

## UTILIZZI PCR

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

1. Introdotta da Kary Mullis alla metà degli anni '80 ha rivoluzionato la genetica molecolare.
2. Permette l'amplificazione di una regione specifica di DNA.

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'.

1) Lo stampo di DNA a filamento singolo può essere prodotto semplicemente riscaldando il DNA a doppia elica a temperature prossime a quella di ebollizione (Denaturazione del DNA).

2) Il punto d'inizio della sintesi del DNA può essere specificato fornendo come innesco un corto oligonucleotide (*primer*) che si appai allo stampo nelle immediate vicinanze del segmento di DNA che si vuole amplificare.

Aggiungendo un primer oligonucleotidico per ciascun filamento, entrambi i filamenti di DNA possono servire da stampo.

Il miscuglio di reazione viene quindi nuovamente scaldato in modo da separare i filamenti originari da quelli neosintetizzati, che sono così nuovamente disponibili per un ulteriore ciclo di ibridizzazione con i primers, sintesi del DNA e separazione dei filamenti.

Al termine di  $n$  cicli, il miscuglio di reazione contiene un numero massimo teorico di molecole di DNA a doppia elica pari a  $2n$ .

Tali molecole sono le copie della sequenza di DNA compresa tra i due primers.

Il materiale di partenza per la PCR è il DNA che contiene la sequenza che deve essere amplificata; non è necessario isolare questa sequenza dal momento che essa viene individuata dai primers.

La quantità di DNA necessaria per la PCR è veramente piccola (meno di 1 mg di DNA genomico totale, ma a volte basta una singola molecola di DNA).

Composizione tipica di una reazione di PCR:

- DNA contenente la sequenza da amplificare;
- Due primers;
- DNA polimerasi;
- Miscela dei quattro nucleotidi precursori (dNTPs: 2' desossinucleosidi 5' trifosfato).

Il volume totale della reazione è generalmente di circa 50-100  $\mu$ l.



**Riscaldamento  
94°C, 5min**



**Separazione  
filamenti**

**Raffreddamento  
30-65°C, 30s**

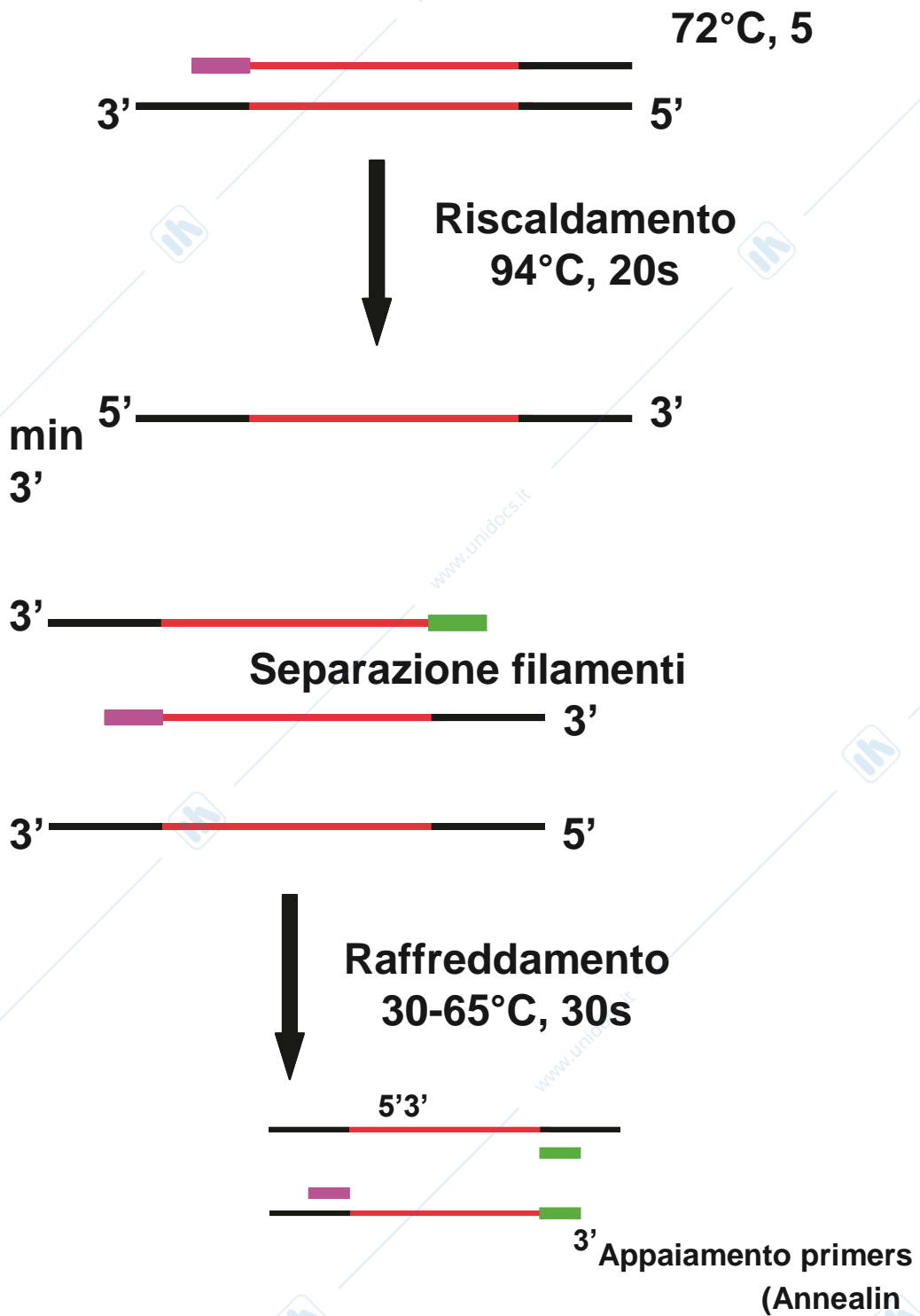


**Appaiamento primers  
(Annealing)**

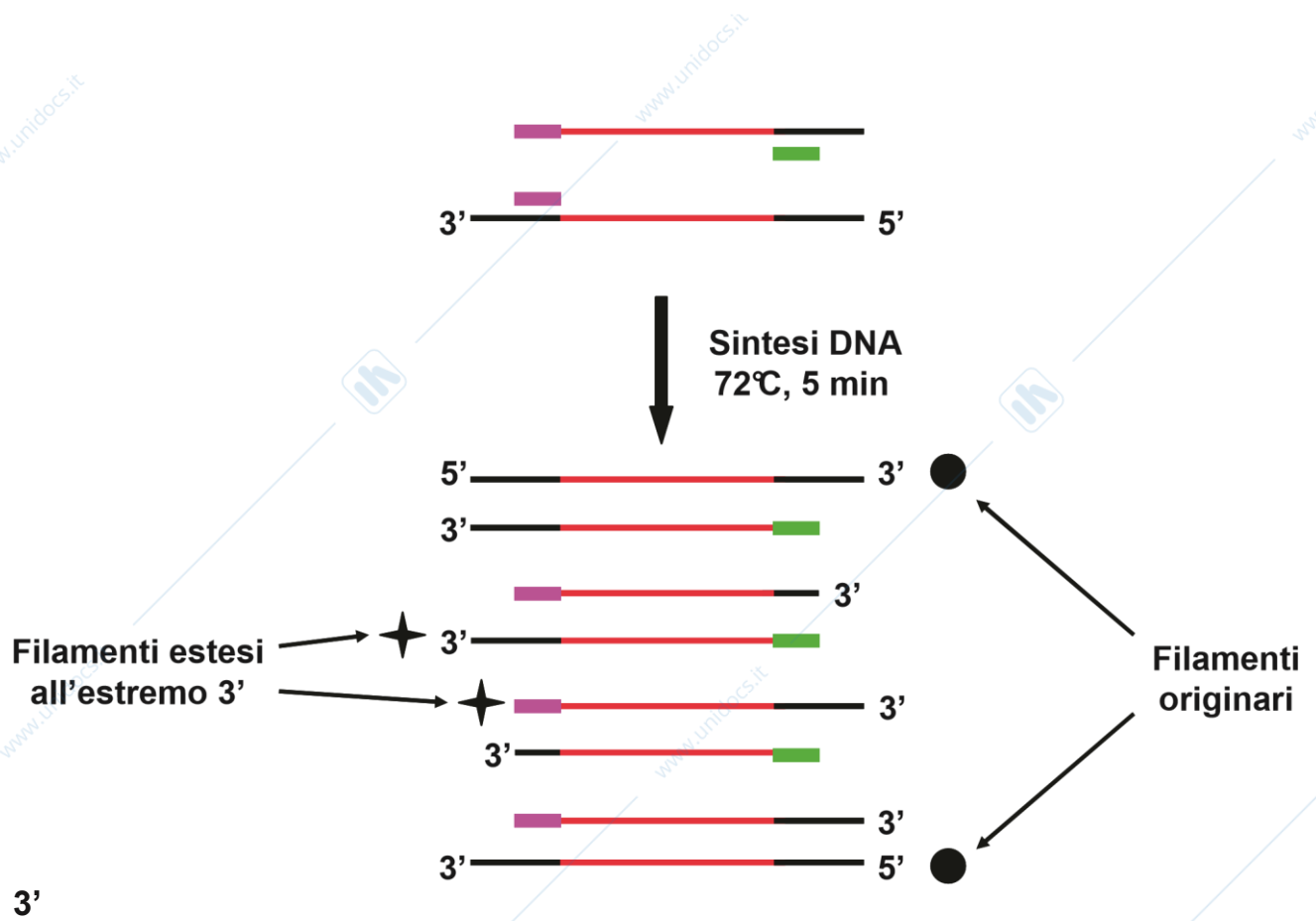


**Sintesi DNA**

## UTILIZZI PCR



g)



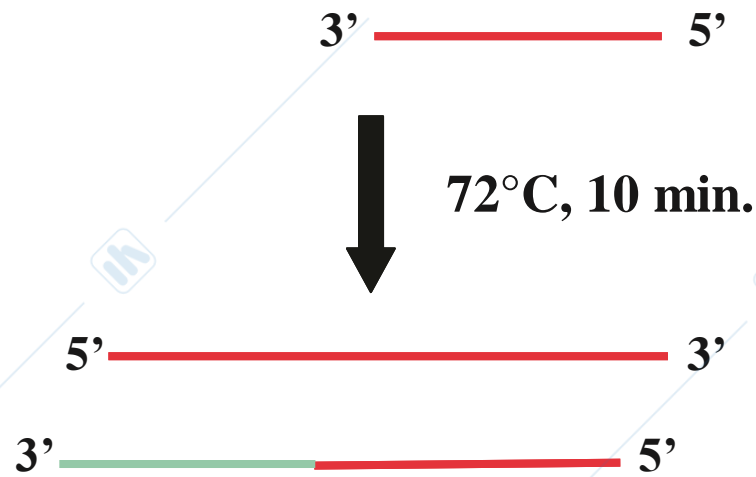
Ad ogni ciclo il numero dei frammenti desiderati (quelli cioè posti tra i due primers) si raddoppia (crescita esponenziale), mentre di nuovi frammenti estesi all'estremo 3' ad ogni ciclo se ne formano sempre e solo due.

Dopo 32 cicli si sono perciò formati 1 073 741 824 (!!!) frammenti di DNA a doppia elica corrispondenti al tratto compreso tra i due primers (e solo 64 filamenti estesi all'estremo 3').

Dopo l'ultimo ciclo si lascia il campione per 10 min. a 72°C. In questa maniera l'enzima ha il tempo di riempire ogni lacuna che dovesse essere eventualmente presente all'estremo 3' di qualche filamento.



## UTILIZZI PCR



Originariamente per la PCR veniva impiegata la DNA polimerasi di *E. Coli*, ma questo enzima è termolabile, per cui a 94° viene inattivato. Di conseguenza ad ogni ciclo bisognava aggiungere nuovo enzima.

L'isolamento della DNA polimerasi di *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasi) che vive in sorgenti termali alla temperatura di 75°C ha permesso di ovviare a questo inconveniente.

Vantaggi dell'uso della *Taq* polimerasi:

- 1) L'enzima può essere aggiunto una sola volta all'inizio della reazione e rimane attivo per 30-40 cicli di PCR.
- 2) E' così possibile automatizzare la PCR utilizzando apparecchi termostatici ciclici.
- 3) La *Taq* polimerasi aumenta la specificità e la sensibilità della PCR.

Alla temperatura più bassa necessaria per la DNA polimerasi di *E. Coli*, i primers possono appaiarsi con il DNA in siti dove le sequenze possono essere leggermente diverse dalla sequenza bersaglio (mismatch). Se questi "mismatch" dei primers si trovano su filamenti opposti del DNA in posizioni molto vicine può verificarsi un'amplificazione aspecifica.

Amplificazione di una sequenza aspecifica indesiderata

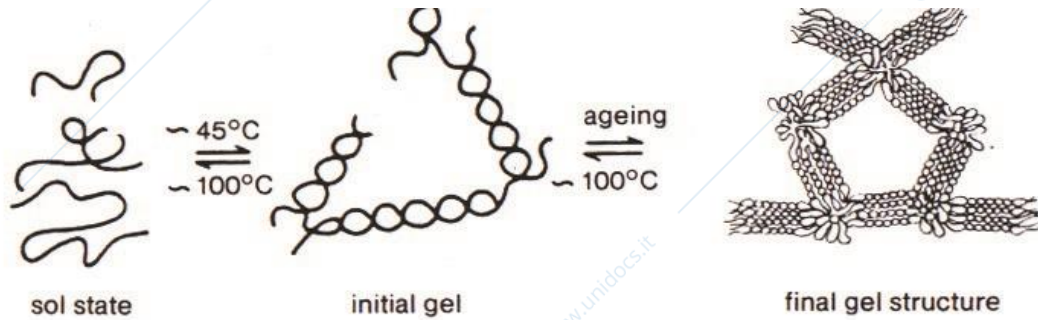
Il frammento "non corretto" sintetizzato nei primi cicli della PCR viene poi amplificato in modo efficiente nei cicli successivi. Di conseguenza la sua concentrazione aumenta proprio come quella della sequenza bersaglio.

L'utilizzo della *Taq* polimerasi riduce l'amplificazione di sequenze scorrette perché a 72°C l'appaiamento aspecifico dei primers risulta notevolmente ridotto.

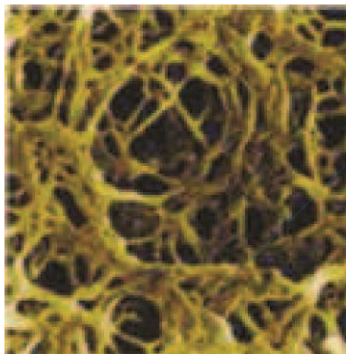
ELETTROFORESI SUL GEL DI AGAROSO

E' una tecnica utilizzata per separare dei frammenti di DNA mediante un campo elettrico applicato ad un gel. Viene, ad esempio, utilizzata per riconoscere i frammenti amplificati nella PCR.

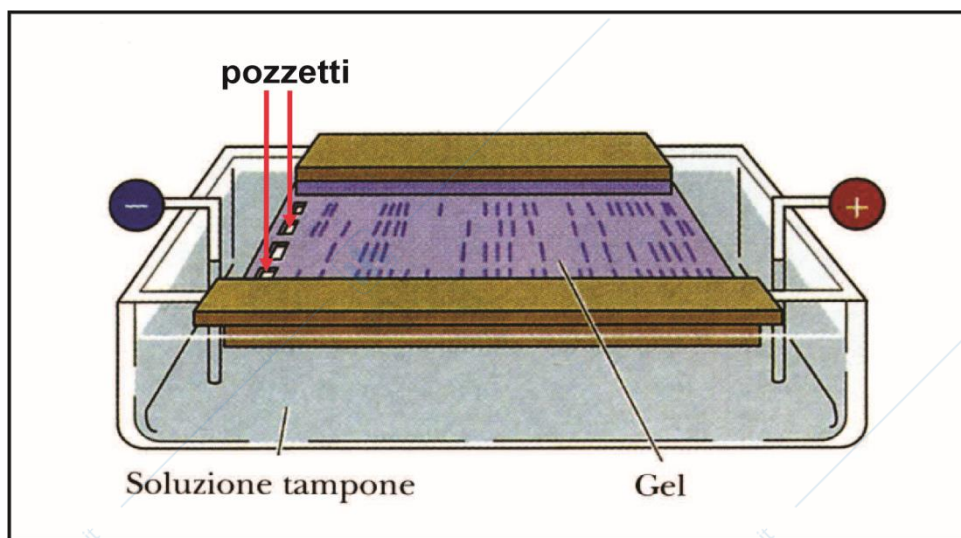
Come gel si utilizza l'agaroso, un polisaccaride solubile in acqua che se viene però scaldato a 100 gradi e poi lasciato raffreddare polimerizza formando un reticolo tridimensionale (setaccio molecolare).



### Reticolo di agarosio polimerizzato "setaccio molecolare"

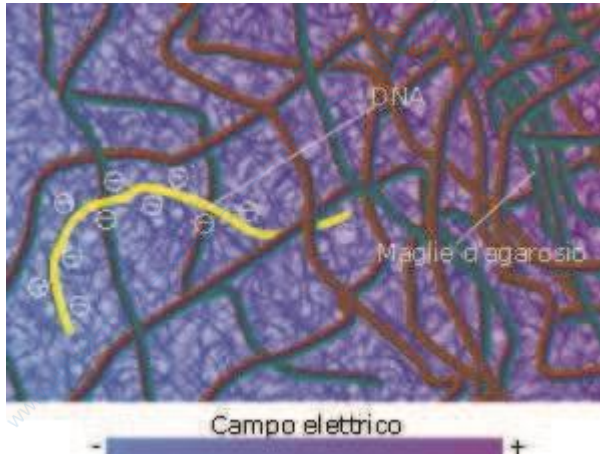


I frammenti di DNA vengono posti nel gel di agaroso (dentro a delle piccole cavità chiamate pozzetti). Subito dopo viene applicato un campo elettrico generato da un alimentatore.

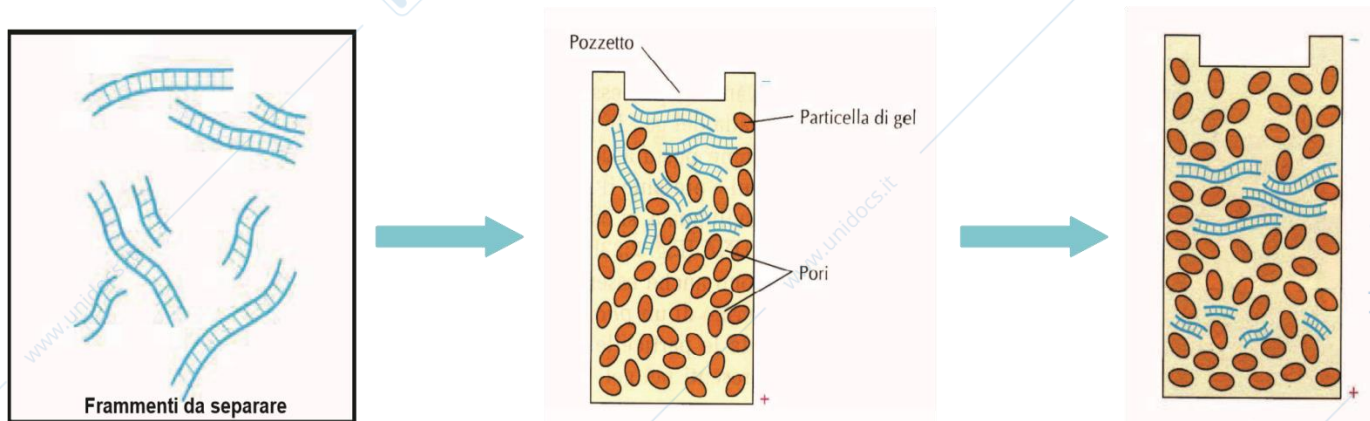


## UTILIZZI PCR

I frammenti di DNA che sono carichi negativamente migrano verso il polo positivo.

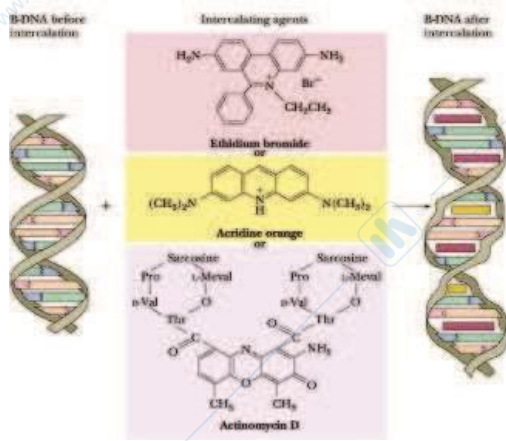


I frammenti più piccoli migrano più velocemente (percorrono uno spazio maggiore) mentre quelli più grandi migrano più lentamente.



In questo modo si ottiene una separazione dei frammenti di DNA sulla base delle loro dimensioni (peso molecolare).

A questo punto le bande di DNA devono essere visualizzate. A tale scopo si utilizza il bromuro d'etidio. Si tratta di una molecola che si intercala tra le basi del DNA diventando così fluorescente. E' quindi sufficiente porre il gel sopra ad una lampada a raggi UV perché in presenza di bromuro d'etidio le bande di DNA diventino fluorescenti.



## BROMURO D'ETIDIO

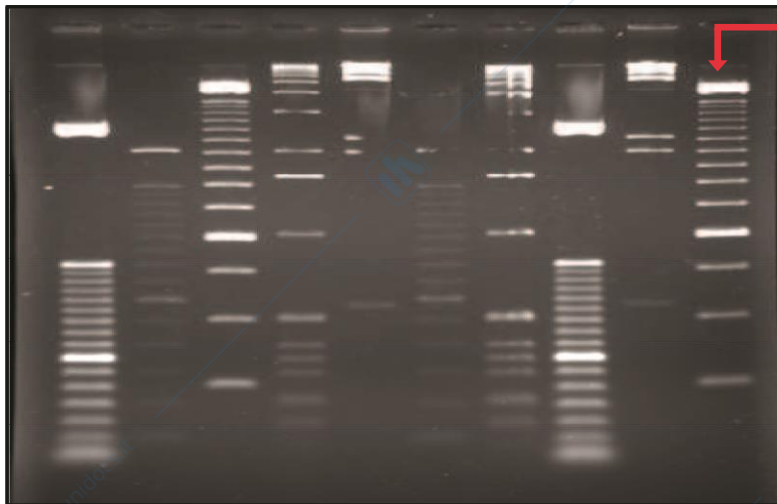
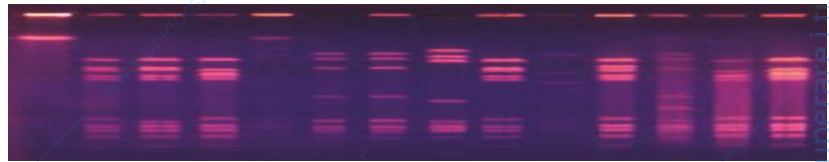
Questo composto contiene un gruppo planare che si intercala tra le basi "impilate" del DNA. L'orientamento e la vicinanza dell'etidio alle basi fa sì che il colorante assuma una aumentata fluorescenza comparata a quella che ha quando è libero in soluzione. La radiazione U.V. a 254 nm è assorbita dal DNA e trasmessa al colorante legato.

L'energia viene riemessa a 590 nm nella

regione rosso-arancio dello spettro.

Il gel assume questo aspetto:

E' anche possibile fotografarlo (normalmente in bianco e nero):



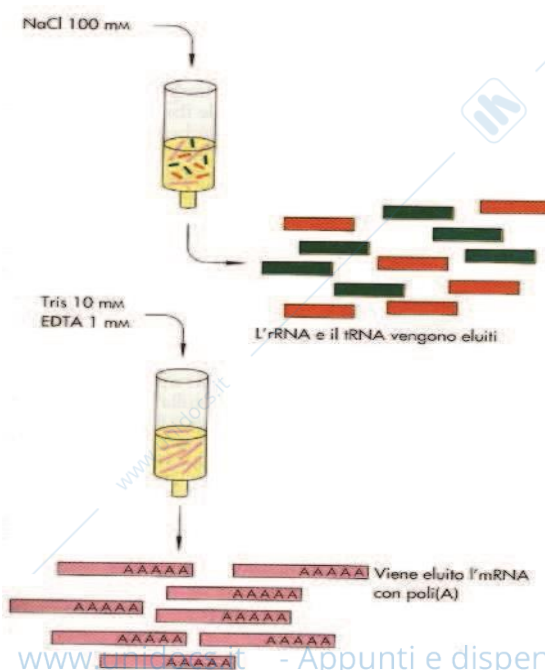
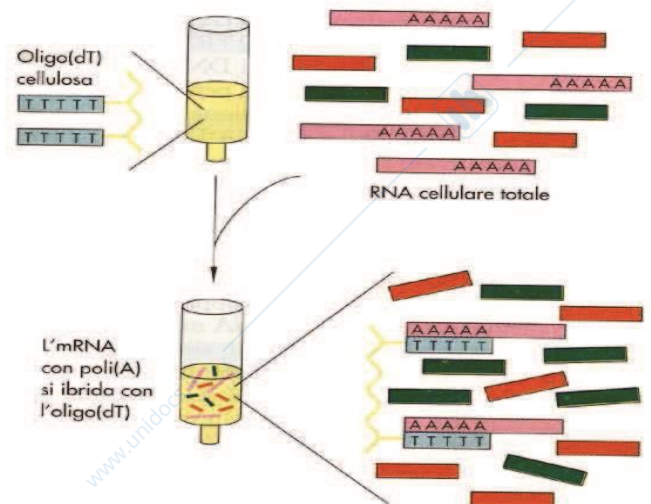
Normalmente in un pozzetto viene anche caricato un marker (vale a dire una miscela di frammenti di DNA di peso molecolare noto) per poter determinare il peso molecolare dei frammenti di interesse.

## UTILIZZI PCR



Fonti di Dna per la PCR:

1. DNA genomico totale estratto dalle cellule anche solo per bollitura.
2. cDNA ottenuto dall'mRNA mediante la transcriptasi inversa.



Per purificare l'mRNA cellulare si utilizza una colonna cromatografica contenente una resina alla quale sono stati legati dei segmenti di Poli-U.

Attraverso la resina viene fatto passare l'estratto cellulare. Tutti gli mRNA si legano ai segmenti Poli-U grazie alle loro code di Poli-A. Tutte le restanti componenti cellulari (es. DNA, tRNA, rRNA, proteine) invece escono dalla colonna.

La colonna viene lavata con NaCl 100mM per eliminare tutti quei composti che potrebbero essersi legati aspecificatamente con la resina. Gli mRNA, invece, vengono fatti staccare utilizzando EDTA e possono così essere raccolti per ulteriori utilizzi. Ad esempio sintesi di cDNA (DNA complementare) mediante trascrittasi inversa da utilizzare poi per la PCR.

Il DNA è una molecola molto stabile e per la PCR è stato utilizzato il DNA proveniente dalle fonti più strane:

1. DNA virale in frammenti biotici di carcinoma della cervice uterina inclusi in paraffina 40 anni prima.
2. DNA da goccioline di sangue essiccate per anni su carta da filtro.
3. DNA isolato da mummie egiziane.
4. DNA isolato da pelli di animali ormai estinti.
5. DNA di foglie fossili vecchie di 18 milioni di anni.

#### UTILIZZI PCR

- Diagnosi infezioni batteriche e virali:

Tecniche classiche:

1. Isolamento in coltura
2. Identificazione mediante anticorpi

Svantaggi:

Tempi lunghi

Poco sensibile

- Diagnosi HIV mediante PCR:

Si utilizza DNA estratto da cellule del sangue periferico. Nei pazienti affetti da AIDS alcune di queste cellule presentano il DNA virale integrato nel DNA cellulare.

Per la diagnosi si utilizzano primers specifici per il DNA virale. Se c'è amplificazione il soggetto è infettato da HIV.

Oppure

Per evidenziare la presenza di RNA virale (indicativo di infezione virale in atto) si estrae l'mRNA totale di cellule del sangue periferico, si ottiene il cDNA utilizzando la *Trascrittasi Inversa* e si amplifica questo cDNA utilizzando primers specifici per geni virali. Se c'è amplificazione il soggetto è infettato da HIV.

- Diagnosi di Tuberculosis mediante PCR:

Il *Mycobacterium tuberculosis* è presente in numero ridottissimo nei tessuti colpiti (difficile diagnosi istologica). Per la diagnosi con PCR si estrae il DNA da una lesione e lo si amplifica con primers specifici per un gene altamente conservato in tutte le specie di *Mycobacterium*. Qualora un segmento venga amplificato, esso viene ibridizzato con delle sonde specie-specifiche in modo da identificare il ceppo in questione.

## UTILIZZI PCR

Con questo approccio è possibile rilevare 10 bacilli su 10<sup>6</sup> cellule eucariotiche (!!).

- Diagnosi cliniche di malattie causate da mutazioni:

Vantaggi:

Minima quantità di materiale di partenza.

Risultati in poche ore.

Controllo efficacia terapie anti-cancro:

Per interrompere la terapia non appena le cellule cancerose sono scomparse e riprenderla immediatamente se si verificano recidive.

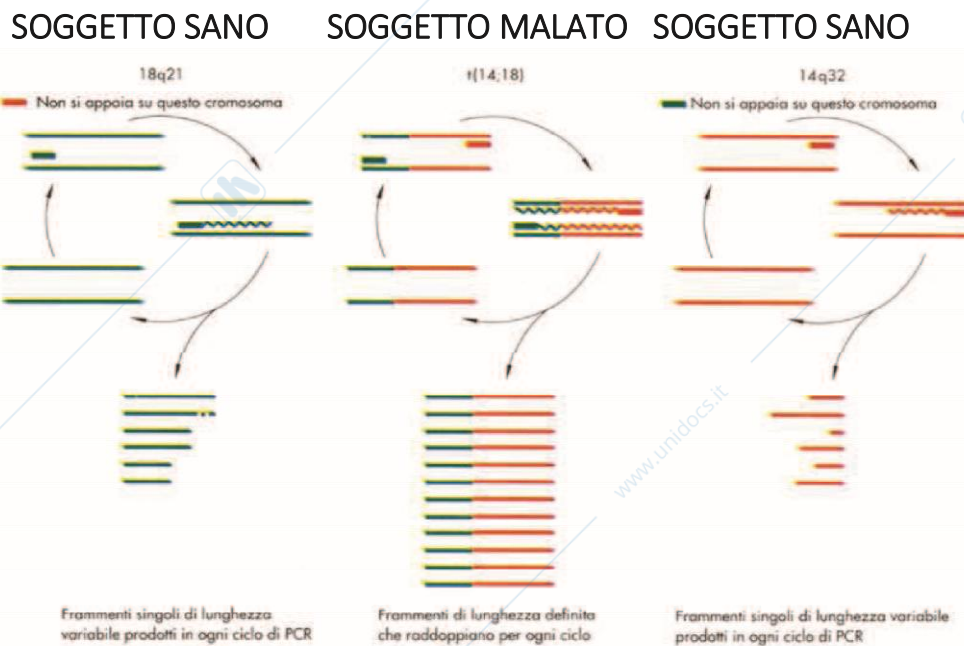
Diagnosi mediante PCR dei linfomi follicolari

Il linfoma follicolare è una neoplasia dei linfociti B.

La causa di questa neoplasia è una traslocazione tra i cromosomi 14 e 18.

Si forma così un cromosoma ibrido formato da una porzione di cromosoma 14 unita ad una porzione di cromosoma 18.

La diagnosi della malattia viene effettuata mediante PCR utilizzando due primers (uno specifico per il cromosoma 14 e l'altro per il 18) che si legano in prossimità del punto di unione tra i due cromosomi.



Se non c'è stato il riarrangiamento cromosomico i frammenti amplificati si accumulano con una cinetica lineare e sono di lunghezza variabile.

Tecnica classica per individuare le cellule cancerose:

*Southern blotting*

Sensibilità: 1 cellula su 100

*PCR*

Sensibilità: 1 cellula su 1.000.000

- Determinazione del sesso:

Utile per le malattie ereditarie legate all'X che colpiscono solo i maschi.

Nel cromosoma Y sono presenti delle sequenze uniche come la sequenza DYZ1 di 3,5 kb ripetuta ben 5000 volte che possono essere amplificate mediante PCR.

Se il feto è nel sangue periferico della madre sono presenti delle cellule maschili (1 su 70.000). Anche in questo caso è possibile amplificare le sequenze DYZ1. In questo caso, però, sono necessari 60-70 cicli di amplificazione. Per ridurre l'amplificazione di tratti indesiderati si utilizzano dei primers annidati (nestedprimers).

- Studi evoluzione molecolare:

Tanto più le specie divergono da un antenato comune tanto più divergono le loro sequenze nucleotidiche. E' possibile misurare l'omologia confrontando le differenze esistenti fra nucleotidi dello stesso gene di specie diverse.

Classificazione piante fossili:

Il DNA estratto da foglie fossili inglobate in letti d'argilla risalenti al Miocene (18 milioni di anni fa) è stato amplificato utilizzando primers specifici per il gene della carbossilasi 1,2-bifosfato (*rbcL*). Si è ottenuto un frammento di DNA della lunghezza giusta (820 pb). Confrontando la sequenza con quella del gene di vegetali ancora esistenti si è potuto stabilire che la pianta fossile faceva parte della famiglia delle magnolie.