo) .

Esistono in commercio, inoltre, polimerasi modificate, chiamate “hot start” che sono appositamente studiate per minimizzare questo problema. Sono basate su forme inattive della polimerasi, che vengono attivate dalle alte temperature. Un esempio è costituito da polimerasi inattive perchè inglobate in palline di cera, che all’innalzarsi della temperatura fondono liberando ed attivando l’enzima. Un altro tipo di polimerasi hot start è costituito da un complesso polimerasi/anticorpo anti-polimerasi che viene disattivato ad alte temperatura liberando l’attività enzimatica.

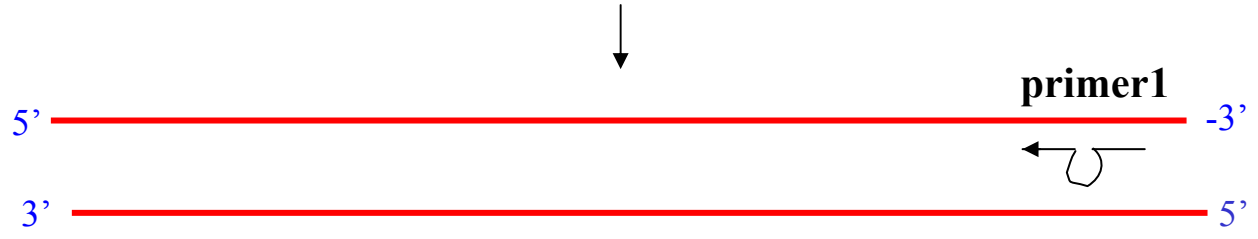
Nested PCR

La nested PCR è una variante della tecnica di PCR che consiste nello utilizzo di due coppie di primers, una esterna che genera un normale prodotto di PCR ed una coppia con primers all'interno del prodotto amplificato: Se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.

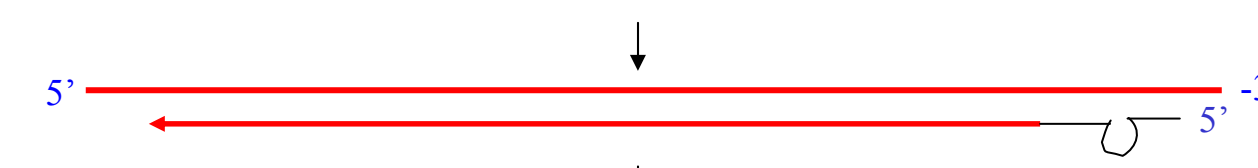




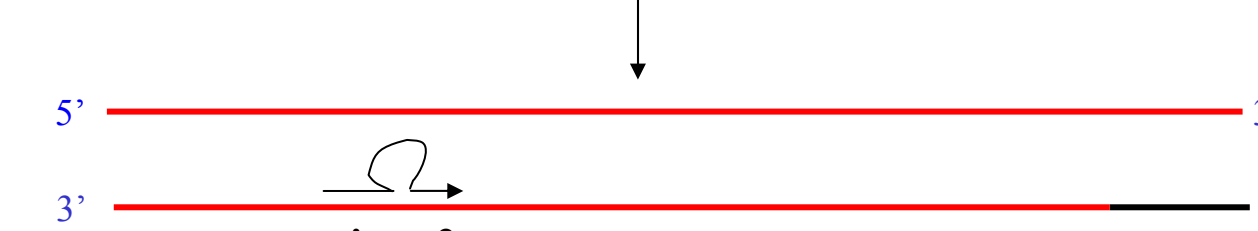
Falso target



Il Primer1 appaia erroneamente



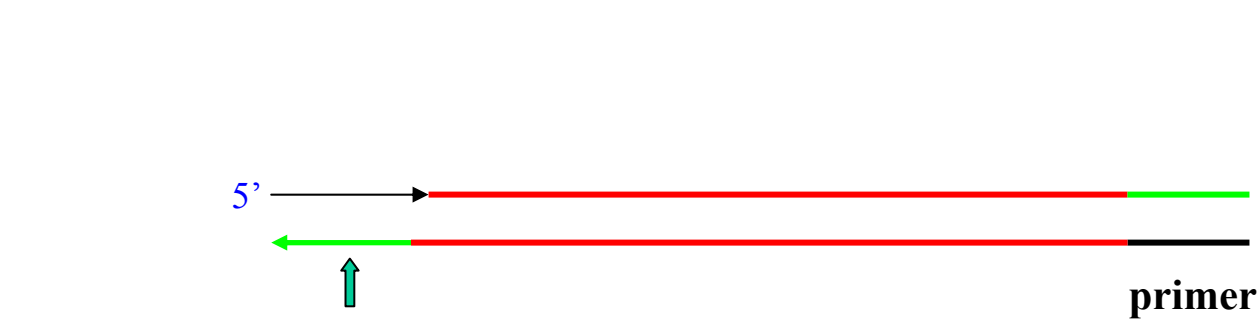
Il Primer1 si estende



I filamenti si separano. Se Il Primer 2 si appaia.....



la sua estensione copia il falso target e crea una regione complementare al primer 1



Amplificazione specifica del falso bersaglio

Sequenza complementare al primer 1

La denaturazione durante i cicli

Di solito tempi di 30 sec a 95°C sono sufficienti per denaturare gli stampi (che sono più corti di quello iniziale), si devono in ogni caso tenere conto le caratteristiche della thermicycler (ramping) e dei tubi che si stanno usando

La temperatura di anealling

La Ta viene calcolata in base alla Tm. I due primers devono avere Tm pressappoco uguale. In ogni caso si considera la Tm più bassa.

La Ta deve essere di 5°C più bassa della Tm(talvolta si possono utilizzare anche valori più alti della Tm

La Tm per oligo compresi tra 14 e 70 bp può essere calcolata

$$\text{TM} = 81,5 + 16,6 \log(\text{J}) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 600/\text{L} - 0,63 (\% \text{ FA})$$

J = concentrazione cationi monovalenti ; L lunghezza dell'oligonucleotide; FA formamide.

oppure con

$$\text{Tm} = 2^{\circ}\text{C}(\text{A+T}) + 4^{\circ}\text{C} (\text{G+C})$$

L'estensione dei primers

Viene condotta normalmente a 72°C che è la temperatura ottimale di esercizio della Taq polimerasi.

Di solito 20 sec di estensione sono sufficiento per la sintesi di frammenti da 0,5 kb e 40 sec per frammenti da 1,2 kb (questo chiaramente in base alle caratteristiche di processività della polimerasi)

Il numero dei cicli

In una reazione ottimale è possibile amplificare meno di 10 molecole stampo utilizzando 40 cicli di amplificazione.

Nella maggior parte delle reazioni di amplificazioni vengono utilizzati da 25 a 35 cicli di amplificazione: lo stampo di partenza è superiore alle 10 molecole minime e si potrebbero avere prodotti aspecifici

L'estensione finale

E' buona regola terminare la reazione di amplificazione inserendo, dopo l'ultimo ciclo, una tappa di estensione finale (72°C per 5-15 min.) per completare prodotti di amplificazione parziali e favorire l'appaiamento di prodotti complementari, ma a singola elica

Le concentrazioni di alcuni reagenti

La Taq polimerasi viene usualmente utilizzata in concentrazioni comprese tra 0,5 e 2,5 unità

La concentrazione del MgCl_2 varia tra 0,5 e 5 mM (ioni Mg^{2+} influenzano l'attività enzimatica, incrementano il T_m , formano complessi solubili con i dNTP); la concentrazione di Mg^{2+} liberi dipende dalla concentrazione di altri composti che possono legare gli ioni (dNTP, Ppi, EDTA)

Le concentrazioni dei dNTP devono soprattutto essere bilanciate tra loro, altrimenti si può interferire sulla fedeltà di amplificazione.

Lo stampo

Ciò che è ancora più importante della concentrazione assoluta dello stampo, è il rapporto tra la concentrazione stampo/primers che influenza fortemente la specificità della PCR.

Una concentrazione bassa di stampo/primers potrebbe non “consentire” l’appaiamento con le sequenze complementari, al contrario una concentrazione alta potrebbe incrementare gli eventi di cattivo appaiamento

N.B. Si deve evitare l’evaporazione della miscela di reazione (la qual cosa può squilibrare le concentrazioni relative dei reagenti)

La Taq polimerasi

Le prime PCR, effettuate utilizzando la polimerasi Klenow, erano molto inefficienti perché, essendo termolabili, dovevano essere rimpiazzate ad ogni ciclo di amplificazione

Un significativo miglioramento della PCR si deve all'introduzione di un nuovo tipo di polimerasi termostabile isolata da *Thermus aquaticus*, un batterio isolato nelle pozze termali. Questa polimerasi ha un optimum a 72°C e resiste alle alte temperature usate negli step di denaturazione permettendo l'automatizzazione dell'intera procedura, oltreché un deciso miglioramento della specificità della reazione. Esistono oggi numerose varianti della Taq polimerasi, incluse polimerasi isolate da *Thermus flavus* (Tfl polimerasi), *Thermus thermophilus* (Tth polimerasi). e *Pyrococcus woesei* (Pwo)

Caratteristiche importanti di polimerasi di questo tipo sono: **la termostabilità, la processività** (affinità per lo stampo che determina il numero di base incorporate prima della dissociazione), **la fedeltà di incorporazione.**

Fedeltà di sintesi della Taq polimerasi

Un aspetto di particolare importanza è costituito dalla fedeltà di incorporazione. In generale le DNA polimerasi duplicano il DNA fedelmente, ma non esattamente, con un tasso d'errore intorno a 10^{-9} . Questa bassa frequenza di errore è mantenuta grazie alla presenza di attività di correzione di bozze (proofreading).

La Taq polimerasi, tuttavia, è priva di attività proof reading ed incorpora, in media, una base sbagliata ogni 20000 sintetizzate (2×10^{-4}). Anche se questa caratteristica non è rilevante nelle tecniche analitiche può essere un grosso problema nei clonaggi.

Esistono in commercio DNA polimerasi termostabili con attività di proof reading con tassi di errore più bassi, fino a $1,6 \times 10^{-6}$, che andrebbero usati nei clonaggi molecolari.

Tassi di errore e caratteristiche di alcune DNA polimerasi termostabili : la Taq polimerasi

- **Taq DNA polimerasi , isolata dal *Thermus aquaticus* un ceppo batterico mancante di Taq I**
- **È costituito da una singola catena polipeptidica di 95 kDa.**
- **E' una DNA polimerasi altamente processiva ma manca dell'attività di proof-reading**
- **Lavora in maniera ottimale ad un pH di circa 9 e a temperature di 75°C**
- **Tasso di errore 2×10^{-4}**
- **Vita media di 5 min. a 100°C 8 di 40 min a 95°C**
- **Concentrazione standard di magnesio 1,5 mM**
- **Concentrazione standard di dNTP 200 mM**
- **Detergenti anionici, DMSO glicerolo ammonio solfato aumentano l'efficienza**
- **Può utilizzare come substrato dNTP marcati radioattivamente o con digoxigenina,biotina o fluorosceina**

Tassi di errore e caratteristiche di alcune DNA polimerasi termostabili : la Tth polimerasi

- **Tth DNA polimerasi , isolata dal *Thermus thermophilus***
- **È costituito da una singola catena polipeptidica di 95 kDa.**
- **E' una DNA polimerasi altamente processiva ma manca dell'attività di proof-reading in presenza di ioni magnesio**
- **Lavora in maniera ottimale ad un pH di circa 9 e a temperature di 75°C**
- **Tasso di errore**
- **Può utilizzare come substrato dNTP marcati radioattivamente o con digoxigenina,biotina o fluorosceina**
- **Possiede attività intrinseca di RT non associata con RNasiH anche ad alte temperature in presenza di ioni manganese, ciò la rende ottimale per eseguire reazioni di RT di stampi con strutture secondarie resistenti e di poter effettuare con un unico enzima reazioni di RT/PCR**

Tassi di errore e caratteristiche di alcune DNA polimerasi termostabili : la Pwo polimerasi

- **Pwo DNA polimerasi , isolata dal Pyrococcus woesei, un peso molecolare di 95 kDa.**
- **E' una DNA polimerasi altamente processiva e possiede anche attività di proof reading ma non attività esonucleasica 5'-3'**
- **Tasso di errore 3×10^{-6}**
- **Lascia estremità blunt**
- **Vita media di 2 hrs. a 100°**
- **Preferisce il magnesio solfato al cloruro ad una concentrazione di 2 mM**
- **Concentrazione standard di dNTP 200 mM**
- **Può amplificare fedelmente fino a 7 Kb ed in associazione con la Taq (una miscela) fino a 15 Kb di genomico e 30 di DNA fagico**
- **Può utilizzare come substrato dNTP marcati radioattivamente o con digoxigenina,biotina o fluorosceina**

Le strategie per evitare le contaminazioni

La capacità della PCR di amplificare una singola molecola significa che anche piccole tracce di DNA contaminante possano essere amplificate (falsi positivi). Per evitare quindi di amplificare preparazioni di DNA contaminanti le attrezzature, cross contaminazioni tra i vari campioni, o contaminazioni da precedenti amplificazioni bisogna prendere delle precauzioni.

**E' PREFERIBILE AVERE DEI LOCALI DEDICATI ALLA PCR,
ANCOR PIU' LAVORARE SOTTO CAPP A DEDICATA ALLA PCR**

**USARE UN SET DI PIPETTE DEDICATE E PUNTALI CON
FILTRO**

- **USARE GUANTI STERILI**
- **PIPETTE, VETRERIA E PLASTICHERIA MONOUSO**
- **TUTTI I REAGENTI E SOLUZIONI POSSONO ESSERE AUTOCLAVATE (eccetto che primers, dNTP a Taq)**
- **SAREBBE MEGLIO AVERE UN SET DI REAGENTI ALIQUOTATI E DEDICATI**
- **QUANDO SI PIPETTA IL DNA EVITARE CDI PROVOCARE AEROSOL**
- **INCLUDERE SEMPRE UN CONTROLLO NEGATIVO (tutti i componenti della reazione meno il DNA)**

La PCR non è riuscita, che fare?

- **Ripetere la PCR per verificare eventuali errori di pipettamento**
- **Se il problema rimane fare delle nuove diluizioni del DNA stampo (soprattutto se genomico), verificare la concentrazione dei primers e rifare le diluizioni**
- **Come ultima risorsa utilizzare un batch diverso di polimerasi**
- **Rifare ex novo tutte le soluzioni**

(alcune) applicazioni della PCR

- nelle tecniche di ingegneria genetica**
- nella diagnostica molecolare**
- nella evoluzione molecolare**
- in ambito forense**
- nelle analisi di laboratorio**
- nelle scienze ambientali**
- ecc. ecc....**

Polymerase Chain Reaction e sue applicazioni

Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.

Consulenza Genetica e Ricerca:

Ricerca mutazioni;

Diagnosi prenatale malattie ereditarie;

Determinazione del sesso;

Determinazione dei portatori in famiglie a rischio e popolazioni;

Marcatura sonde;

Genetica delle popolazioni;

Polymerase Chain Reaction e sue applicazioni

Presenza e tipizzazione patogeni;

Tipizzazione tumori e attivazione oncogeni;

Monitoraggio e progressione tumori;

Attecchimento trapianti;

Polymerase Chain Reaction e sue applicazioni

- Diagnosi:

Falcemie, Talassemie, Fenilchetonuria, Diabete,

Fibrosi cistica, Emofilia, Alfa1-antitripsina, Mutazioni DNA mitocondriale, Distrofia muscolare, Sindrome Lesch-Nyhan, Morbo di Huntington, Leucemia mieloide, Alterazioni oncogeni, Mutazioni apolipoproteine

Malattie infettive:

HIV, CMV, HBV, HCV, HPV, HSV, E. Coli, Trypanosoma, Toxoplasma, etc