

Concetti fondamentali della reazione a catena della polimerasi (PCR)



Agenda

Concetti fondamentali della PCR Parte I

Concetti fondamentali della PCR Parte II

Concetti fondamentali della PCR Parte III

Concetti fondamentali di biologia molecolare

Definizione di PCR

Le fasi della PCR

Definizione di PCR in tempo reale

PCR in tempo reale qualitativa

PCR in tempo reale quantitativa

Definizione di melt temperature

Analisi della curva di fusione

Obiettivi di apprendimento

L'obiettivo generale di questo modulo è fornire una comprensione dei metodi di PCR utilizzati con GeneXpert

Al termine di questa formazione, l'operatore sarà in grado di:

- Elencare gli elementi coinvolti nel processo della PCR
- Spiegare il processo della PCR e descriverne le fasi
- Definire la “RT-PCR” (2 possibili significati)
- Descrivere le curve RT-PCR, definire la Ct
- Spiegare in che modo si può eseguire la quantificazione con la RT-PCR
- Definizione della melt temperature
- Spiegare in che modo l'analisi della melt curve consente di identificare la resistenza microbica

Concetti fondamentali della reazione a catena della polimerasi (PCR) – I



Concetti fondamentali di biologia molecolare

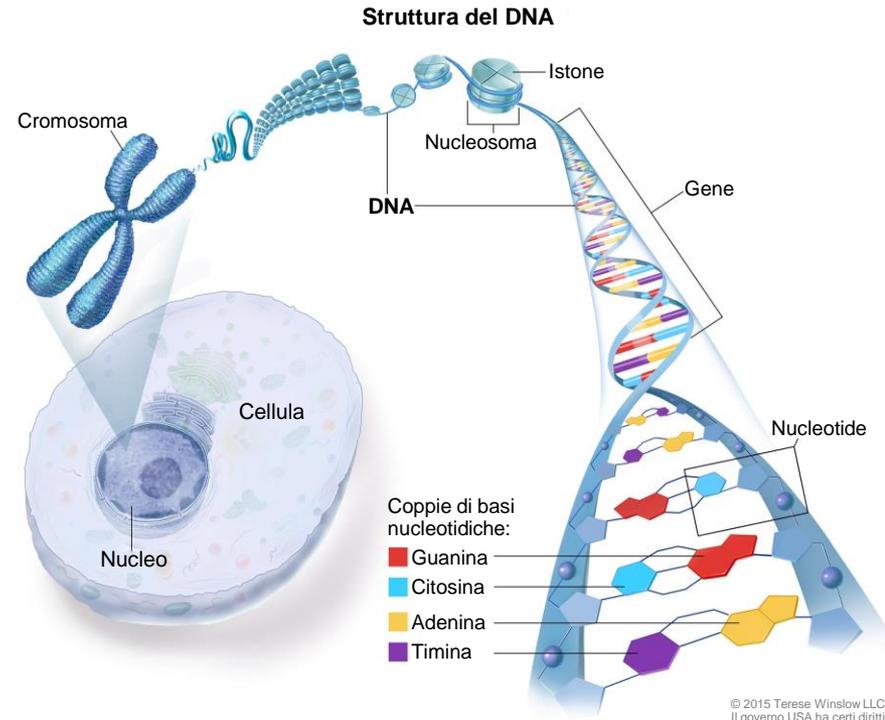
Un breve richiamo



Concetti fondamentali di biologia molecolare

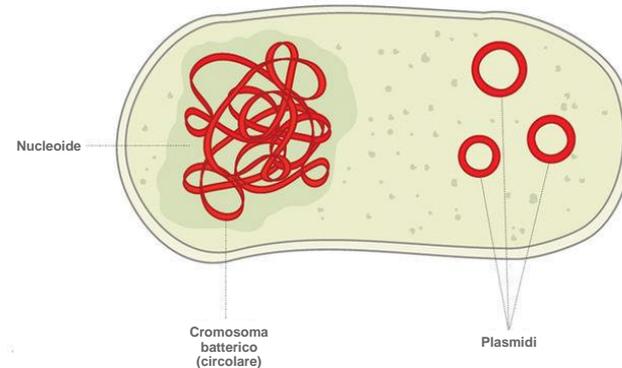
Informazioni genetiche contenute nel DNA

- Il DNA è costituito da una doppia elica
- Il DNA codifica le informazioni genetiche (geni diversi, informazioni diverse)
- Il DNA è organizzato in una lunga catena che prende il nome di cromosomi
- Nell'uomo, il nucleo delle cellule contiene 23 paia di cromosomi



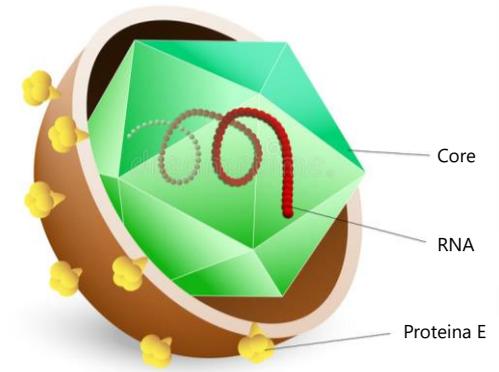
Materiale genetico presente nei batteri

- Nei batteri, le informazioni genetiche sono codificate all'interno del DNA
- La maggior parte dei batteri ha un genoma costituito da una singola molecola di DNA circolare, situata in una regione (non delimitata da membrana) che prende il nome di nucleotide
- Gli elementi genetici extracromosomici come i plasmidi e i batteriofagi spesso determinano resistenza agli agenti antimicrobici, produzione di fattori di virulenza o altre funzioni.



Materiale genetico contenuto nei virus

- Il virus è un piccolo parassita che non è in grado di riprodursi autonomamente, ma si affida ai meccanismi della cellula ospite.
- Il genoma virale si può trovare in svariate forme: RNA o DNA, a singolo o a doppio filamento, lineare, circolare o anche segmentato



Es.: Virus dell'epatite C



“Mattoni” costituenti del DNA

Il DNA è costituito da 4 nucleotidi

- A = adenina
- T = timina
- C = citosina
- G = guanina

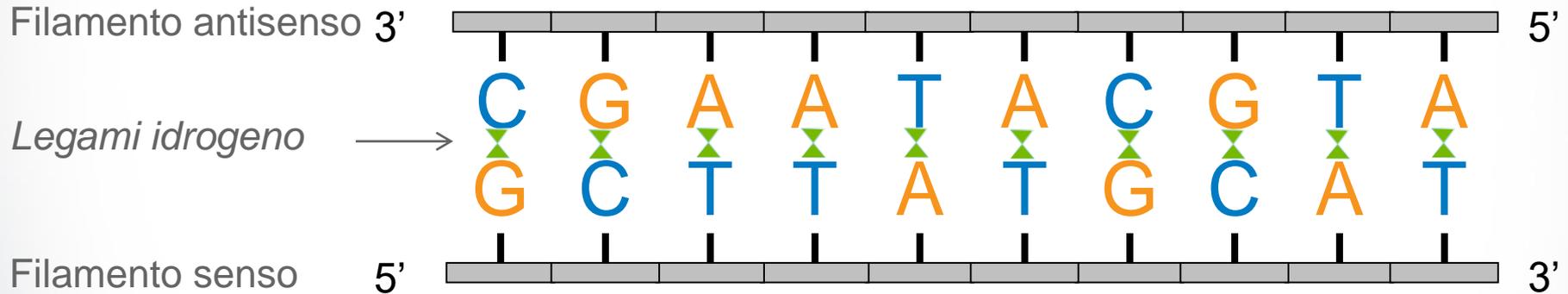


Le 4 basi sono collegate insieme per formare una sequenza (singolo filamento di DNA)



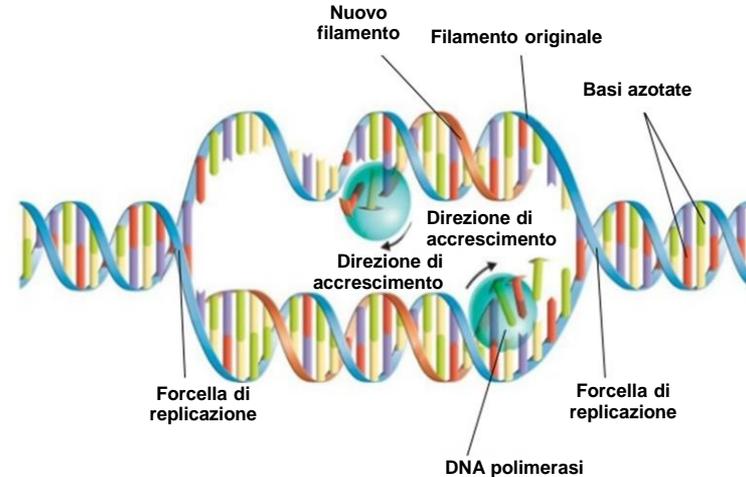
Concetti fondamentali di biologia molecolare

La maggior parte delle molecole di DNA è a doppio filamento e segue un'unica modalità di appaiamento:



Replicazione del DNA

- Il nuovo DNA viene prodotto da enzimi denominati **DNA polimerasi**, che sintetizzano il DNA solo in direzione 5'-3'.
- Un altro enzima denominato primasi produce un **primer** dell'RNA che funge da innesco per la polimerasi.
- Una volta posizionato, il primer dell'RNA viene "allungato" dalla DNA polimerasi che aggiunge i nucleotidi uno alla volta per formare un nuovo filamento di DNA complementare al filamento stampo.



Copyright Pearson Prentice Hall

Definizione di PCR

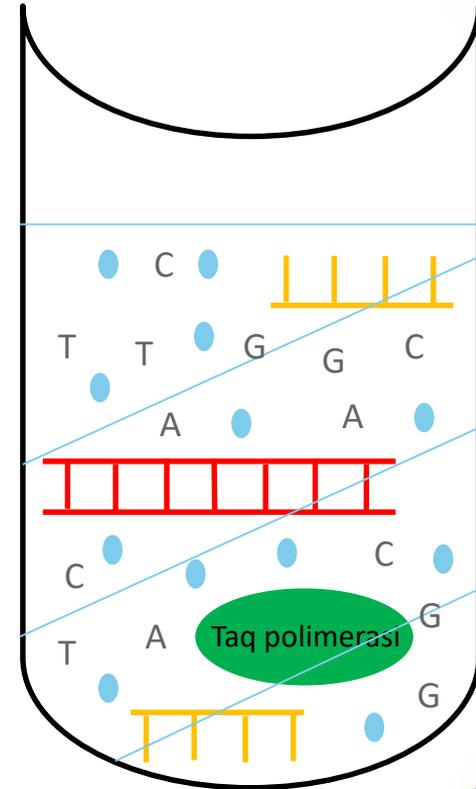


Che cos'è la PCR?

1. La PCR (**reazione a catena della polimerasi**) è una **reazione a catena** che genera più copie di una specifica sequenza di DNA presente all'interno del campione.
2. L'amplificazione del DNA avviene tramite **cicli termici ripetuti**
3. Il numero di copie della specifica sequenza **raddoppia** al termine di ogni ciclo
4. Dopo quaranta cicli, da una singola copia si generano circa duemila miliardi di copie

Componenti di una reazione di PCR

- **DNA template** (gene virale, batterico o umano)
- **dNTP** (miscela di tutti e quattro i nucleotidi necessari a costituire i nuovi filamenti di DNA: A, T, C, G)
- **Primer** (oligonucleotidi costituiti da circa 20 nucleotidi, che si appaieranno al DNA bersaglio)
- **Polimerasi** (Taq polimerasi termostabile presente in natura, che è in grado di agire a una temperatura ottimale di circa 70 °C)
- **Tampone** (Mg²⁺, Tris-HCl, Triton: fornisce le condizioni ottimali per il funzionamento della polimerasi)

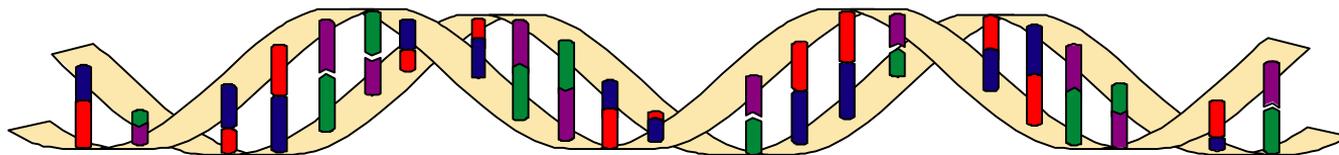


Le fasi della PCR



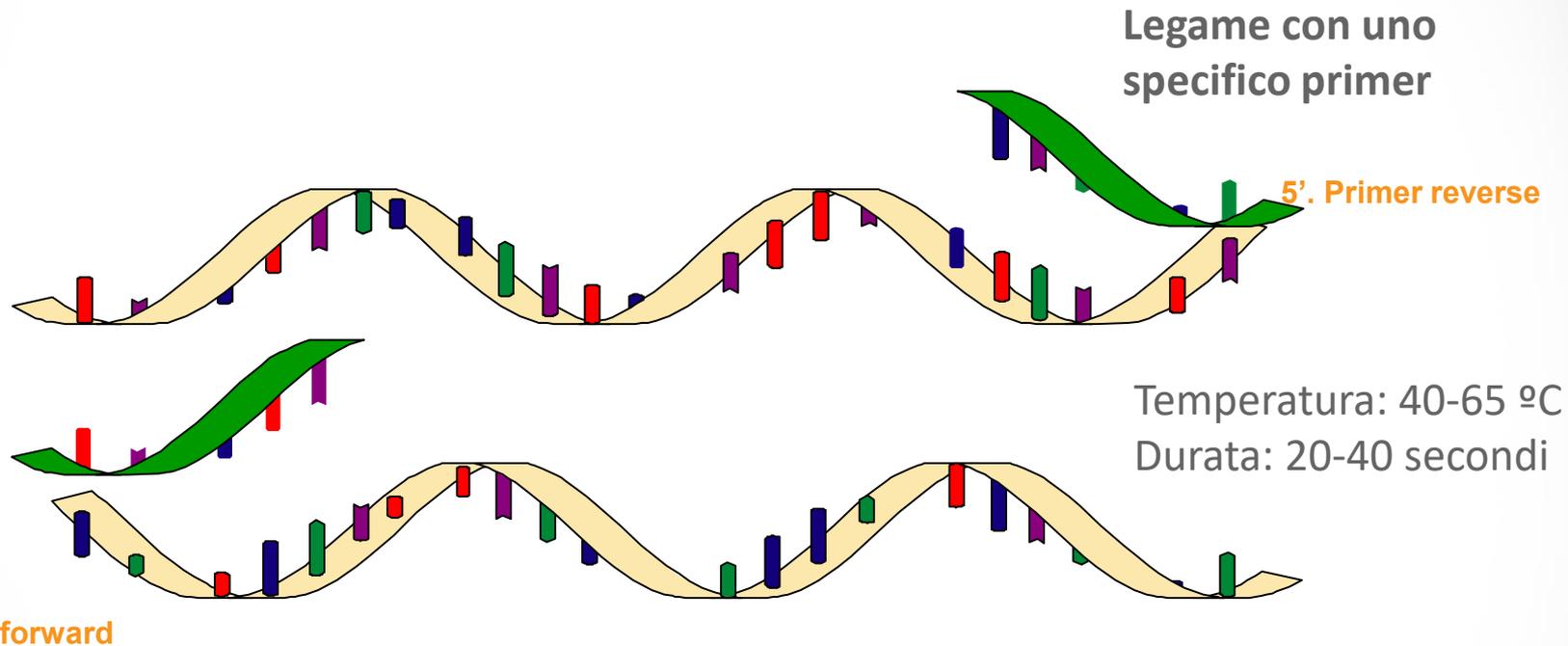
Prima fase di un ciclo di PCR: Denaturazione

Separazione dei
filamenti del DNA



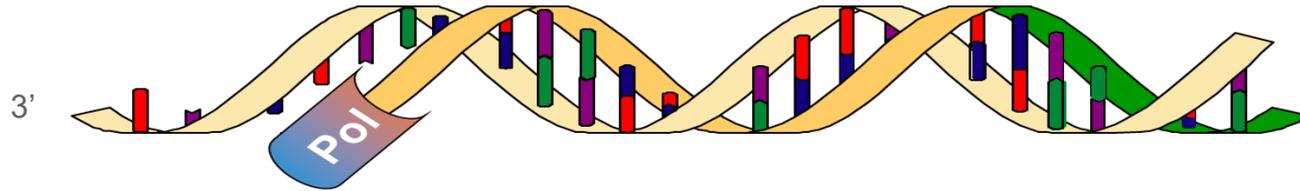
- 90-95 °C
- 20-30 s

Seconda fase di un ciclo di PCR: **Annealing (appaiamento)**



Terza fase di un ciclo di PCR: **Estensione**

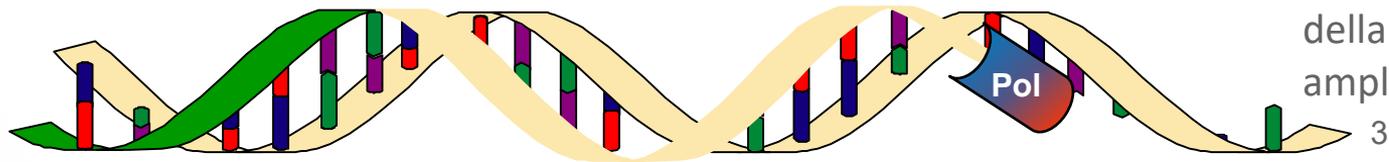
Sintesi dei filamenti di DNA



5' Primer reverse

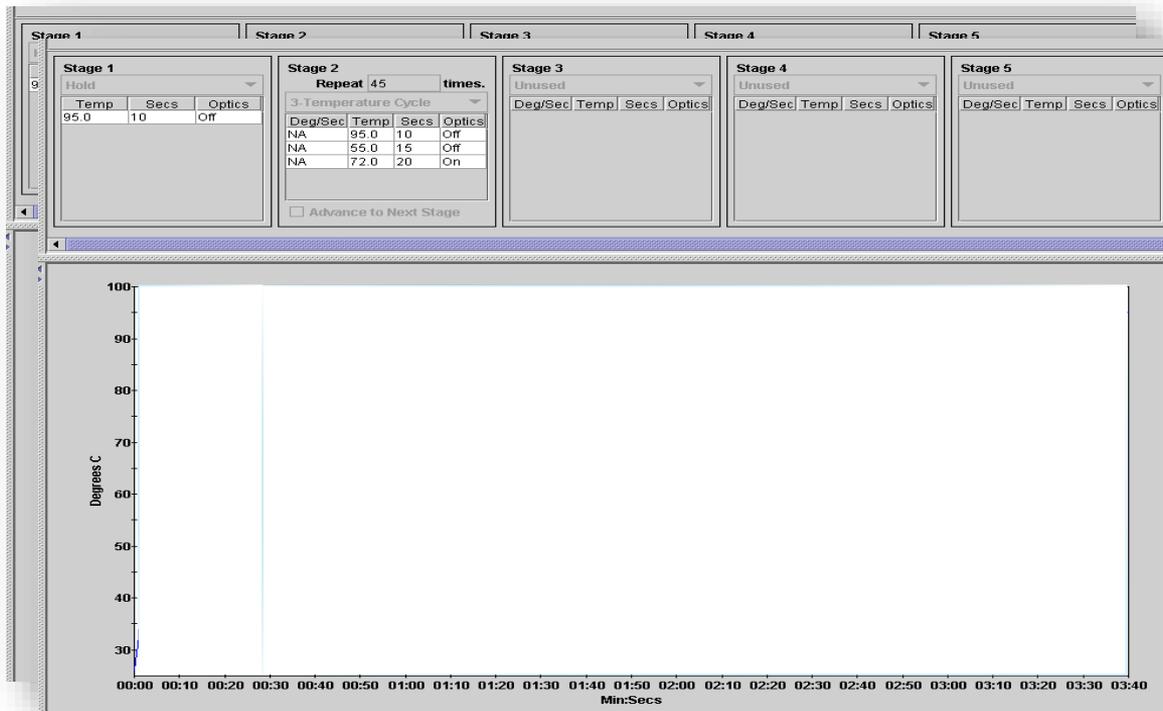
- 60-75 °C

La durata dipende dalle dimensioni della sequenza da amplificare



5' Primer forward

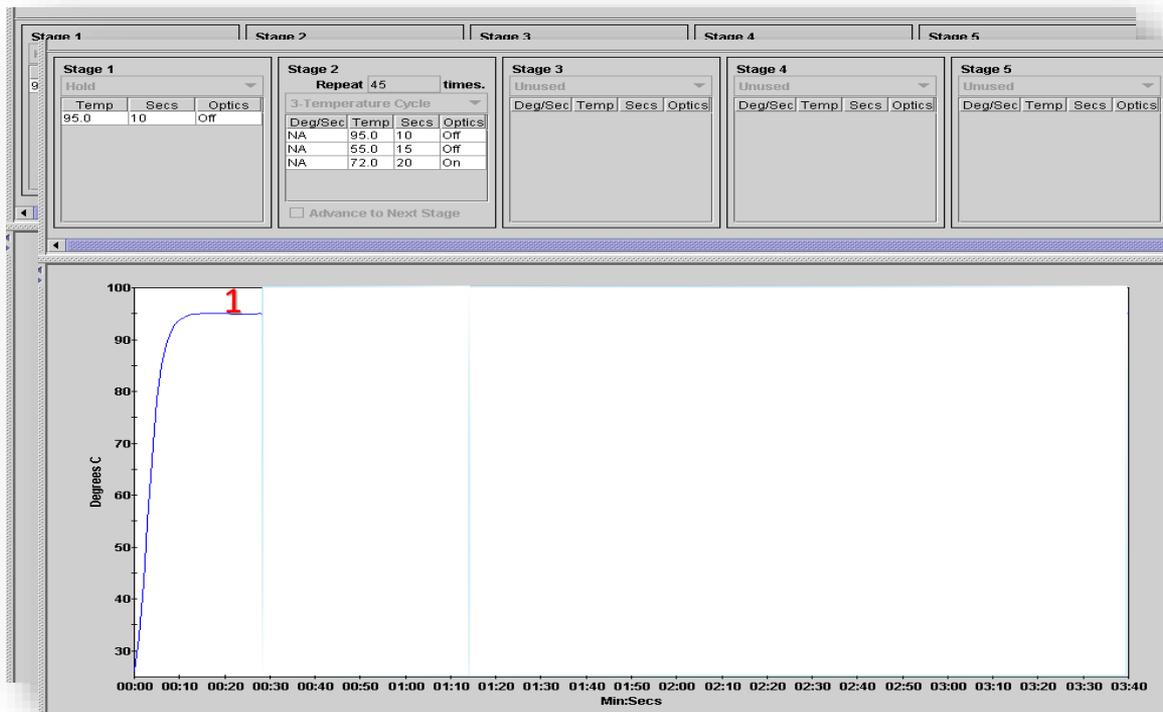
Profilo termico dei cicli di PCR



1. Denaturazione

Nota: una PCR è costituita generalmente da 30-40 cicli

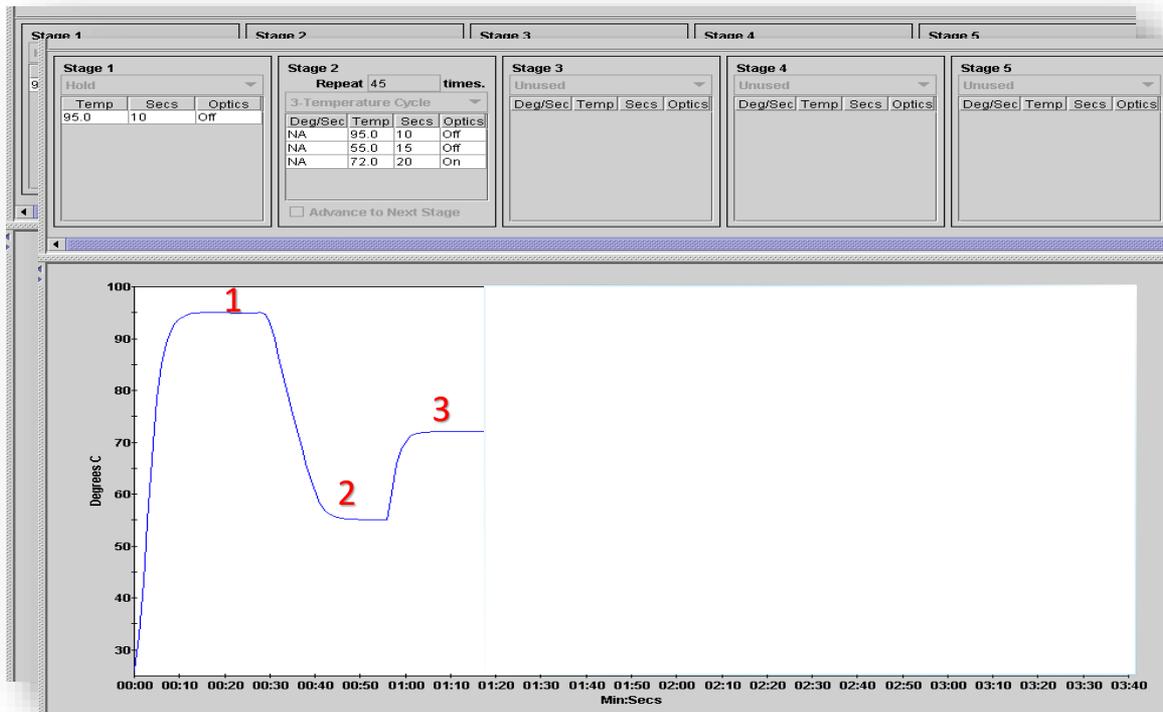
Profilo termico dei cicli di PCR



2. Annealing

Nota: una PCR è costituita generalmente da 30-40 cicli

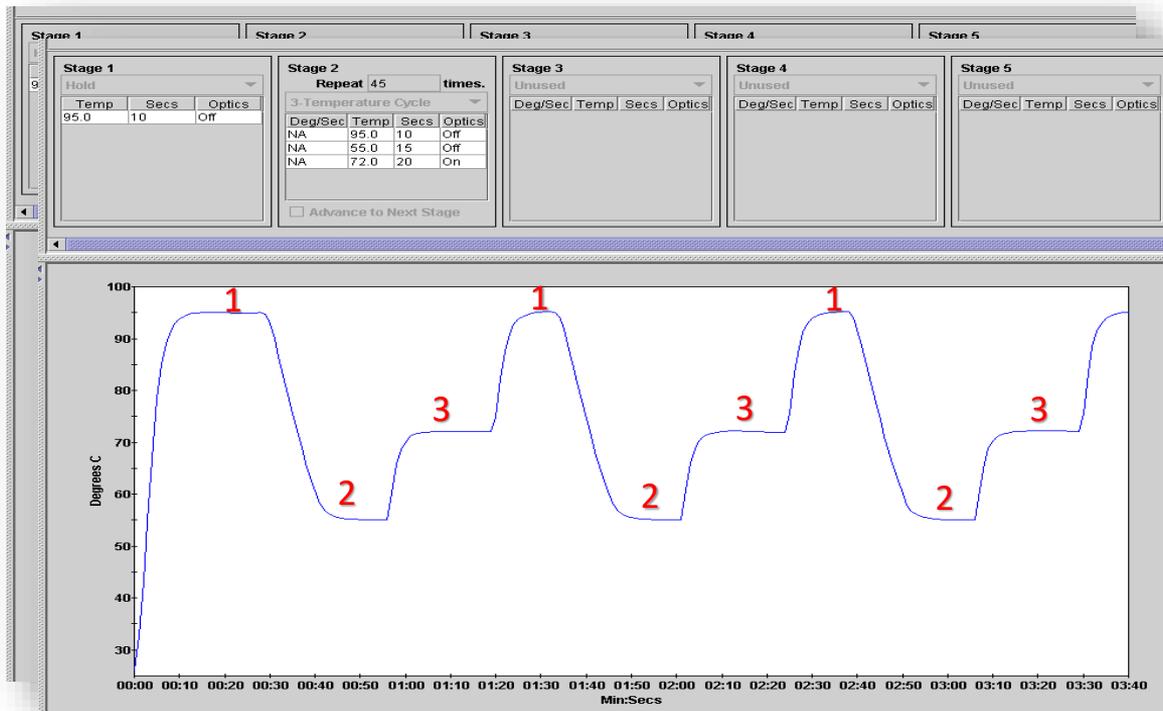
Profilo termico dei cicli di PCR



3. Estensione

Nota: una PCR è costituita generalmente da 30-40 cicli

Profilo termico dei cicli di PCR

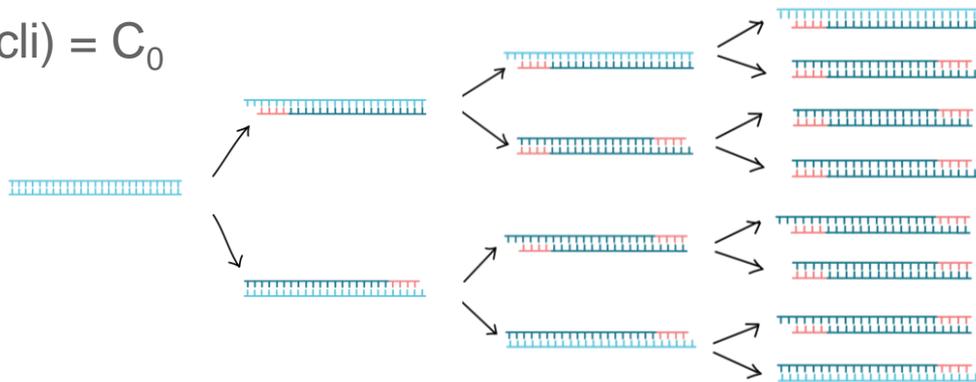


Nota: una PCR è costituita generalmente da 30-40 cicli

Numero di copie di DNA ottenute con la PCR

– **Teoricamente**, il numero di copie di DNA bersaglio raddoppia ad ogni ciclo, ossia il fattore di efficienza della PCR è $E = 2$

- Concentrazione iniziale (0 cicli) = C_0
- Dopo un ciclo: $C_0 \times 2$
- Dopo 2 cicli: $C_0 \times 4$
- Dopo 3 cicli: $C_0 \times 8$
- **Dopo n cicli: $C_0 \times 2^n$**



– **Nella pratica**, questo tasso di replicazione non può essere mantenuto per sempre e tende a diventare meno del doppio, diminuendo progressivamente fino a quando la replicazione non avviene più

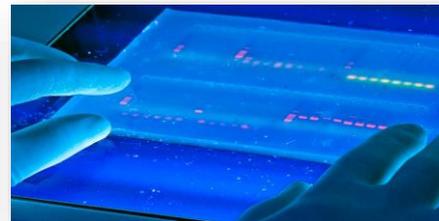
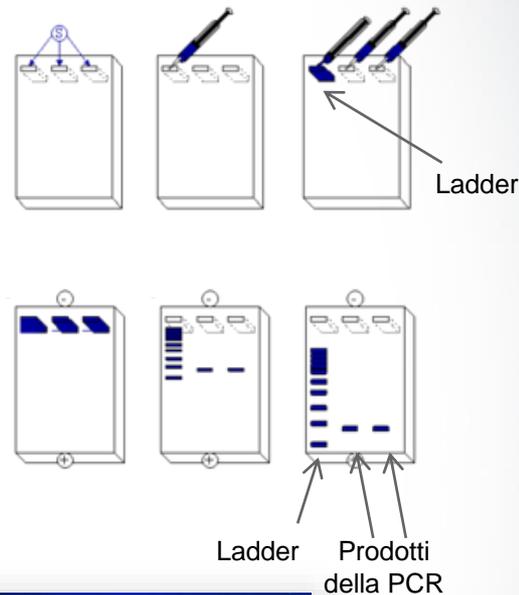
Fattori che influenzano l'efficienza della PCR

- Progettazione del test (fabbricante)
 - Progettazione dei primer/delle sonde
 - Tipo di DNA polimerasi
 - Qualità dei reagenti
 - Miscela master
 - Condizioni impostate per i cicli di PCR: temperature e durata delle fasi
- Fattori pre-analitici (tecnico di laboratorio)
 - Qualità dei reagenti, dovuta alle condizioni di trasporto e conservazione
 - Qualità dei campioni: presenza di inibitori della PCR

Rilevamento dei prodotti all'end-point

Nella PCR classica, il rilevamento viene eseguito all'end-point (fine della PCR)

1. Per calcolare le dimensioni dei prodotti della PCR, una miscela di frammenti di dimensioni note (ladder) viene caricata su un gel di agarosio.
2. Sul gel viene caricato anche il prodotto della PCR
3. Viene applicato un campo elettrico, in modo tale che le molecole con carica negativa possano migrare verso il polo positivo
4. Il prodotto della PCR migra in base alle dimensioni
5. Il DNA viene colorato con etidio bromuro, visibile sotto una lampada UV
6. Se nel campione è presente il bersaglio che stiamo cercando, sarà presente anche un prodotto della PCR delle dimensioni attese





Grazie.

www.Cepheid.com

