

Real Time PCR: Principi e Chimiche Fluorogeniche

M. Favarato

Medicina di Laboratorio

UOS Biologia Molecolare - Ulss13 Mirano

Cenni Storici

Prima dell'avvento della PCR l'analisi molecolare si avvaleva di varie tecniche:

- Southern blotting (1975): permise il rudimentale mappaggio di geni
- sequenziamento di DNA (1978): richiedeva il clonaggio di geni in vettori
- la costruzione di *library* di geni e il loro screening richiedeva molti mesi di lavoro

Cenni Storici

Le basi teoriche della PCR furono descritte già negli anni '70 da Gobind Khorana et al (1971 - J Mol Biol 56, 341-346),

Suscitò particolare interesse solo nella metà degli anni '80 quando **Kary Mullis** descrisse una tecnica che consentiva di ottenere grosse quantità di DNA di geni a copia singola dal DNA genomico.

Cenni Storici

J. Mol. Biol. (1971) **56**, 341-361

Studies on Polynucleotides

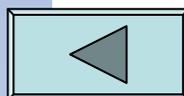
XCVI.† Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerases

**K. KIKUYA,‡ E. OHTSUKA,§ R. KLEFFE,‡ I. MOLINEUX ||
AND H. G. KHORANA ||**

*Institute for Enzyme Research of the University of Wisconsin
Madison, Wisc. 53706, U.S.A.*

(Received 20 July 1970)

Repair replication of short synthetic DNA's corresponding to parts of the gene for the major yeast alanine transfer RNA has been studied. The enzymes used were the *Escherichia coli*, *Morococcus luteus* and T4 DNA polymerases, similar results being obtained with all the three enzymes. The DNA's used (Fig. 1) were: four double-stranded DNA's with the termini containing the 5'-hydroxyl group protruding by one, three, four or ten nucleotide units and two single-stranded DNA's 28 units long which are capable of folding back on themselves. The aspects investigated were: (1) completion of repair, (2) the minimum size of the polynucleotide chains required as primers and those which can serve as templates and (3) the minimum size of the primers which can abolish hairpin formation so as to give the "normal" repair replication. Repair replication of DNA's (DNA-I to DNA-IV; Fig. 1) was characterized to be essentially complete. The minimum size of the primer for repair replication of an extended single-stranded deoxypolynucleotide was ascertained to be about five to seven units long, while the primers required to overcome the hairpin formation in DNA-V and DNA-VI were found to be about twelve

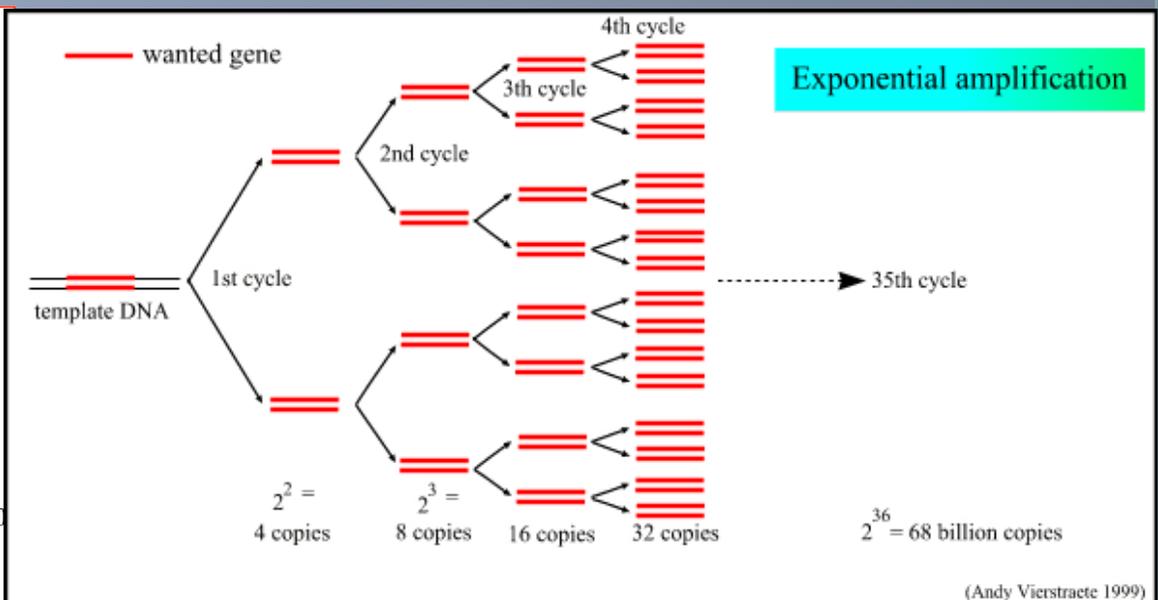
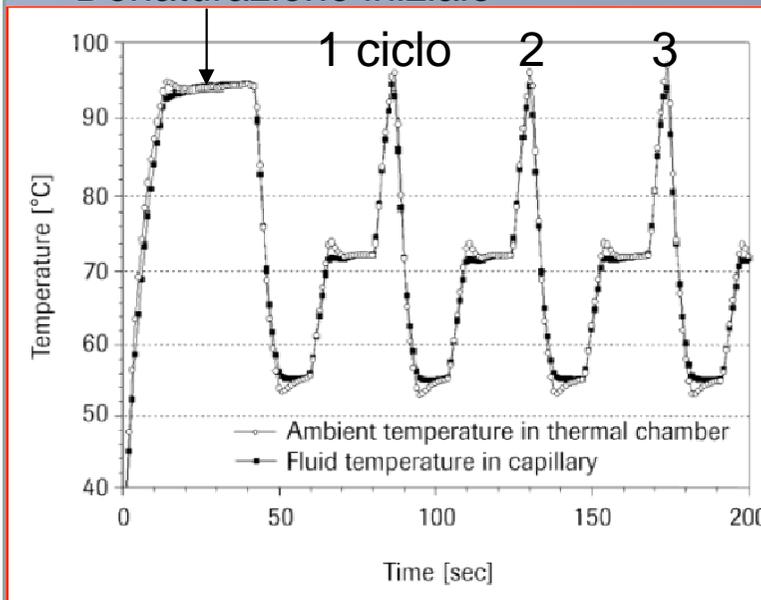


Cenni Storici

- La procedura iniziale prevedeva l'utilizzo del **frammento di Klenow dell'enzima DNA polimerasi di E.Coli** che veniva aggiunto fresco ad ogni ciclo di amplificazione: questo enzima essendo termolabile veniva infatti inattivato durante il passaggio di denaturazione del DNA.
- L'avvento della **Taq DNA polimerasi** da *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al 1988) ha notevolmente facilitato l'automazione di tale procedura e ha permesso di lavorare a temperature di annealing e di estensione (72°C) molto più elevate, aumentando così la stringenza dell'ibridazione fra primer e templatato e quindi la specificità del prodotto amplificato.

PCR: reazione enzimatica *in vitro*

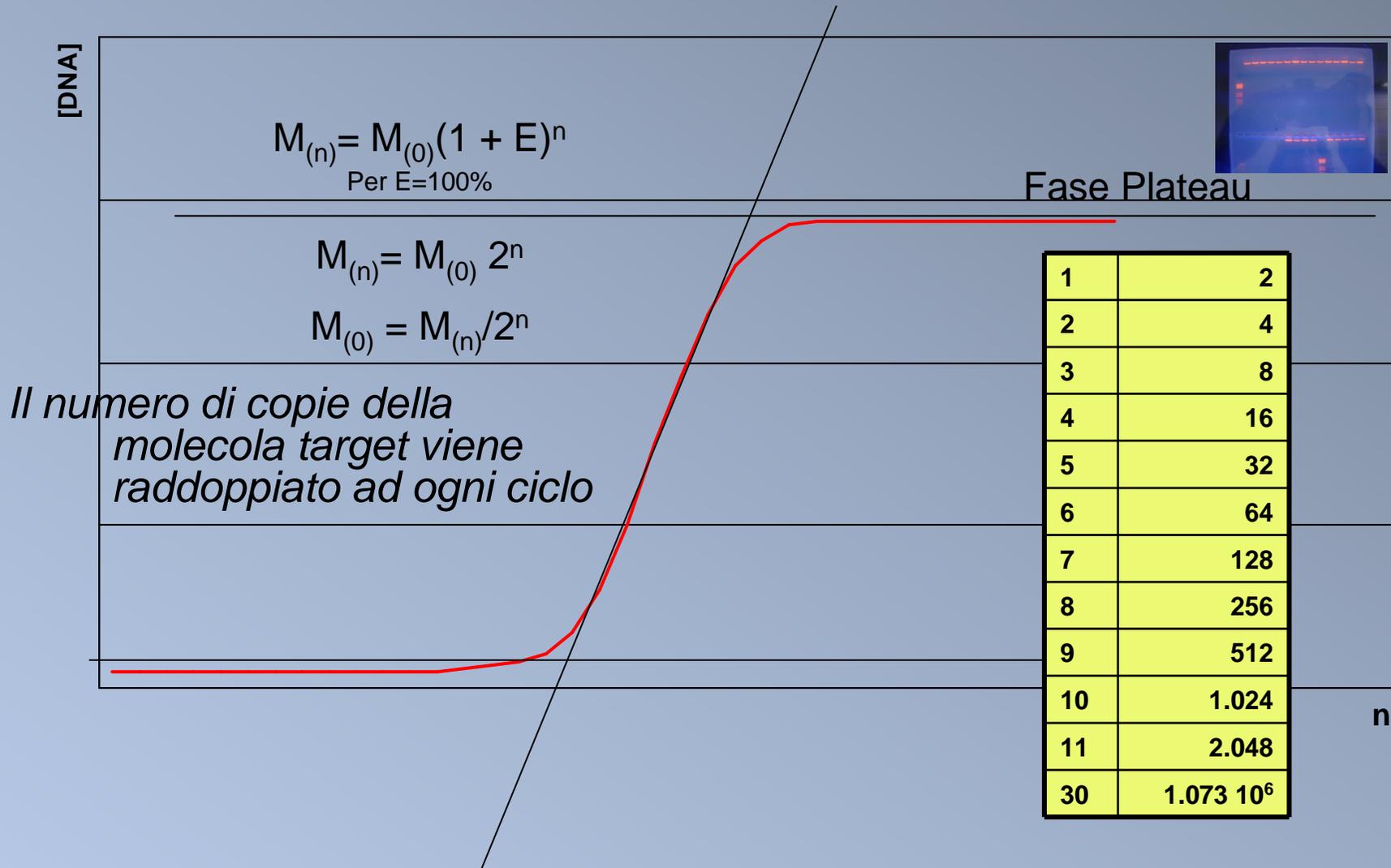
Denaturazione iniziale



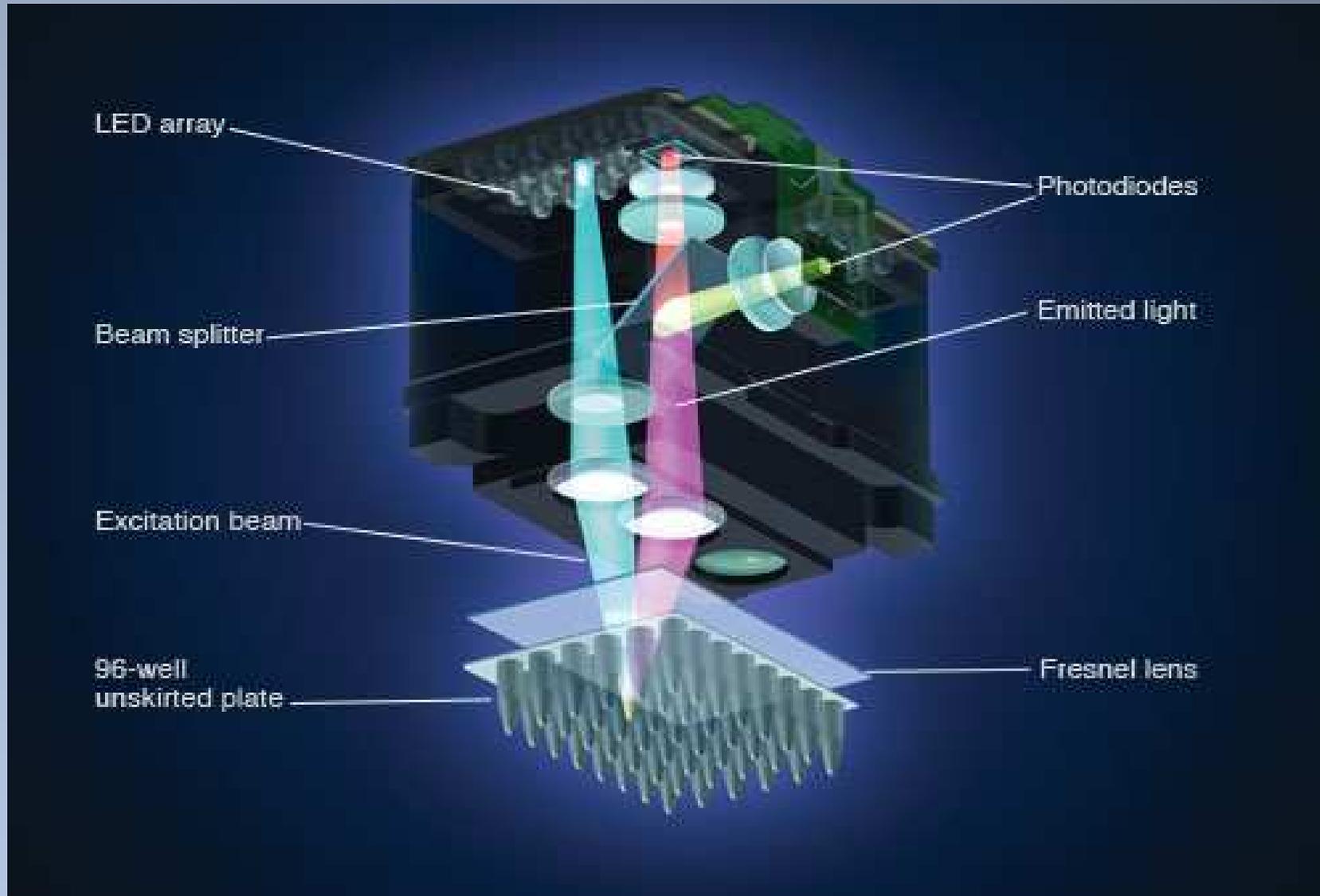
La procedura di PCR prevede l'uso di oligonucleotidi sintetici complementari alle regioni 3' del segmento di DNA target.

Ibridano su strand opposti del template e sono orientati con le loro estremità di fronte l'uno all'altra, così che la sintesi ad opera della Taq (5' → 3') si estende attraverso il segmento di DNA.

Cinetica di Amplificazione



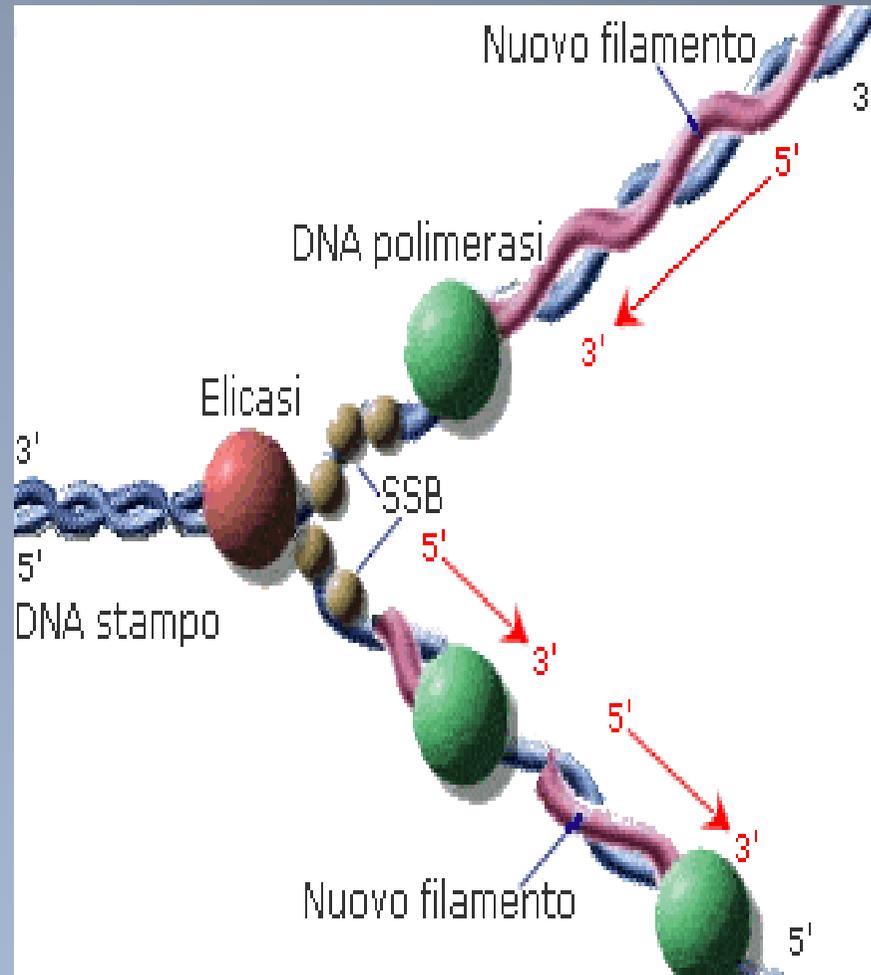
Real Time PCR



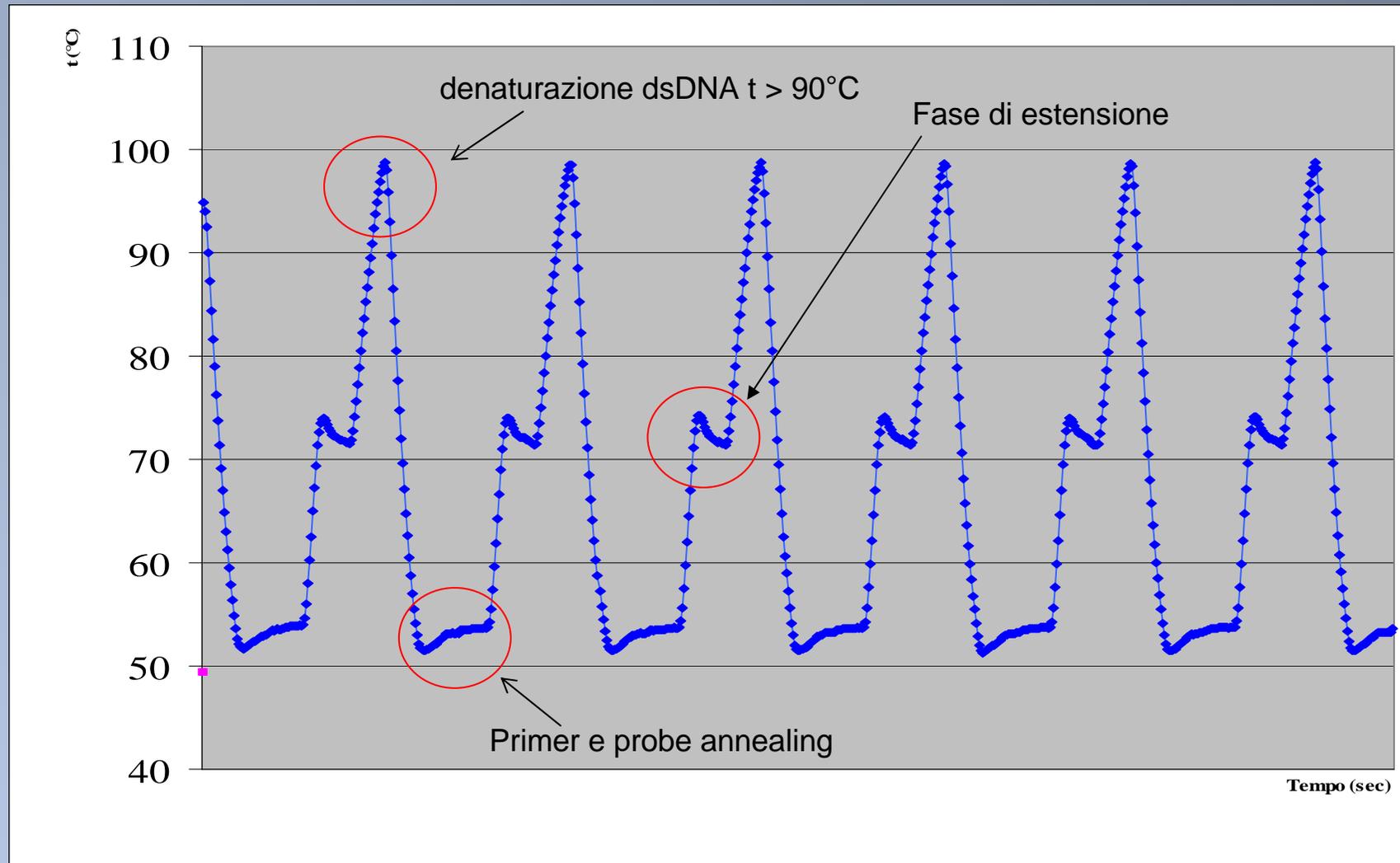
Amplificazione ciclotermica in tempo reale (*PCR cinetica*)

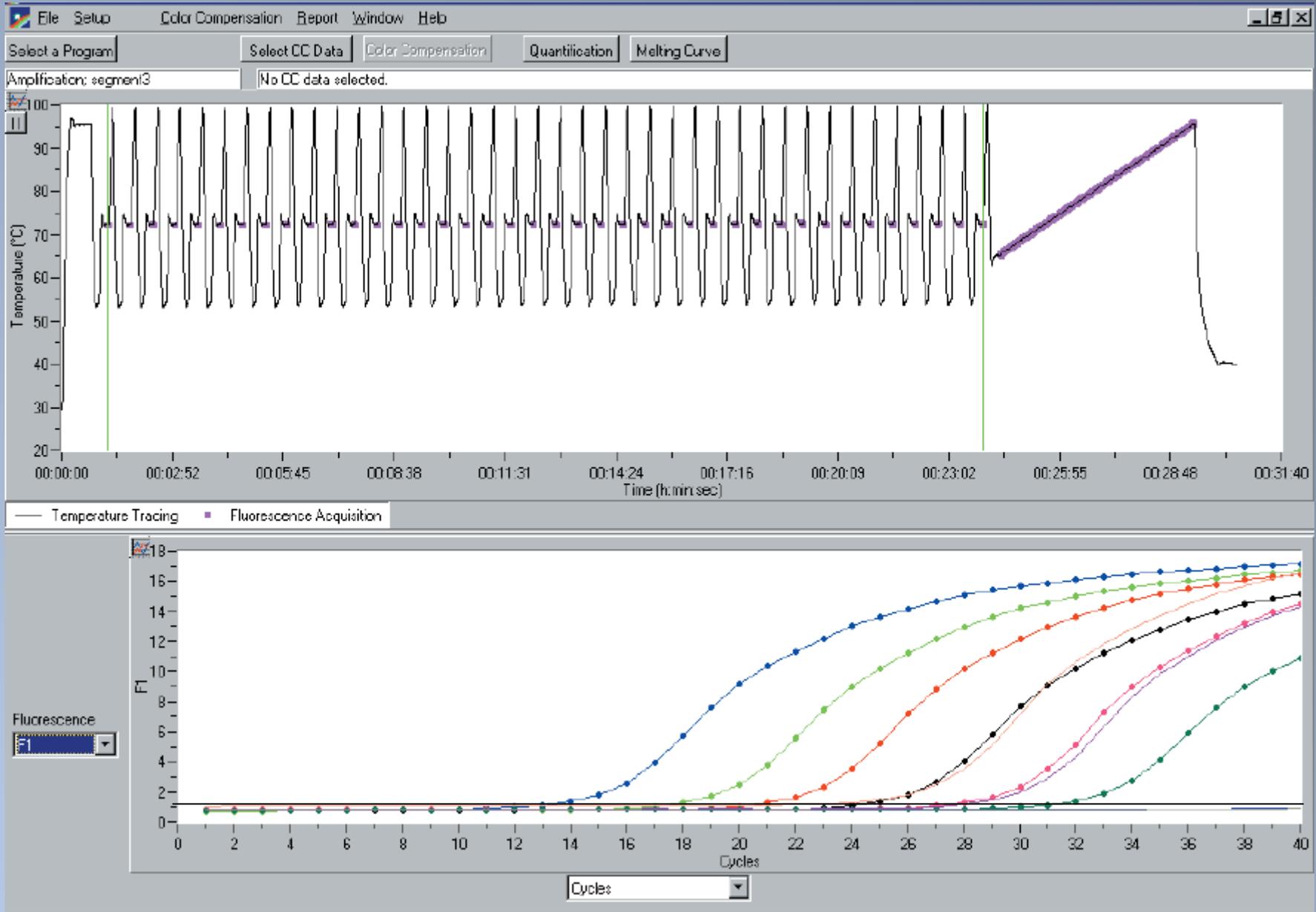
La PCR cinetica consente:

- Di rilevare l'amplicone nello stesso momento in cui si forma;
- Presenza nella mix di reazione di leganti fluorescenti o oligonucleotidi marcati con fluorofori, in grado di emettere un segnale la cui intensità è in rapporto molare con l'amplicone formato in quell'istante.



PCR Cinetica

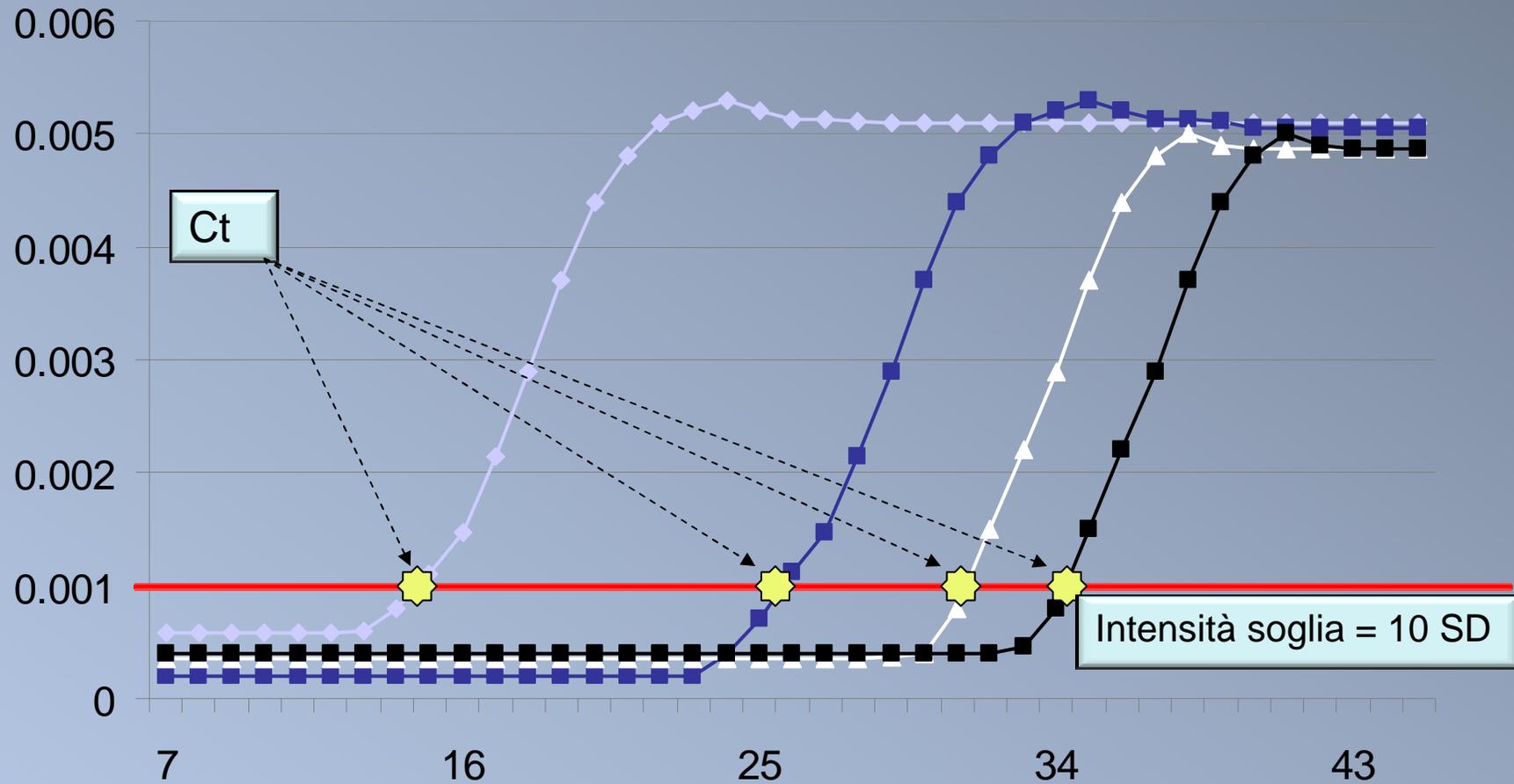




PCR real time

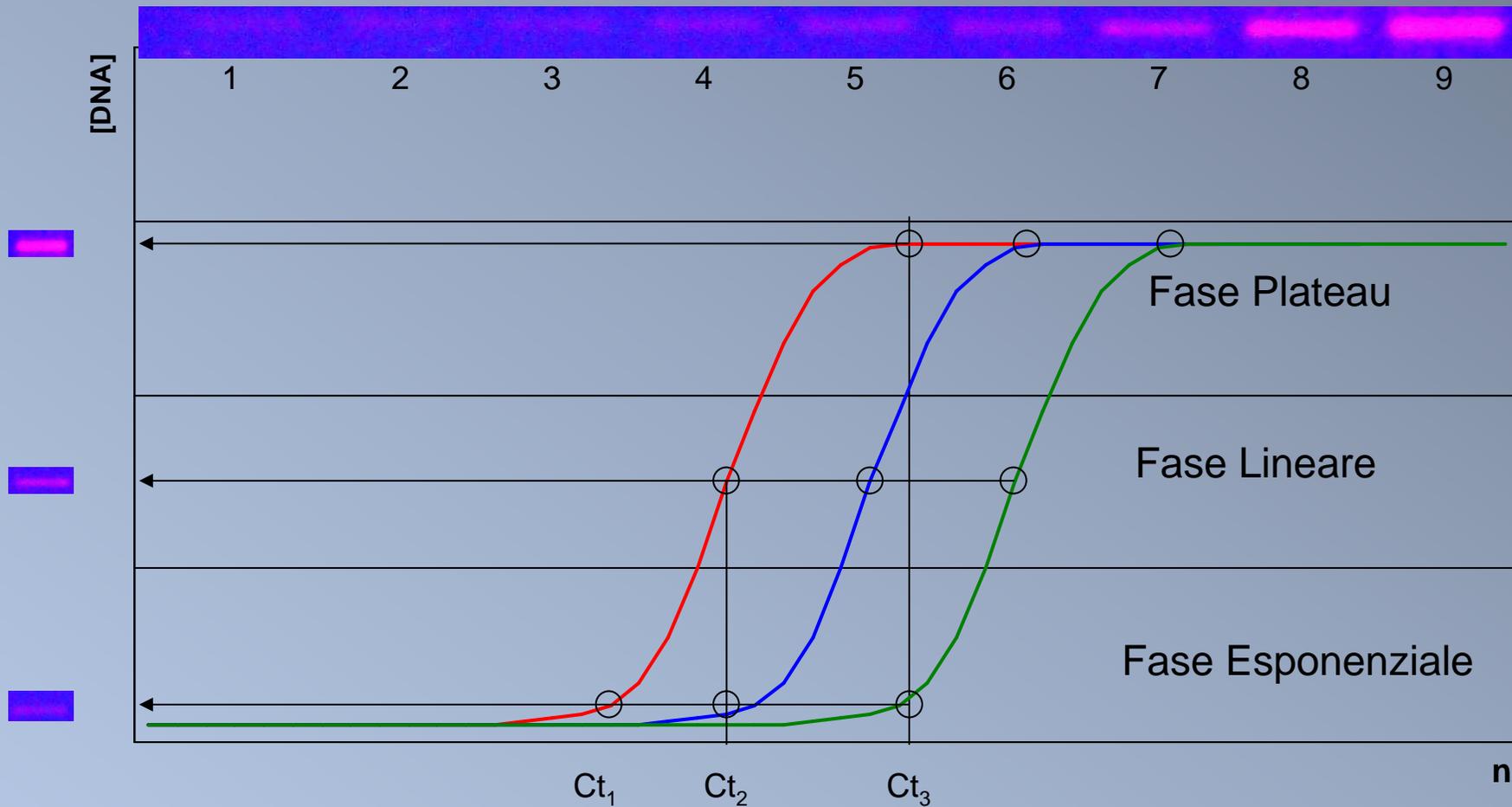
- Dopo un dato numero di cicli amplificativi tutte le reazioni tendono a plateau.
- Non esiste più linearità nella lettura di tipo quantitativo.
- Lettura sarà tanto più lineare quanto più precocemente sarà possibile evidenziare il prodotto amplificato.
- Il momento ideale per la lettura quantitativa è quello in cui l'intensità di fluorescenza è minima ma discriminabile dal rumore di fondo

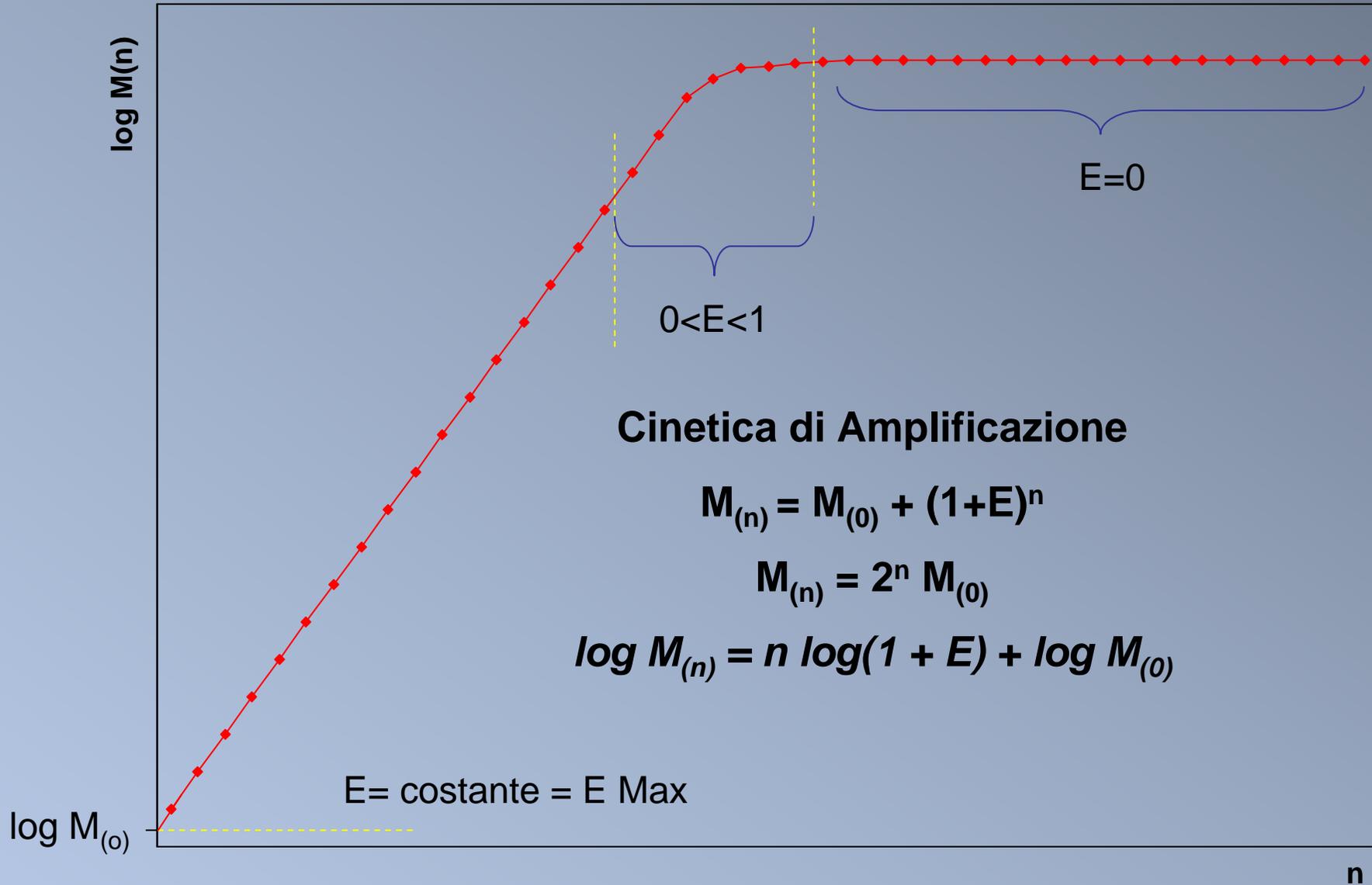
PCR Real Time

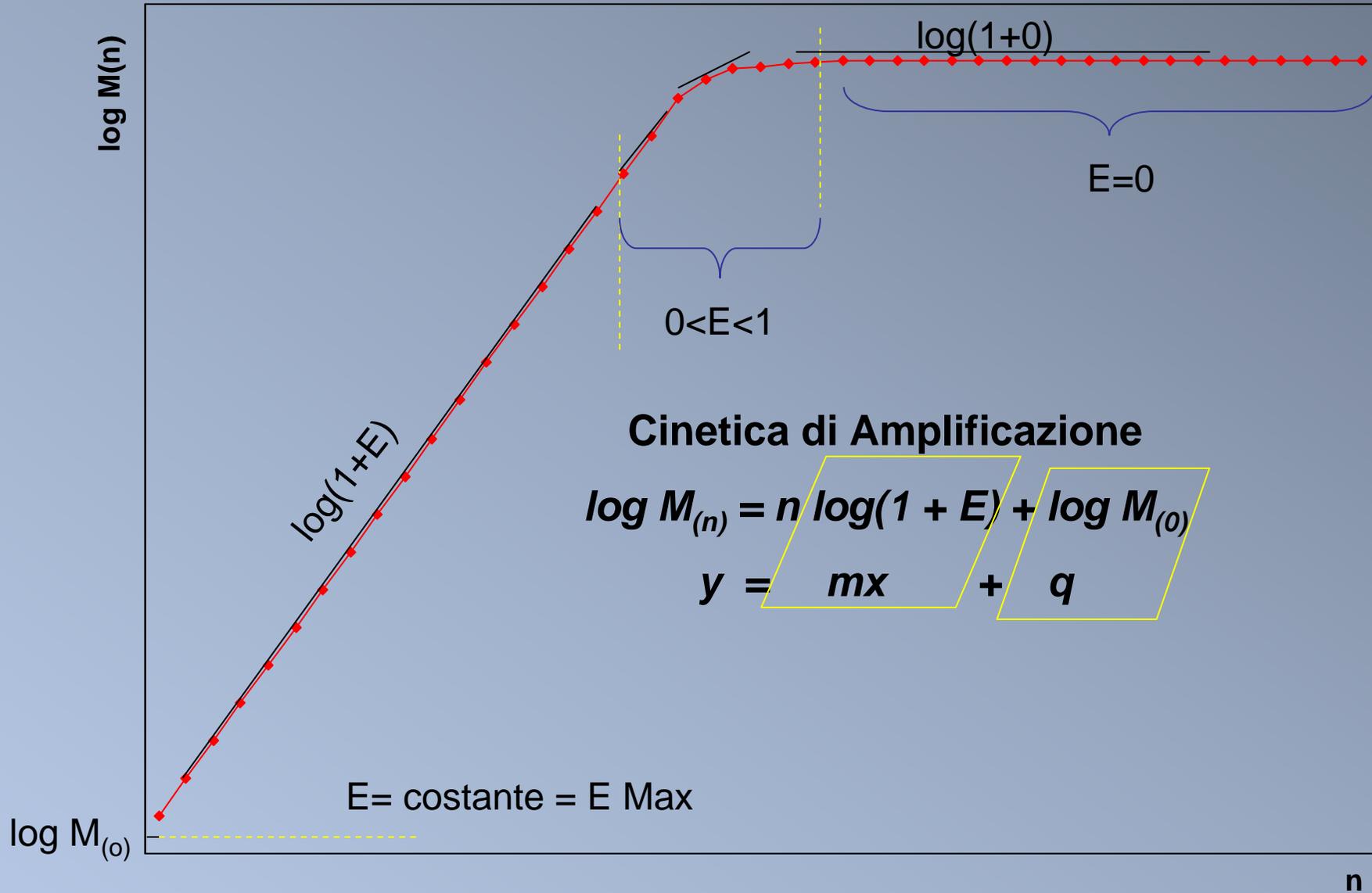


PCR real time

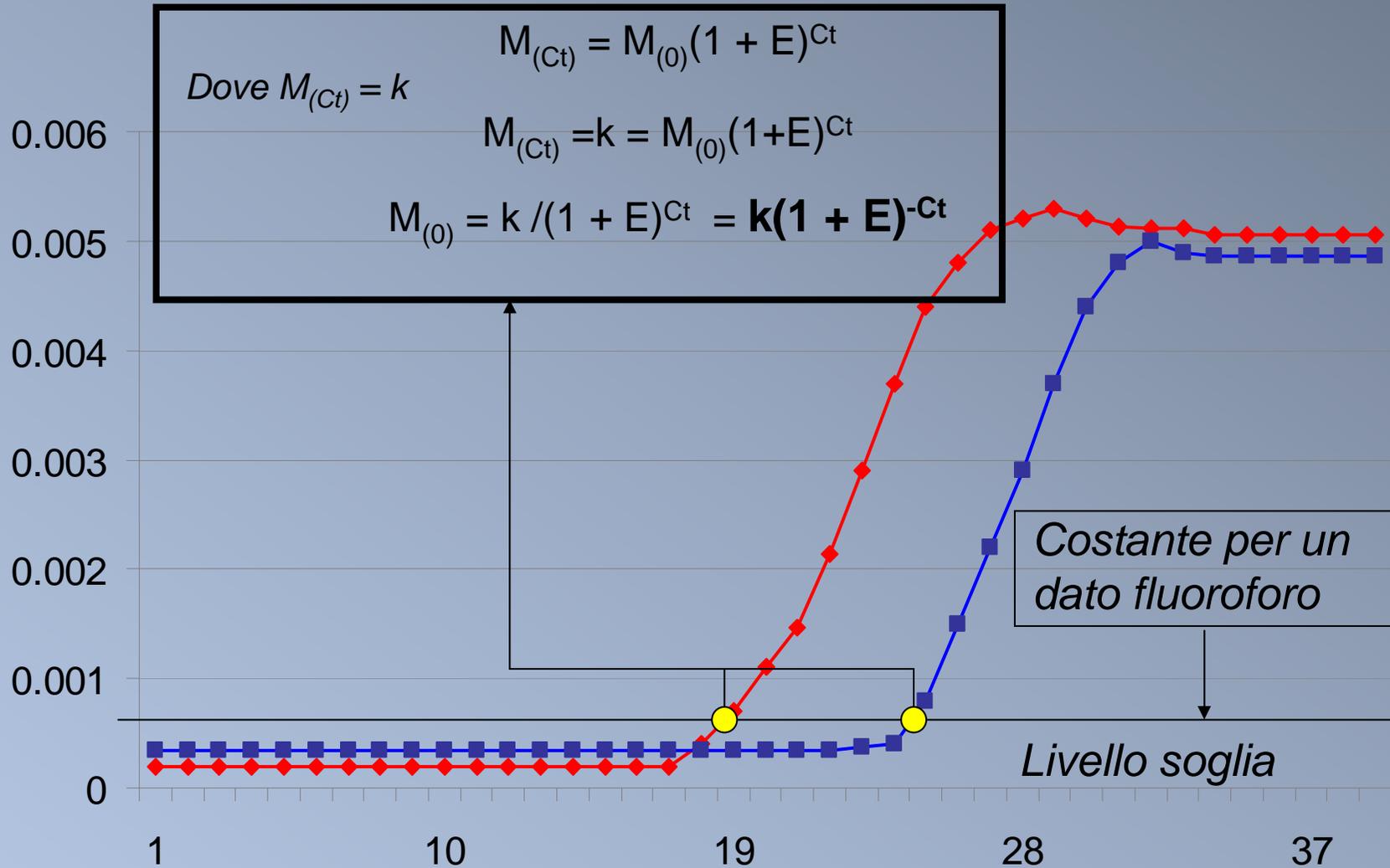
- La PCR in tempo reale nasce con caratteristiche di tecnica fondamentale di tipo quantitativo.
- Anche in assenza di una curva di calibrazione il raggiungimento della soglia di fluorescenza dà indicazioni sulla concentrazione del target.
- La soglia di fluorescenza corrisponde a una quantità fissa di acido nucleico per una determinata configurazione del sistema e dal tipo di fluoroforo impiegato
- Noto il ciclo soglia è possibile calcolare la quantità molare di acido nucleico iniziale secondo l'equazione che descrive la cinetica di amplificazione

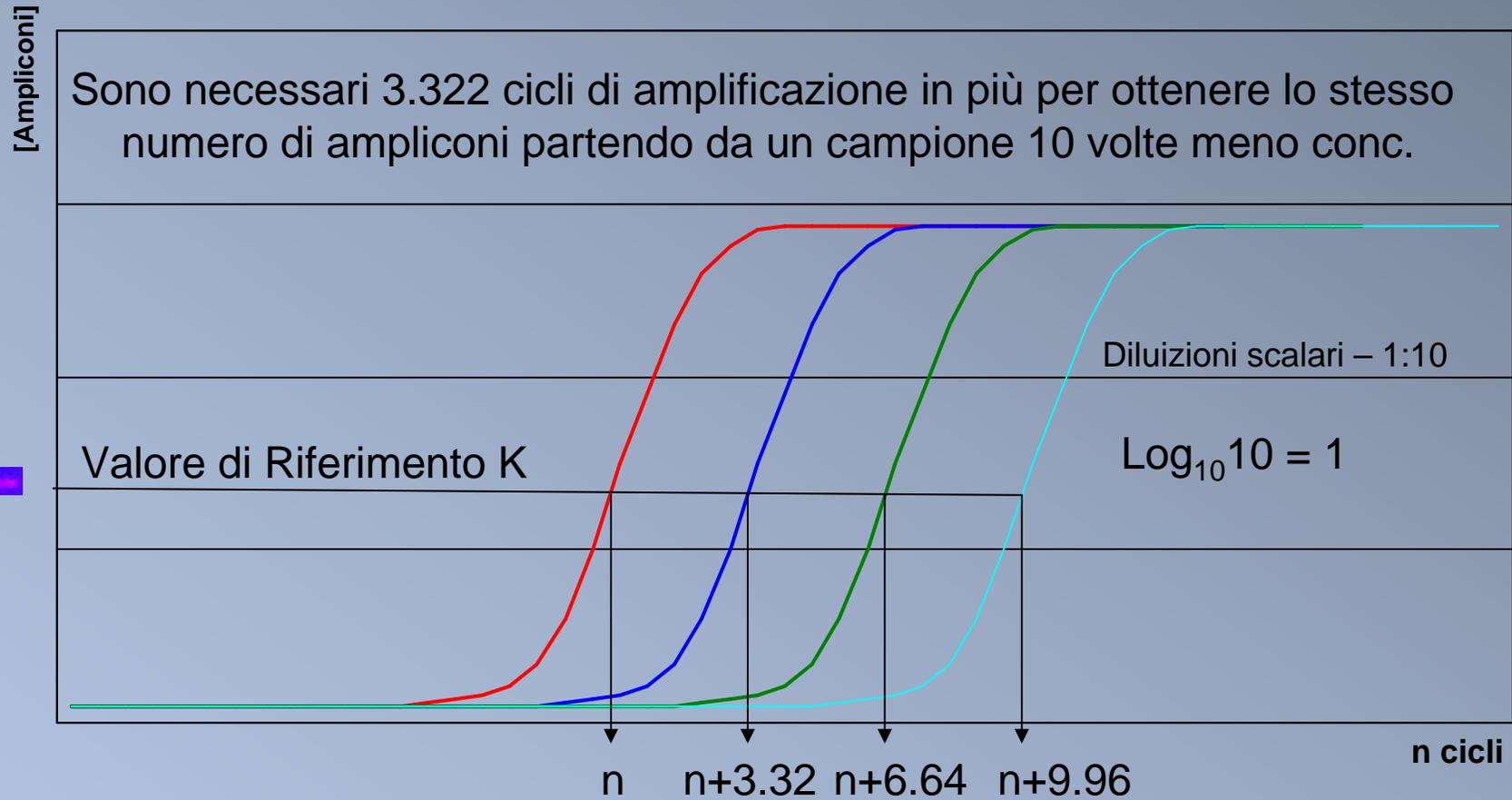






PCR Real Time





PCR in numeri

- I calcoli fatti fino a questo punto si basano sul presupposto che la PCR si comporti in maniera perfetta ovvero che si ottenga il raddoppio del numero di ampliconi ad ogni ciclo amplificativo.
- Raramente si ottiene una PCR con efficienza 2 (100%)

E	2.00	1.97	1.93	1.90	1.83	1.78	1.73
Ct	3.32	3.40	3.50	3.60	3.80	4.00	4.20



File Quantification Report Window Help

Analysis

Fit Points

Second Derivative Maximum

Baseline Adjustment

None

Arithmetic

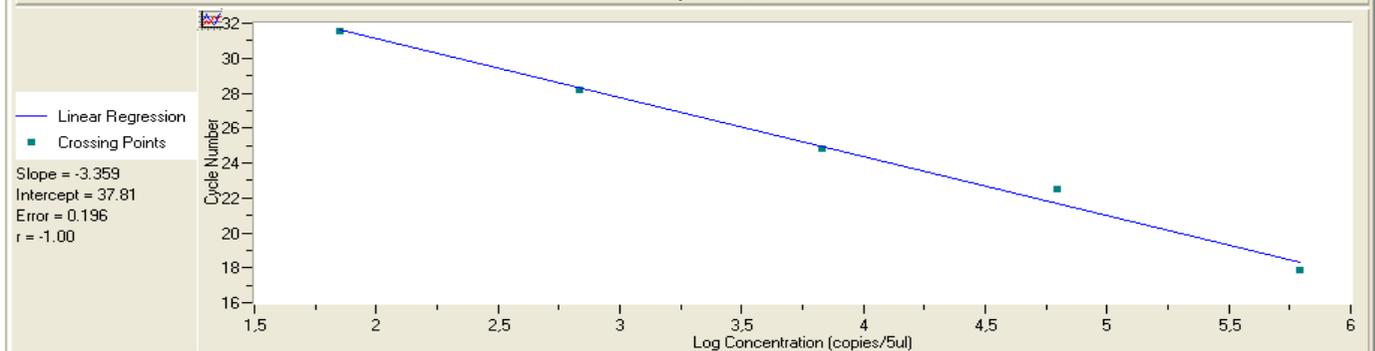
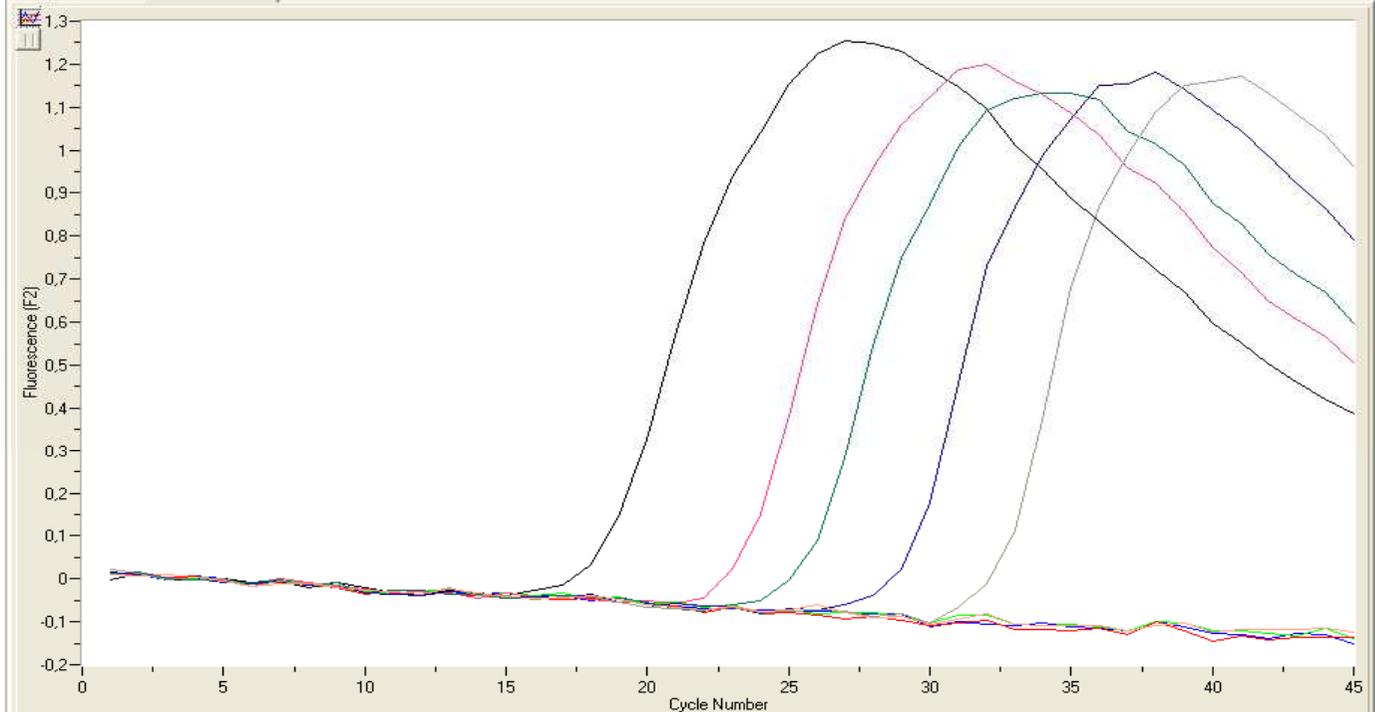
Proportional

Normalized

Analysis Notes

P.	Name	Standard...	Calculat...	Cro...
1	29 593354			
2	29 593355			
3	29 593356			
4	Standard 1	6.200E+05	8.826E+05	17.84
5	Standard 2	6.200E+04	3.550E+04	22.53
6	Standard 3	6.800E+03	7.485E+03	24.80
7	Standard 4	6.800E+02	7.216E+02	28.21
8	Standard 5	7.100E+01	7.458E+01	31.52
9	CTR NEG			

Step 1: Baseline Step 2: Analysis



$$E = 10 \left(-\frac{1}{\text{slope}} \right) - 1$$

$$\log E = \left(-\frac{1}{\text{slope}} \right) \log 10 - \log 1$$

Quando $E = 2$

e

$\log 10 = 1$

$\log 1 = 0$

$$\log 2 = \left(-\frac{1}{\text{slope}} \right) \times 1 - 0$$

$$\log 2 = \left(-\frac{1}{\text{slope}} \right)$$

$$\frac{\text{slope}}{\log 2} \times \log 2 = \left(-\frac{1}{\text{slope}} \right) \times \left(\frac{\text{slope}}{\log 2} \right)$$

$$\text{slope} = \frac{-1}{\log 2}$$

$$10^{\frac{1}{\text{slope}}} = E$$

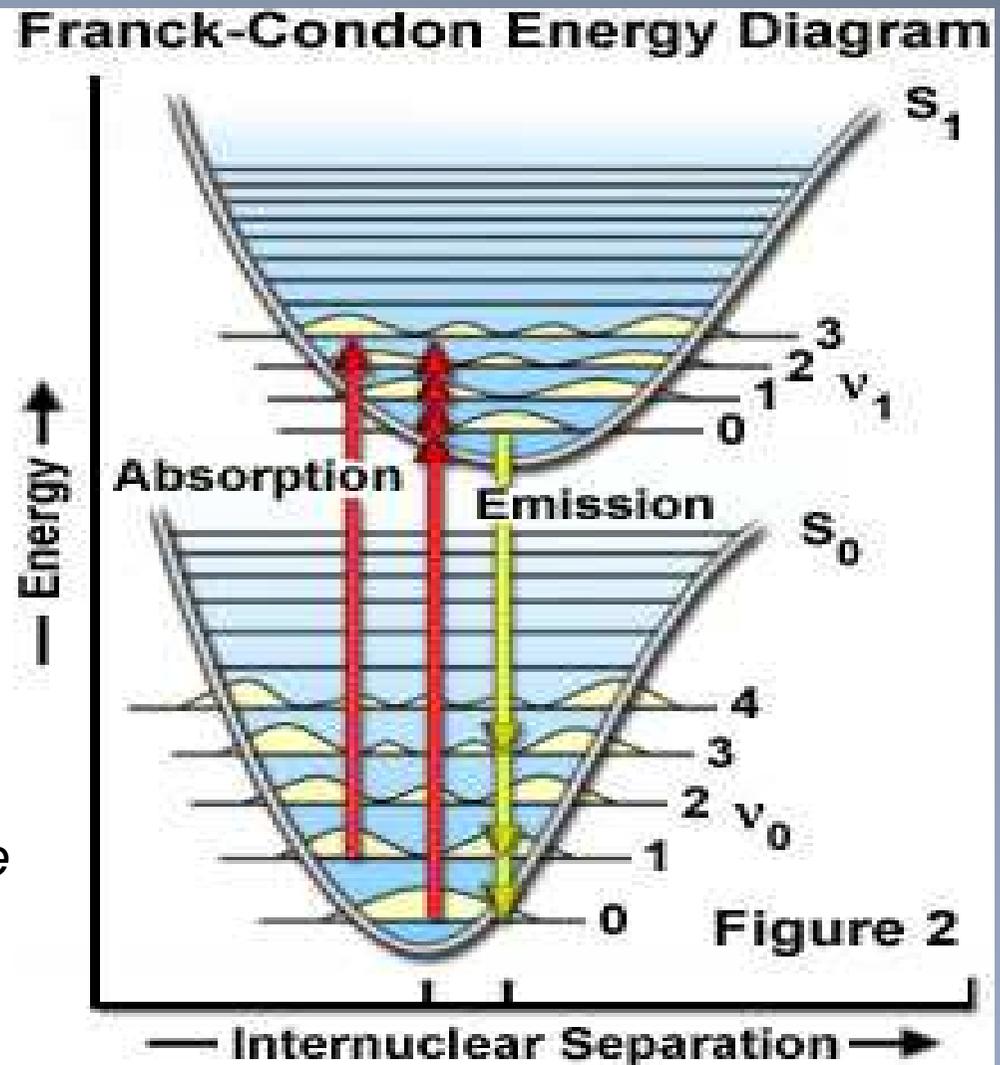
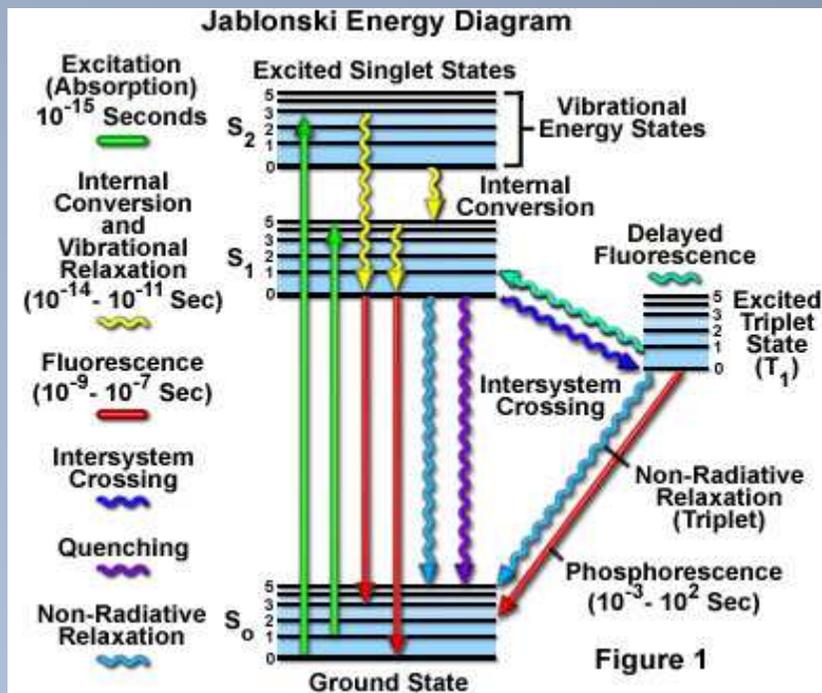
$$E = 10^{-1/-3.359}$$

$$E = 1.98$$

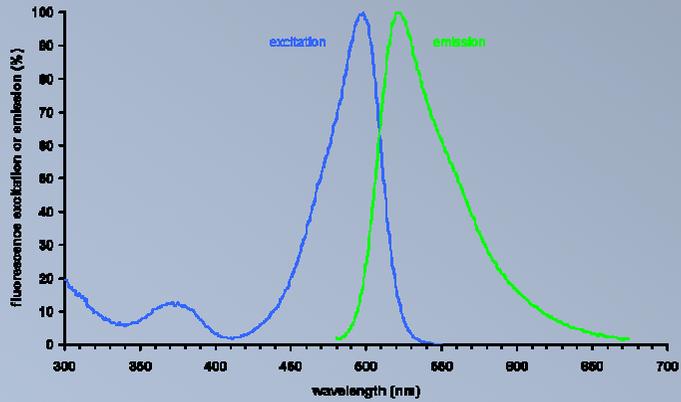
Opzioni fluorescenti nella PCR RT

- Esistono due categorie di “chimiche”:
 1. Impiego di “coloranti” che interagiscono con qualsiasi dsDNA
 2. Impiego di sonde oligonucleotidiche marcate sequenza specifica.
- In generale le chimiche fluorogeniche “specifiche” e “non specifiche” rivelano ampliconi della PCR con uguale sensibilità.

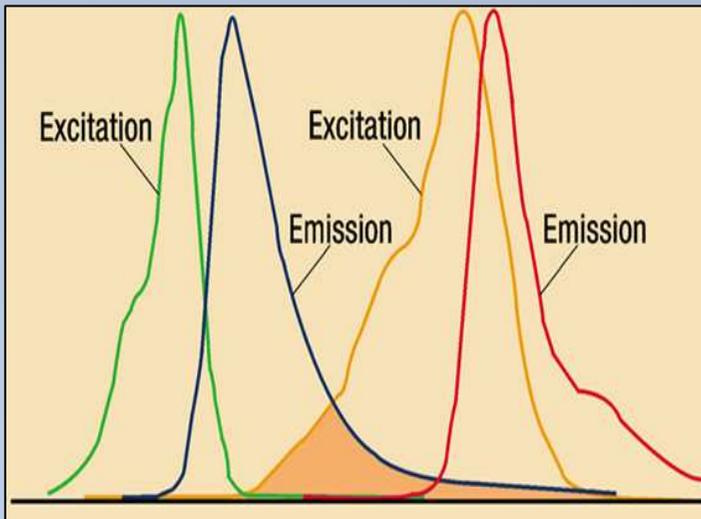
Fluorescenza



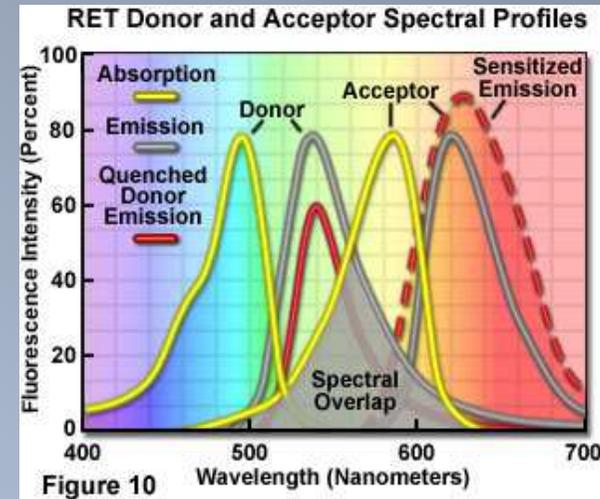
La radiazione emessa ha una energia inferiore rispetto alla radiazione incidente e una lunghezza d'onda maggiore.



Singolo fluoroforo



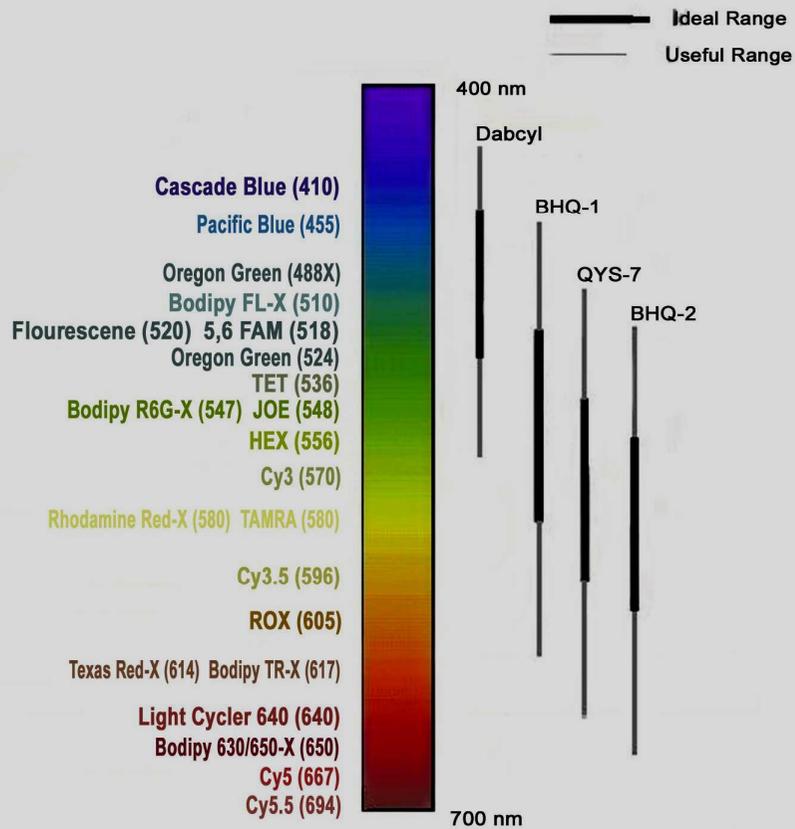
Effetto FRET



FRET-Quenching

Reporter Dyes

Dark Quenchers

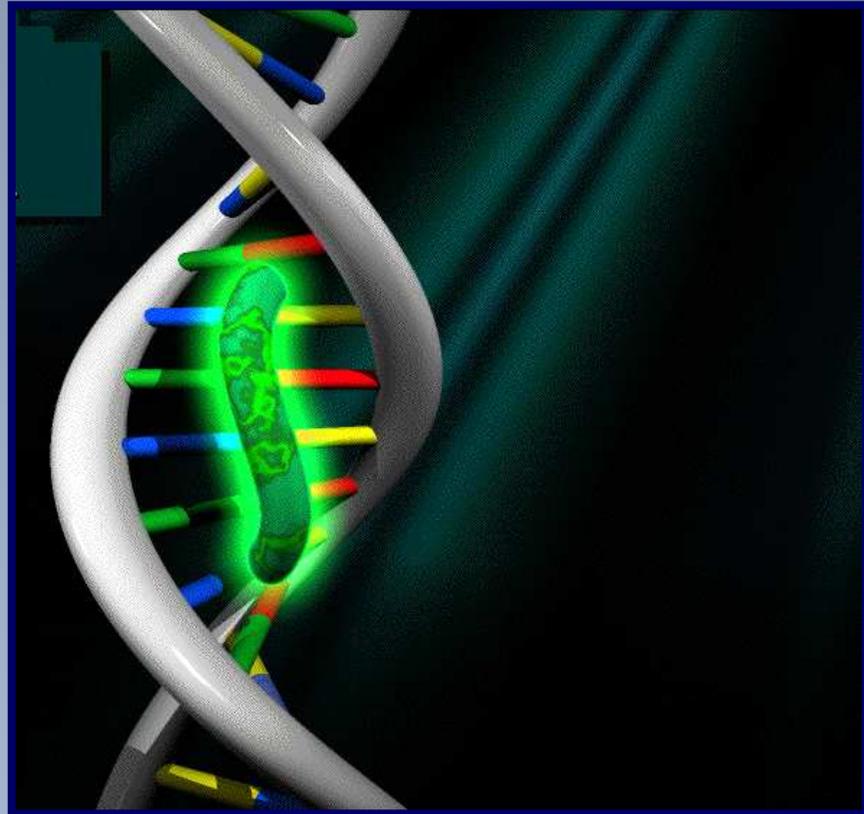
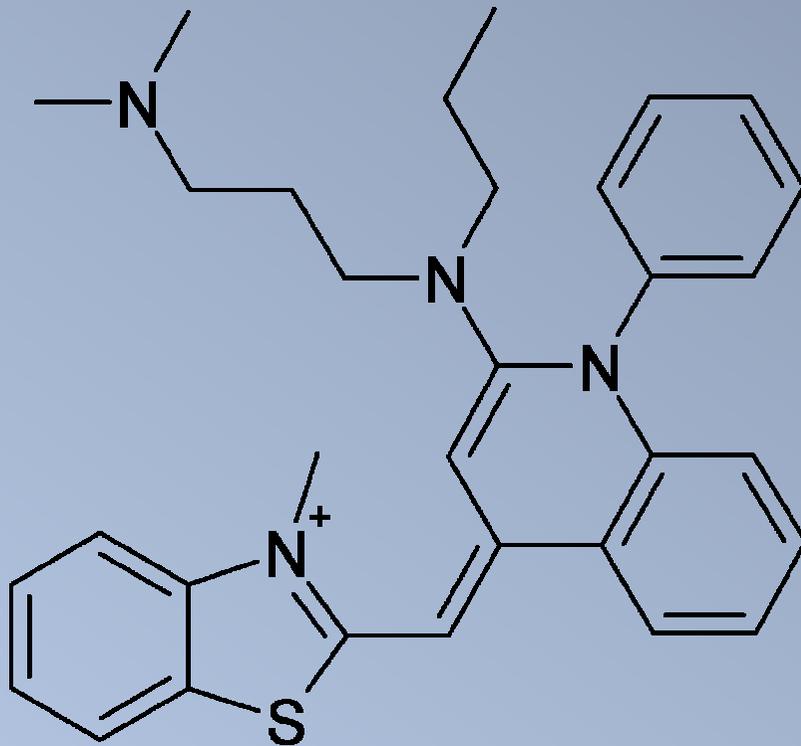


Dye	Quencher
5,6 FAM	BHQ-1/TAMRA
HEX/JOE	BHQ-2
Texas Red/ROX	BHQ-2
Cy5/Quasar670	BHQ-2 (or-3)

6-carbossifluoresceina

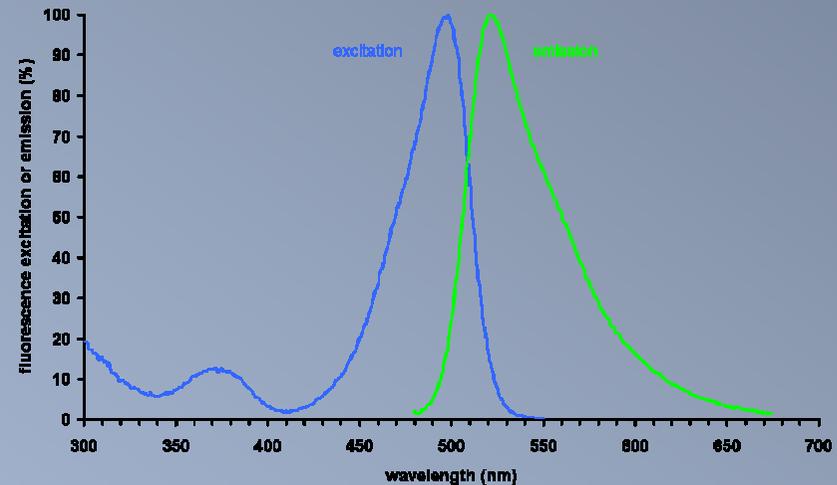
6-carbossitetrametilrodamina

Intercalanti Fluorescenti: SYBR Green I



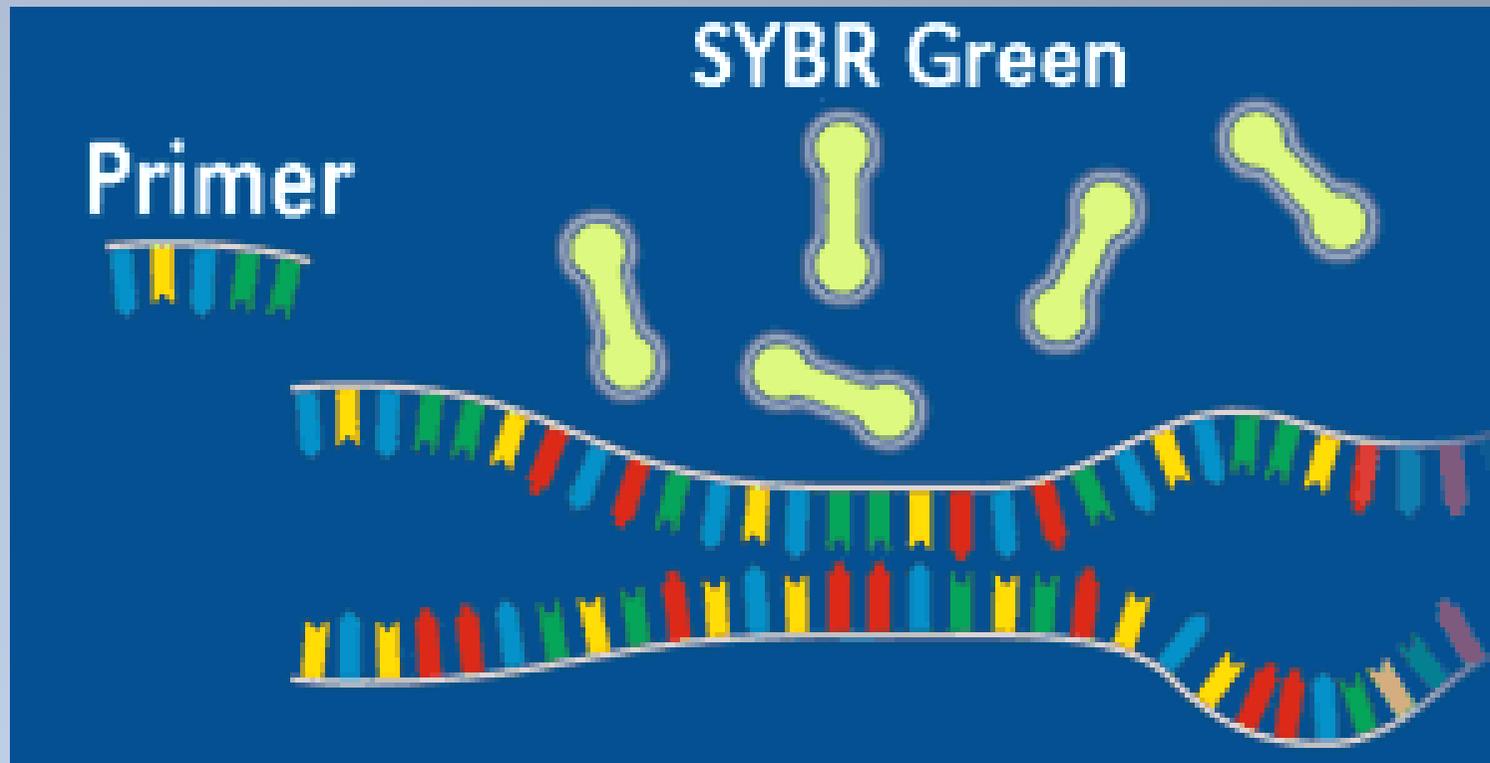
Intercalanti Fluorescenti: SYBR Green I

- Il SYBR Green I è un agente intercalante e si lega preferenzialmente a DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ ed emette luce verde $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$.



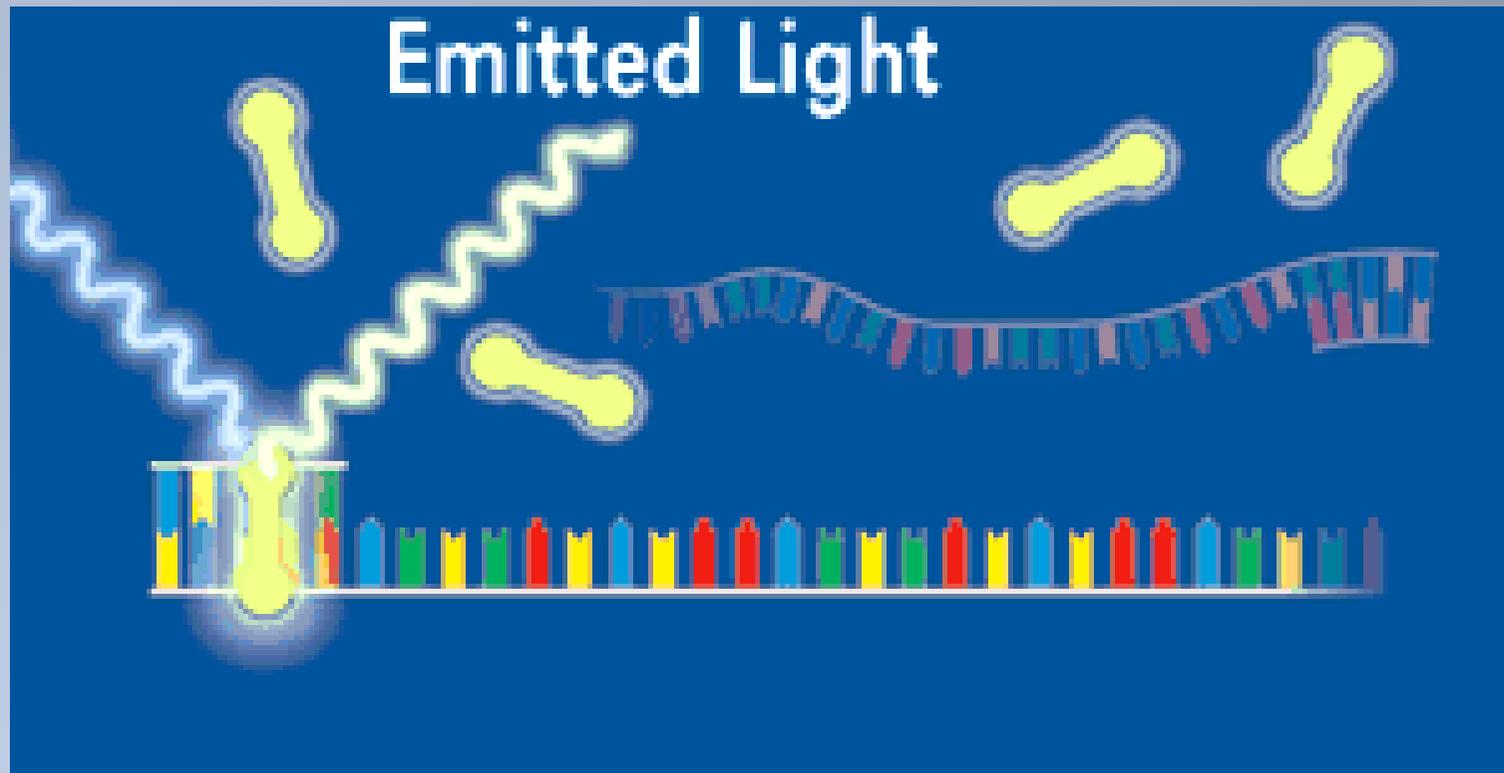
SYBR Green I

- All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente.



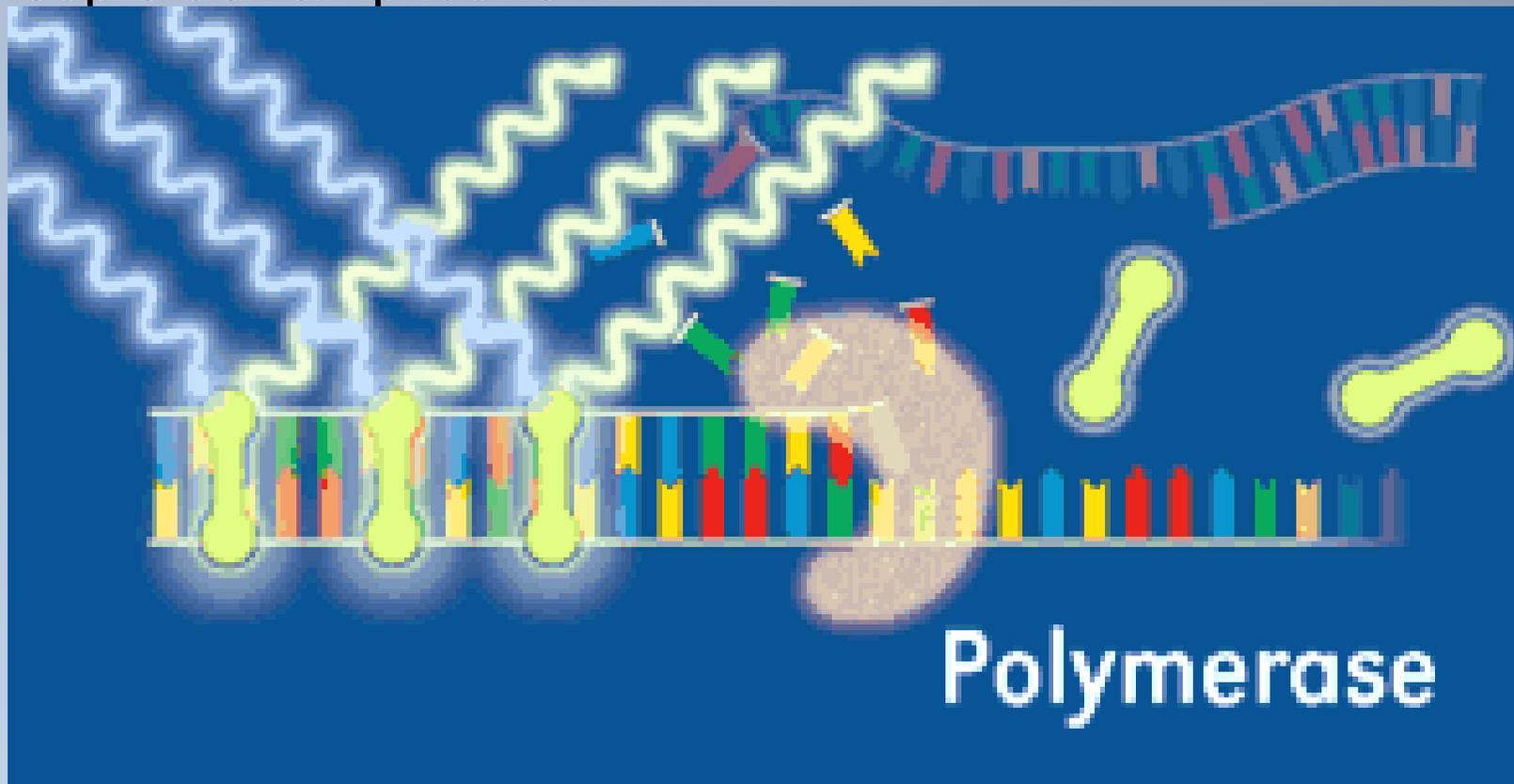
SYBR Green I

- Dopo l'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica.



SYBR Green I

- Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone



SYBR Green I

- Metodica semplice
Possono essere utilizzati primers in uso in qualitativa
- Non costosa
- Non-specifica
 - La molecola fluorescente si lega random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers;
 - È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici;
 - È utilizzabile con buoni risultati nelle analisi delle curve di melting (genotipizzazione).

SYBR Green

- Oltre al SYBR Green originale, sono stati sviluppati altri fluorofori simili leganti gli acidi nucleici, tra cui:
- SYBR Green II: lega DNA a singolo filamento e RNA. Simile al SYBR Green I ma ha un picco di assorbimento a 497 nm;
- SYBR Gold;
- SYBR Safe;
- YO (Oxazole Yellow, giallo di oxazolo);
- TO (Thiazole Orange, arancio di tiazolo);
- PG (PicoGreen).

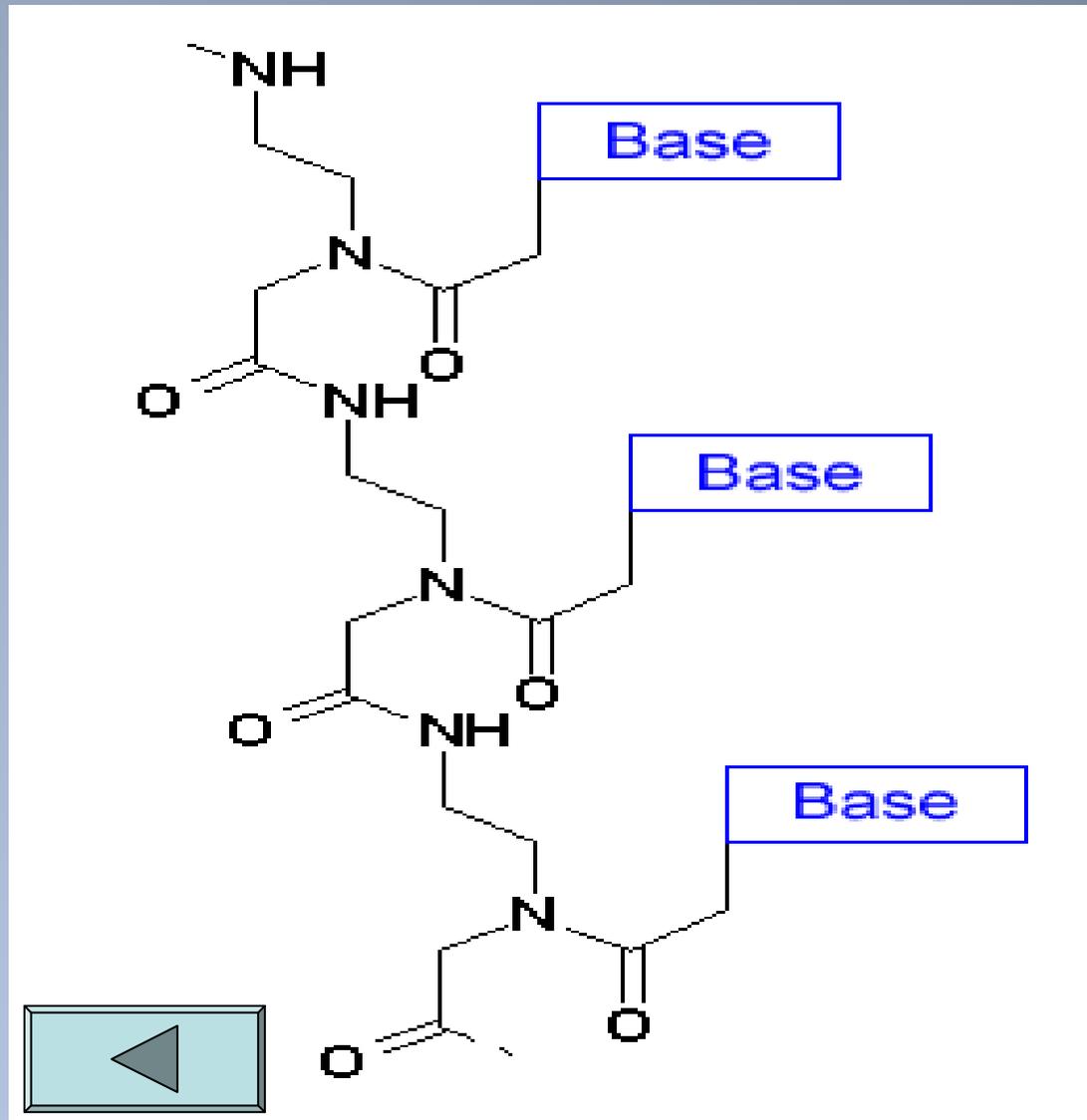
Sonde Oligonucleotidiche Fluorogeniche

L'impiego di sonde oligo per
rilevare l'amplicone aggiunge
maggiore specificità nella PCR

Opzioni fluorescenti nella PCR RT

- Le sonde più comuni si basano sulla chimica convenzionale degli ac. Nucleici
- PNA: polimero organico simile al DNA o RNA, a carica neutra, con scheletro costituito da unità ripetute di *N-(2-amminoetil)-glicina*, unite da legami peptici. Le basi puriniche e pirimidiniche sono unite da legami metile-carbonili.
- Poiché lo scheletro del PNA non contiene gruppi fosfato carichi, il legame tra filamenti PNA/DNA è più forte di quello DNA/DNA, grazie alla minore repulsione elettrostatica.

Opzioni fluorescenti nella PCR RT



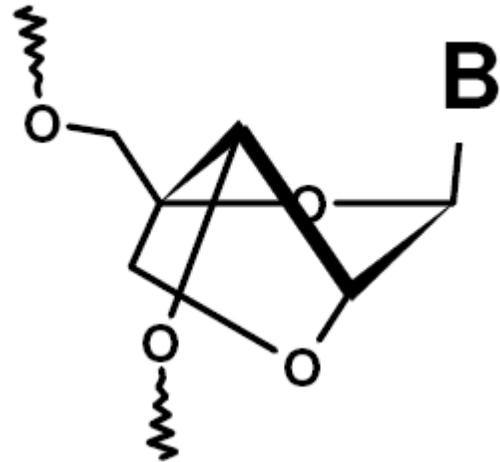
Opzioni fluorescenti nella PCR RT

- Una caratteristica importante degli oligomeri di PNA è quella di presentare una alta specificità anche in presenza di molecole brevi. Gli oligomeri di PNA, infatti, mostrano una maggiore specificità anche nel legame con DNA complementare: ciò significa che gli accoppiamenti errati tra basi sono più destabilizzanti nel caso di filamenti PNA/DNA (ma anche PNA/RNA) piuttosto che tra filamenti di DNA/DNA.
- Le molecole di PNA non sono riconosciute né dalle nucleasi né dalle proteasi: per questo motivo sono dunque resistenti alla degradazione enzimatica. I PNA sono stabili anche in un largo range di pH.

Opzioni fluorescenti nella PCR RT

- Altra famiglia di analoghi del DNA sono le molecole LNA. E' un nucleotide RNA modificato. La molecola di ribosio di un nucleotide LNA è modificato dalla presenza di un extra legame che unisce l'ossigeno 2' al carbonio 4'.
- Il legame blocca il ribosio nella conformazione 3'endo (Nord).
- I monomeri LNA possono essere incorporati all'interno di oligonucleotidi sintetici a piacimento usando il metodo della fosforoamidite (sintesi inversa del DNA 3'→ 5')

Opzioni fluorescenti nella PCR RT



LNA Monomer

β -D configuration



Sistema distruzione oligonucleotidi

- Sonde oligonucleotidiche ad idrolisi
 - TaqMan® Probes
 - TaqMan-MGB Probes (3' MGB molecola)
 - MGB-Eclipse™- QuantiProbes™
 - (UT) primer (universal template primer)
 - Common reporter Real time PCR
 - Padlock probe
 - Qzyme™

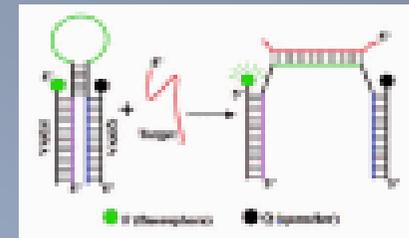


Sistema senza distruzione oligonucleotidi

- Questo tipo di sonde non viene distrutta per produrre il segnale di fluorescenza e viene usata per successiva caratterizzazione dell'amplicone.
- Chimiche lineari: la maggior parte delle sonde fluorogeniche appartengono a questa classe di oligonucleotidi.
 - [Sonde a ibridazione \(HybProbe®\)](#)
 - [Yin-Yang oligoprobes](#)
 - LightUp probe® -PNA Probe con tiazolo
 - HyBeacon™ (singolo fluoroforo)
 - Lightspeed probe- linear-PNA beacon (quench per conformazione)
 - Bi-probe system – ResonSense® probe
 - Simple probes®

Sistema senza distruzione oligonucleotidi

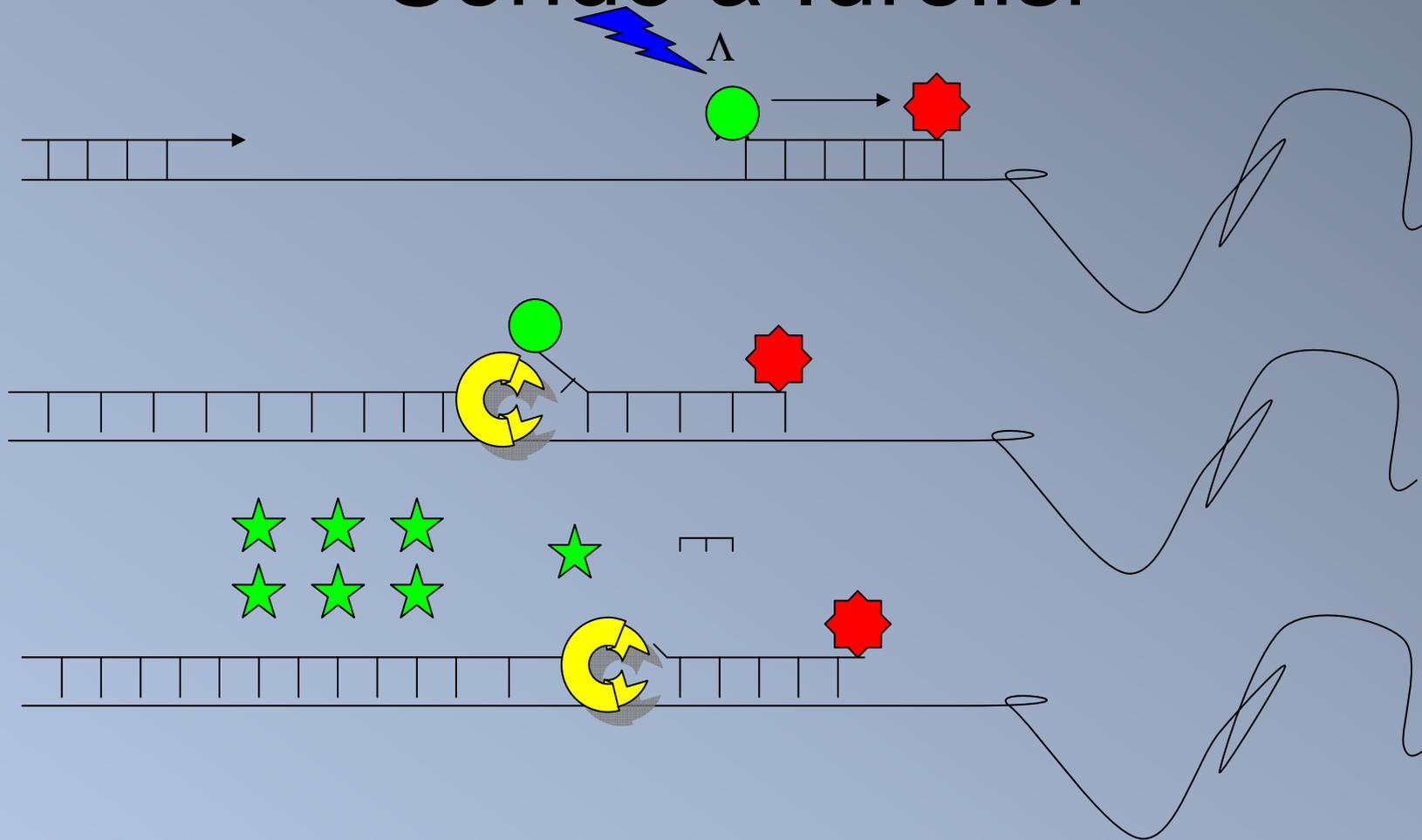
- Hairpin oligoprobes : i “molecular beacons” sono stati le prime sonde oligonucleotidiche fluorogeniche ad hairpin descritte per le applicazioni RT-PCR.
 - Hairpin oligoprobes
 - Wavelength-shifting hairpin oligoprobes
 - Tripartite molecular beacons (TMB).
- Self-priming – Fluorogenic amplicon: concettualmente simili alle hairpin, con la differenza che il fluorocromo viene incorporato irreversibilmente nell’amplicone formato.



Sistema senza distruzione oligonucleotidi

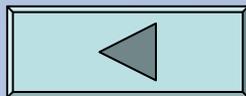
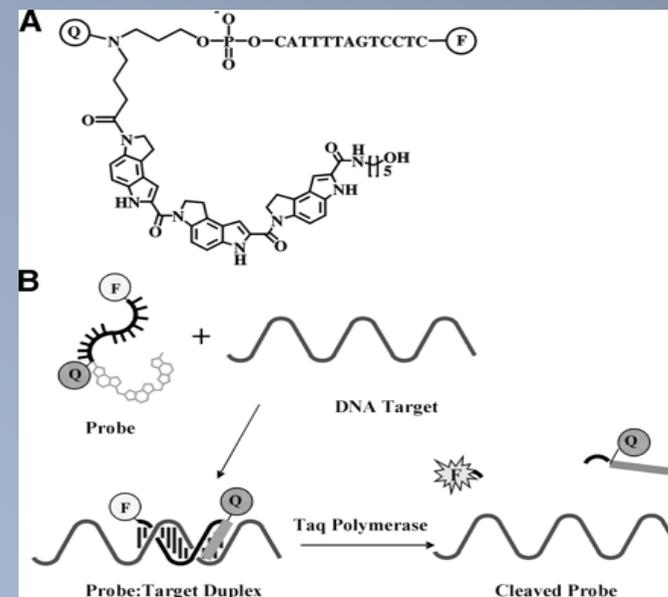
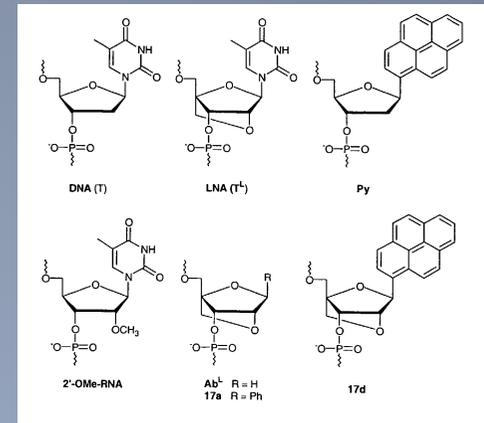
- Sunrise primers - Amplifluor™
- Scorpion primers
- Light upon extension primers – LUX (primer a forcina)
- IntraTaq probe (simile a Scorpion sonda lineare)
- Q-PNA (primer con fluoroforo che viene quenziato da un PNA labeled PNQ)

Sonde a Idrolisi



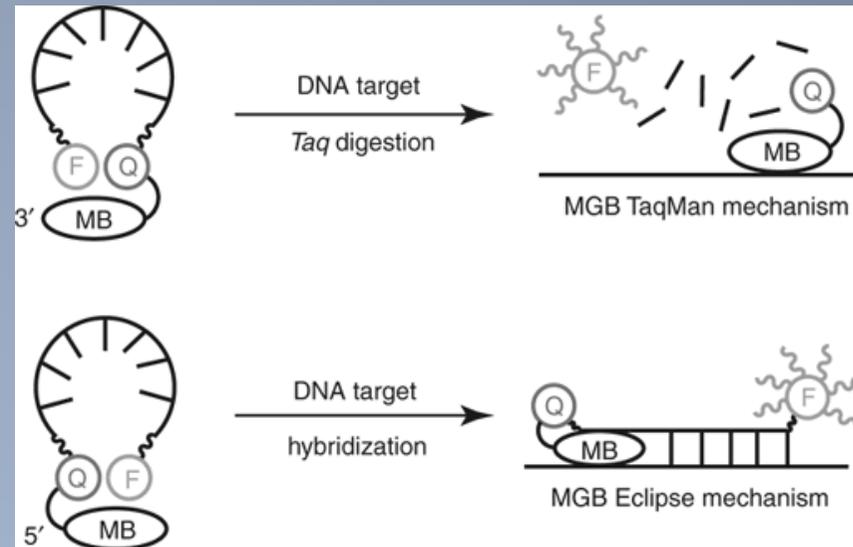
TaqMan-MGB

- Sonde più corte (12-17nt)
- Aumento T_m ibrido
- Stabilizzazione del legame A:T
- Ideali Analisi SNPs



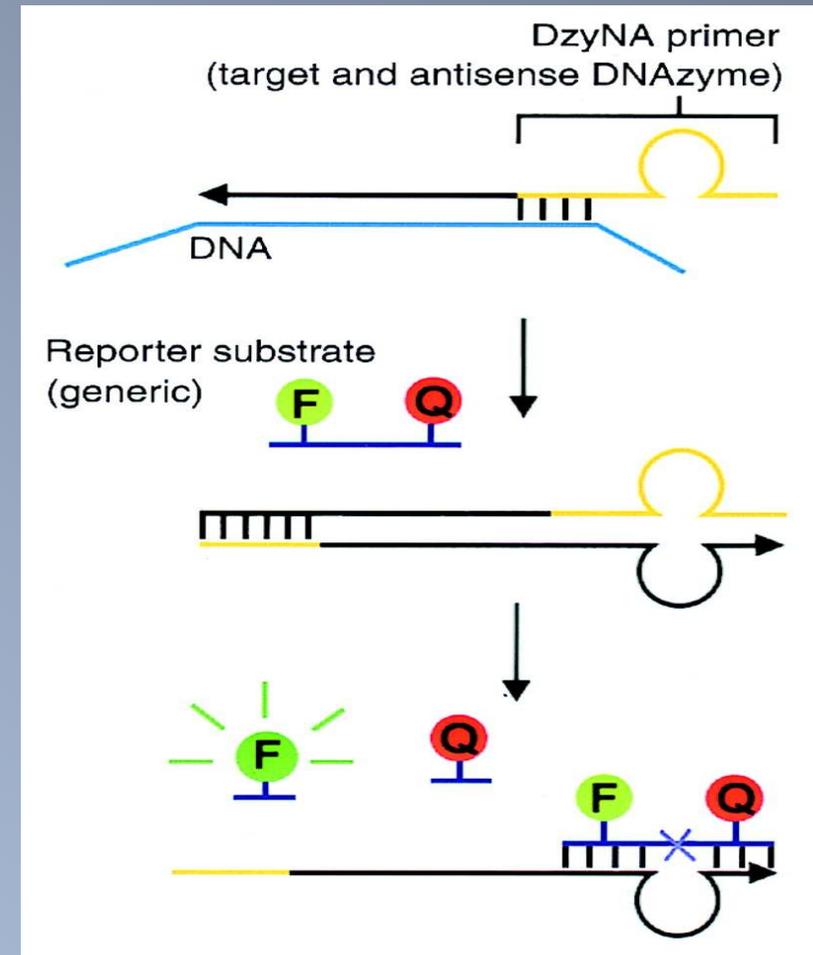
TaqMan-MGB-Eclipse

- TAMRA o DABCYL sono sostituiti da NFQ
- MGB e NFQ sono al 5' terminale, Reporter al 3'.
- MGB protegge dall'azione nucleasica di Taq
- Analisi del prodotto di amplificazione



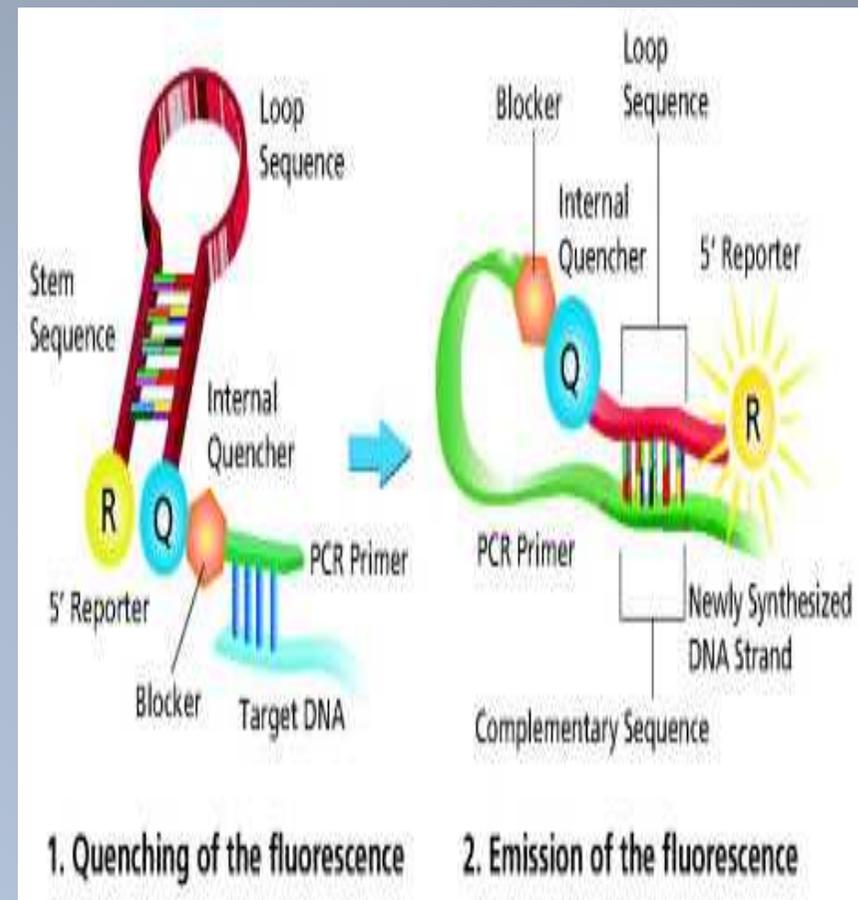
Q-Zyme

- Primer porta una coda con sequenza antisenso per DNAzyme.
- Viene duplicata durante l'estensione del primer sul bersaglio
- Funge da nucleasi per l'oligo marcato.

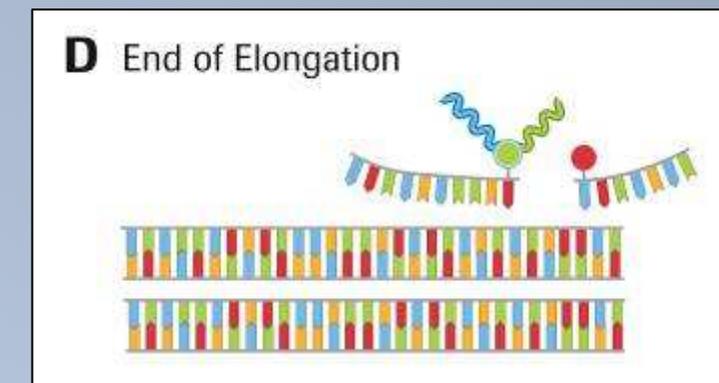
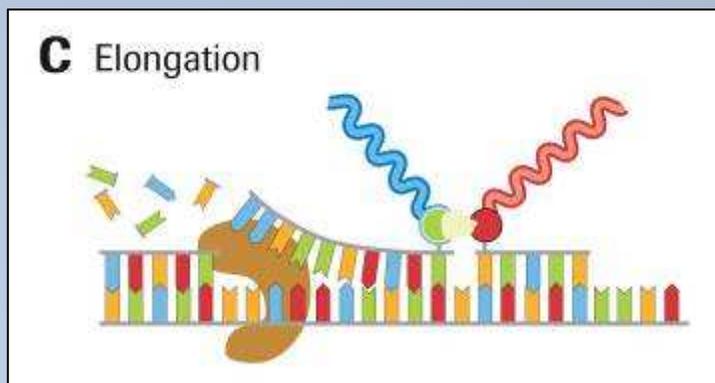
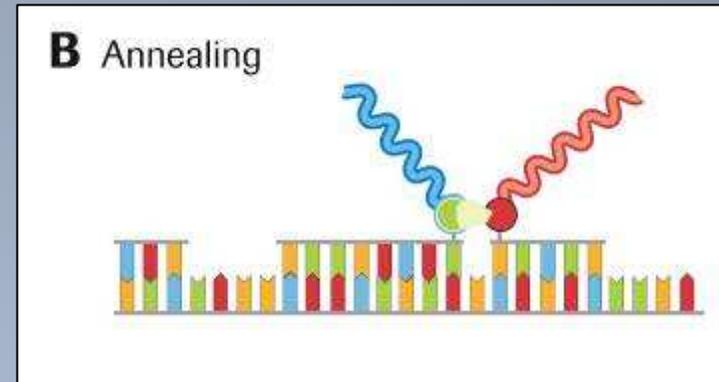
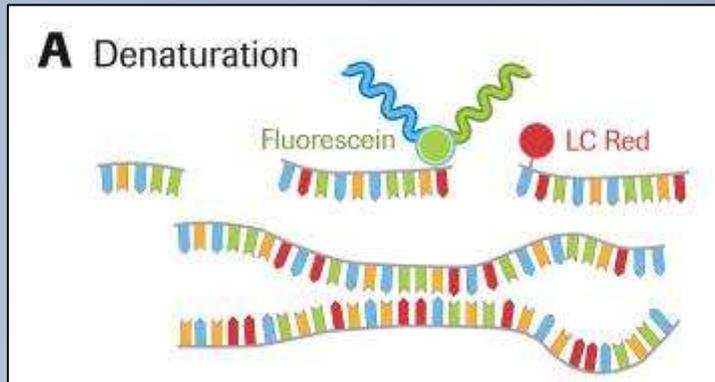


Scorpion Probs

- Gli **Scorpions** sono primers di PCR con una coda “stem-loop” che contiene un fluoroforo e un quencher. La coda è separate dalla sequenza del primer di PCR da un “blocker”, una modificazione chimica che impedisce alla Taq DNA polimerase di copiare la sequenza dello Scorpions. Questo impedisce l’apertura non specifica del loop. Gli Scorpions differiscono dalle metodiche tradizionali dal momento che i loro meccanismo di “probing” è intramolecolare. Durante la PCR, i primers Scorpions vengono allungati per produrre prodotti di PCR. Durante la fase di annealing la sequenza sonda nella coda dello Scorpion scivola indietro per ibridare con la sequenza target contenuta nel prodotto di PCR neofornato. Dal momento che la coda dello Scorpions e il prodotto di PCR sono ora parte dello stesso strand, l’interazione è intramolecolare, cineticamente favorevole e altamente efficiente.



HybProbe





[Melting Curves: ; F2/F1 ; Melting seg 3]

File Melting Curves Report Window Help

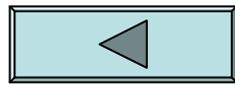
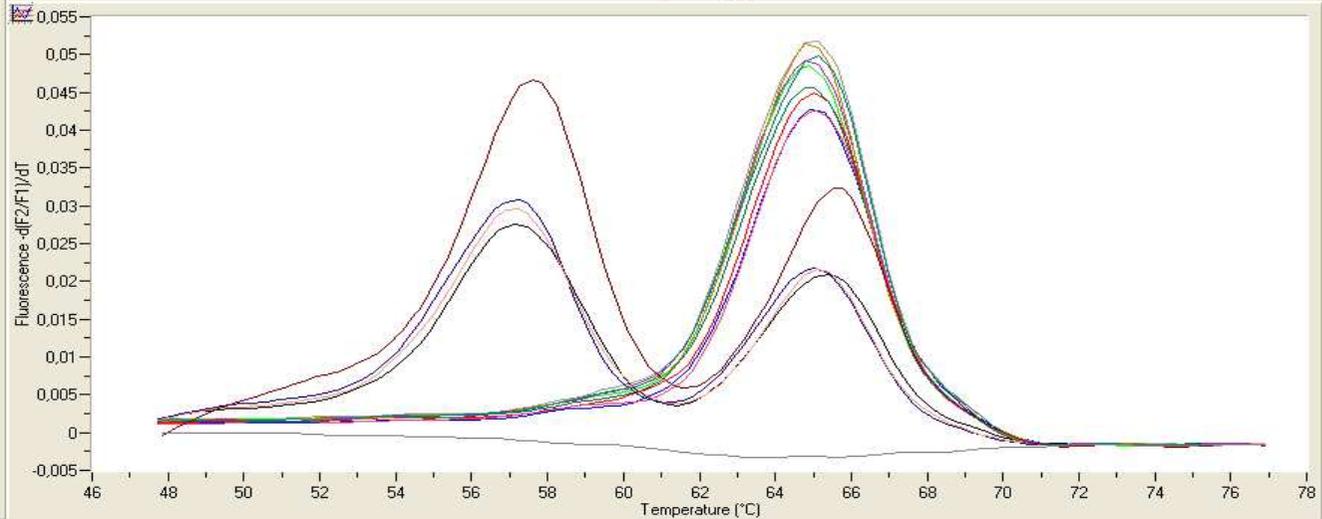
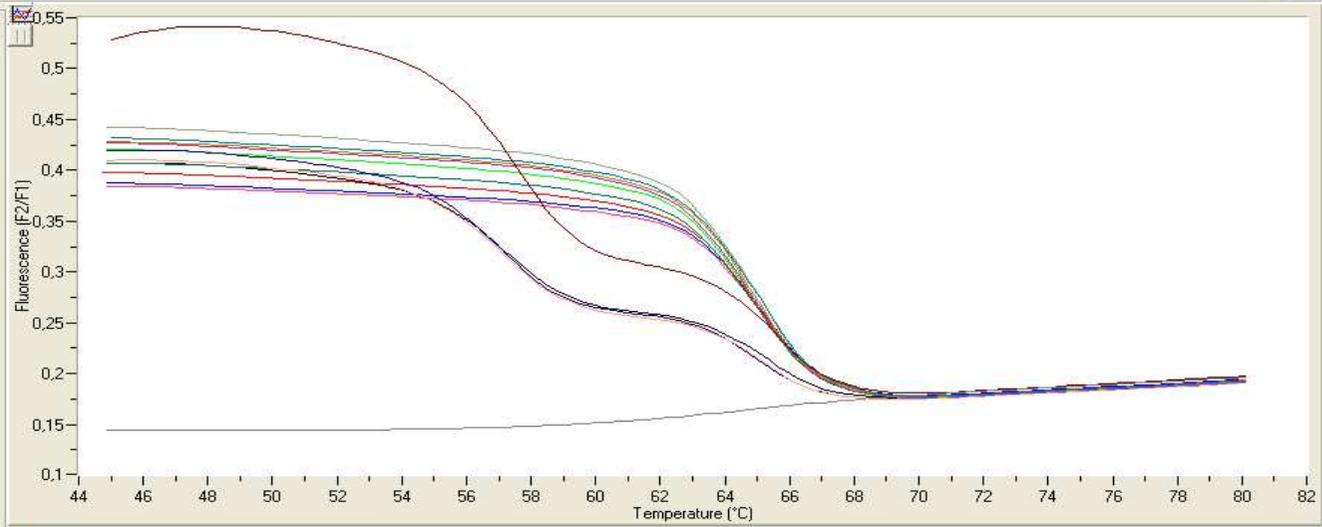
Step 1: Melting Peaks Step 2: Peak Areas Extra: Manual Tm

Calculation Method
 Linear
 Linear with Background Correction
 Polynomial
 Polynomial with Background Correction

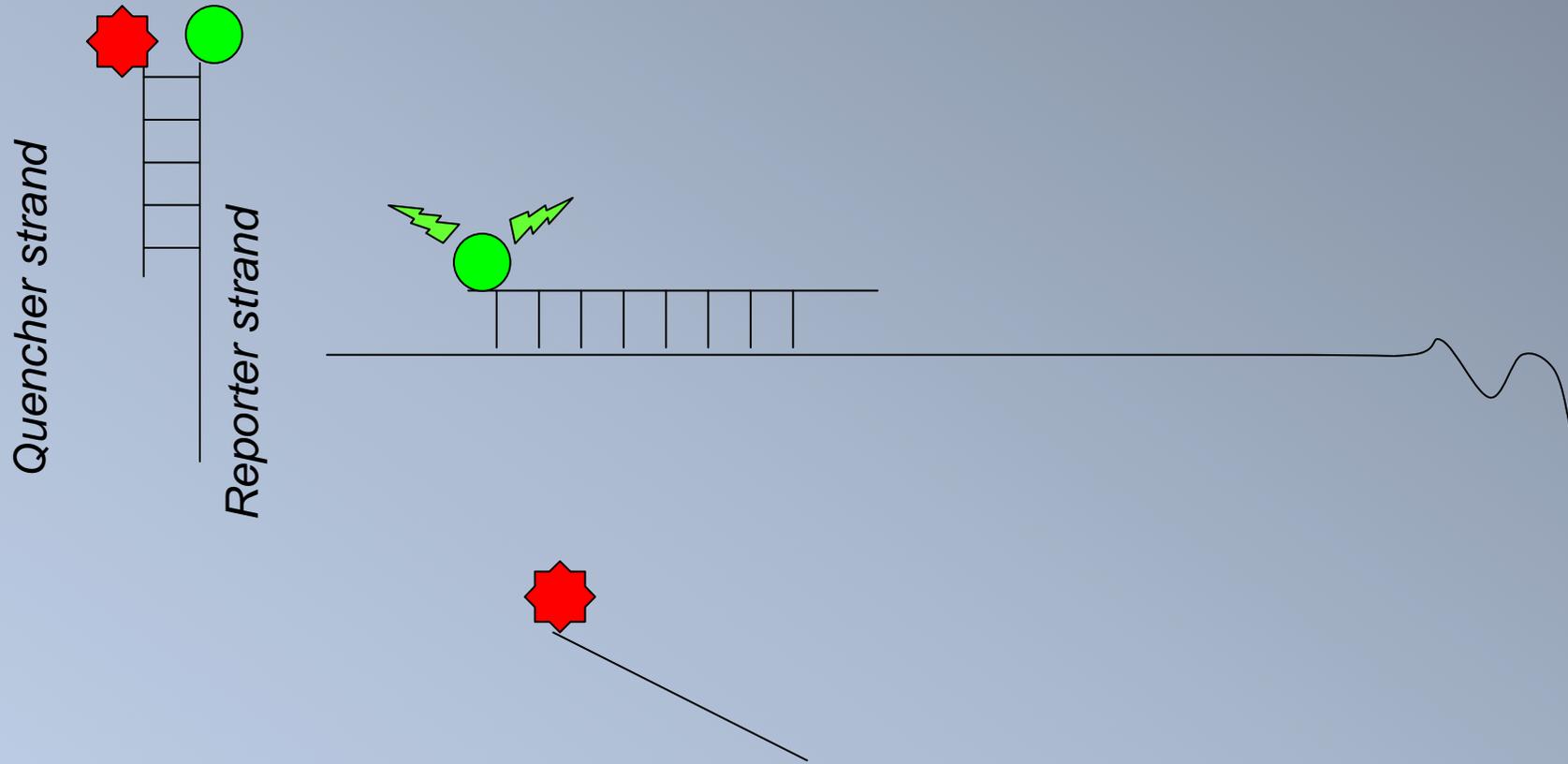
Digital Filter
 Enable

Analysis Notes
 Lotto N° 11509420 Sc. 30.04.2011

P...	Name
1	49000897
2	49000898
3	49000899
4	49000900
5	49000902
6	49000903
7	49000904
8	49000906
9	49000908
10	49000909
11	49000910
12	49000914
13	CTR ETEROZIGOTE
14	CTR NEGATIVO



Yin-Yang oligoprobes



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: FAVARATO_Real

STACK:

```
(2)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20110128103607+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20110128103607+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```