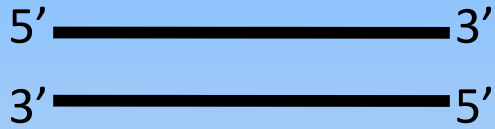
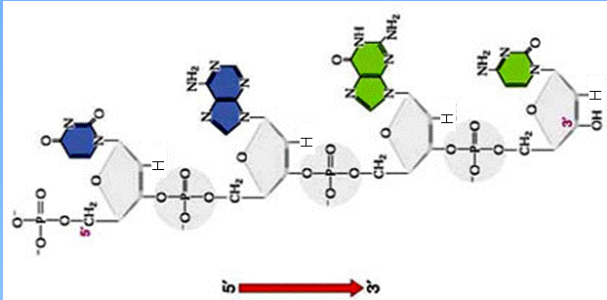


# **BIOLOGIA MOLECOLARE**

## **LA REAZIONE POLIMERASICA A CATENA**

**Principi teorici e aspetti pratici**

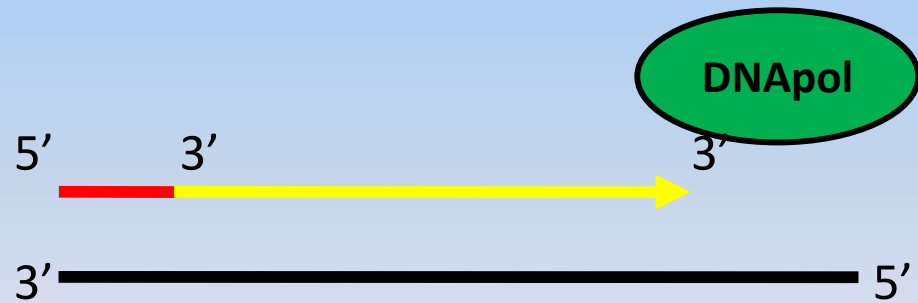
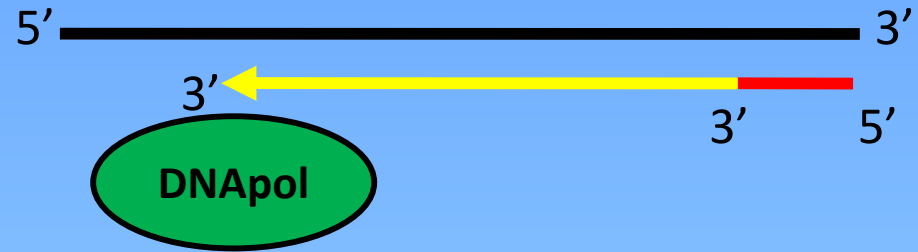
# REPLICAZIONE DEL DNA



APERTURA DOPPIA ELICA

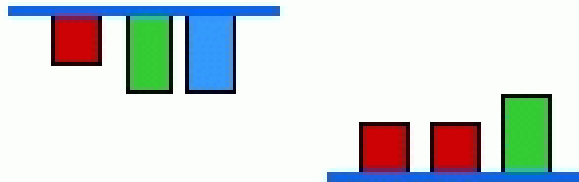
SINTESI INNESCO

ALLUNGAMENTO

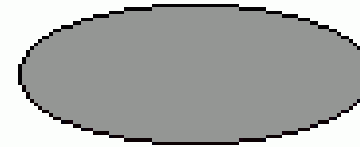


# ELEMENTI NECESSARI PER LA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

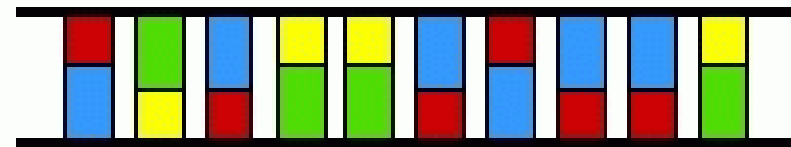
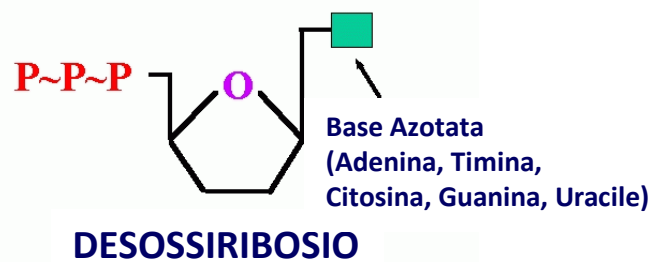
## Primers



## DNA polimerasi



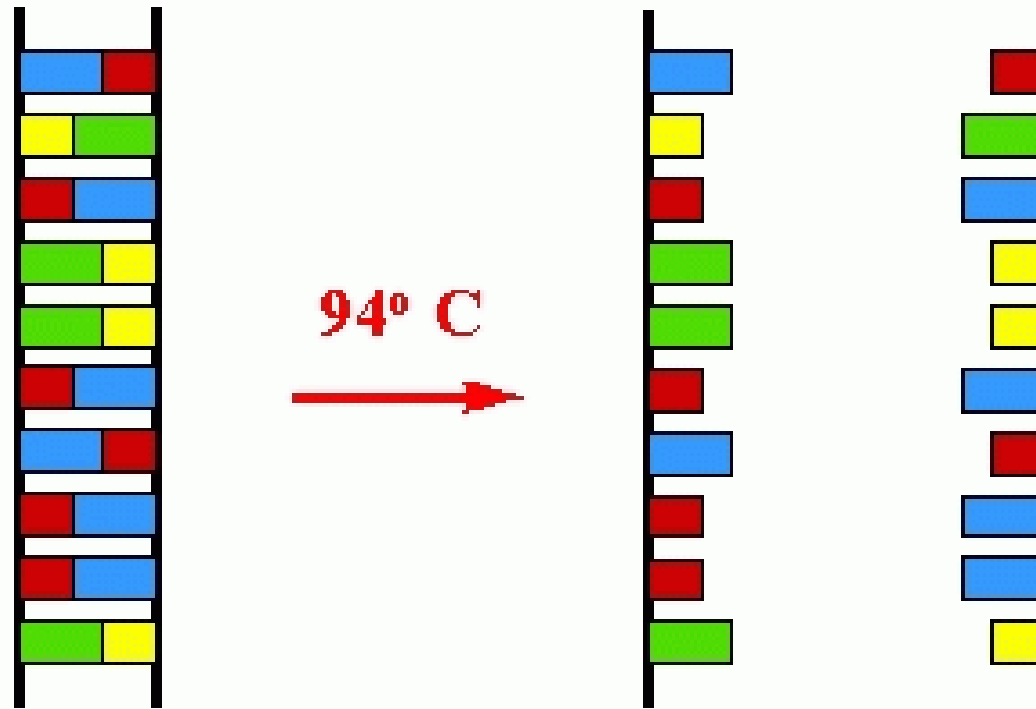
## Desossi Nucleotidi trifosfati (dNTP)



## DNA STAMPO

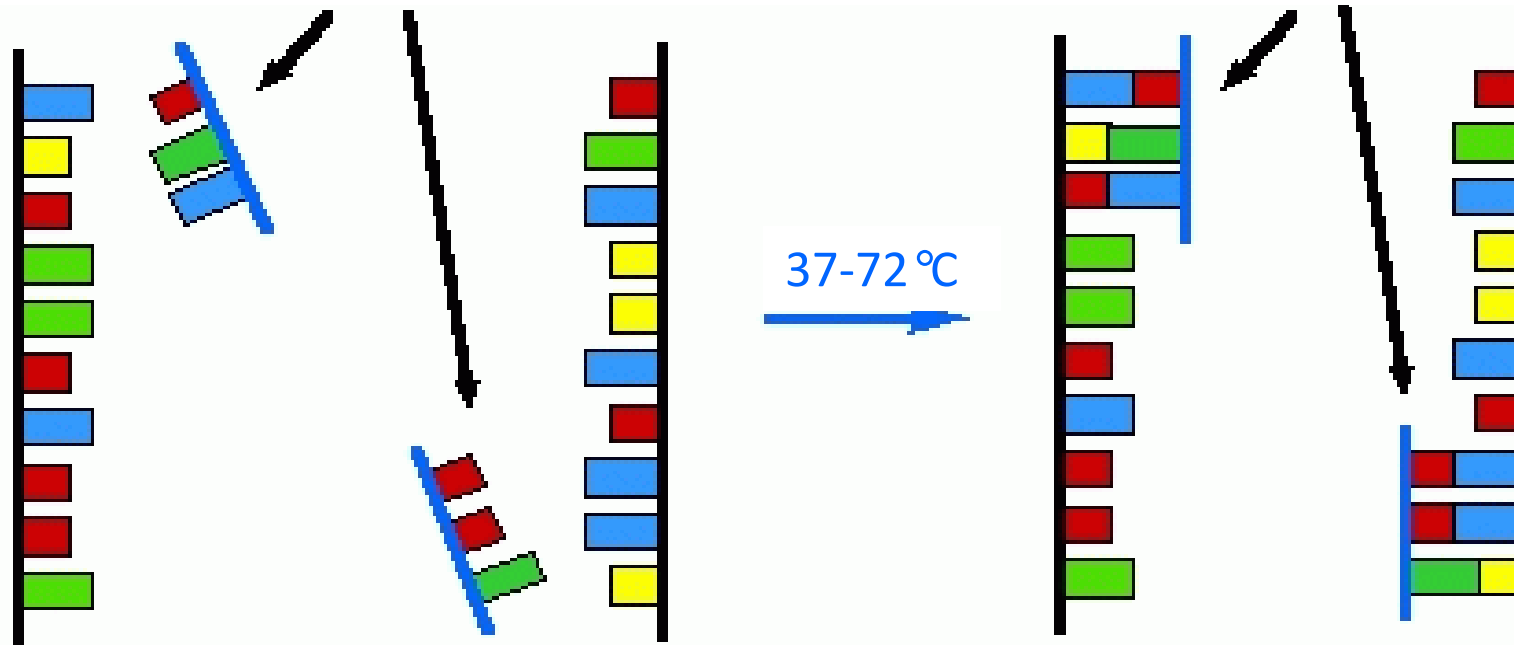
## fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



fase 2: ANNEALING

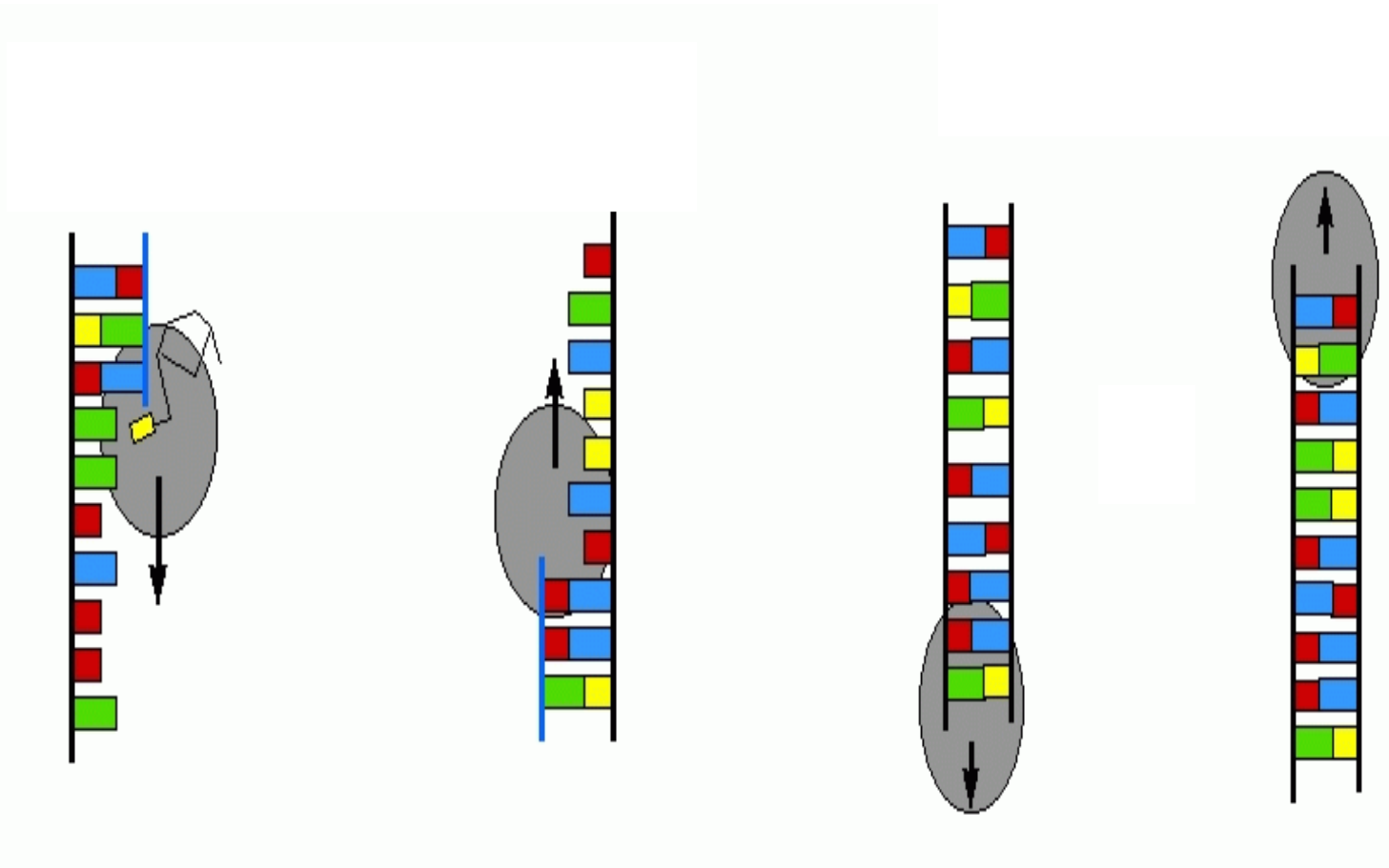
i primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo



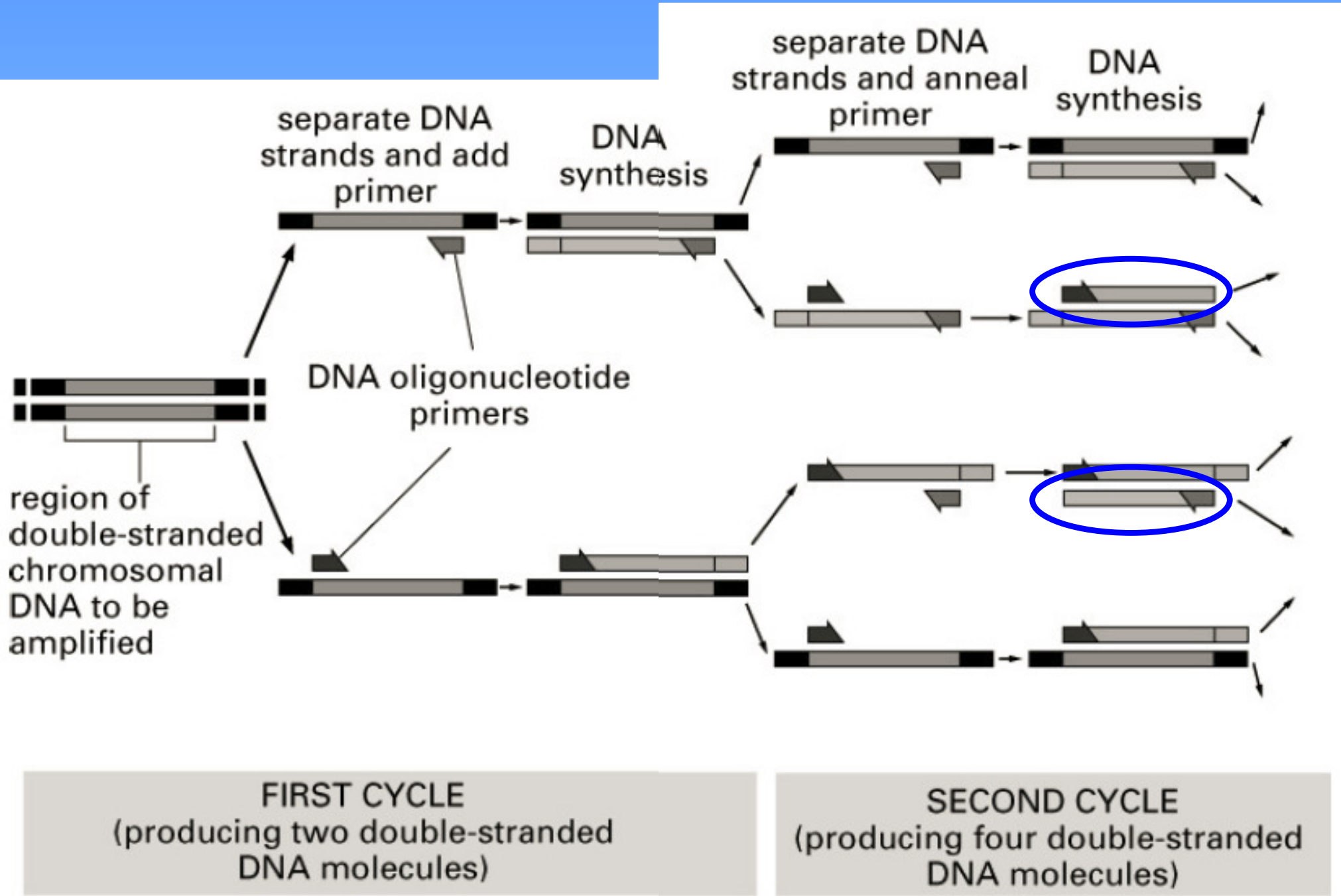
fase 3:

## ESTENSIONE

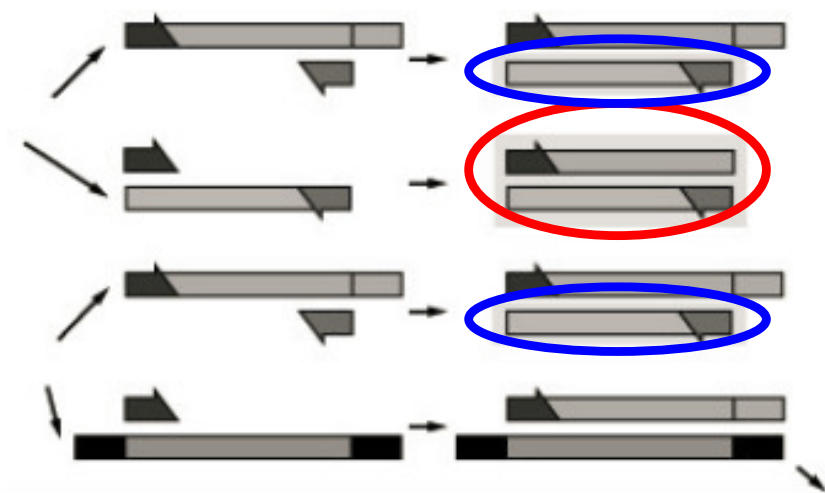
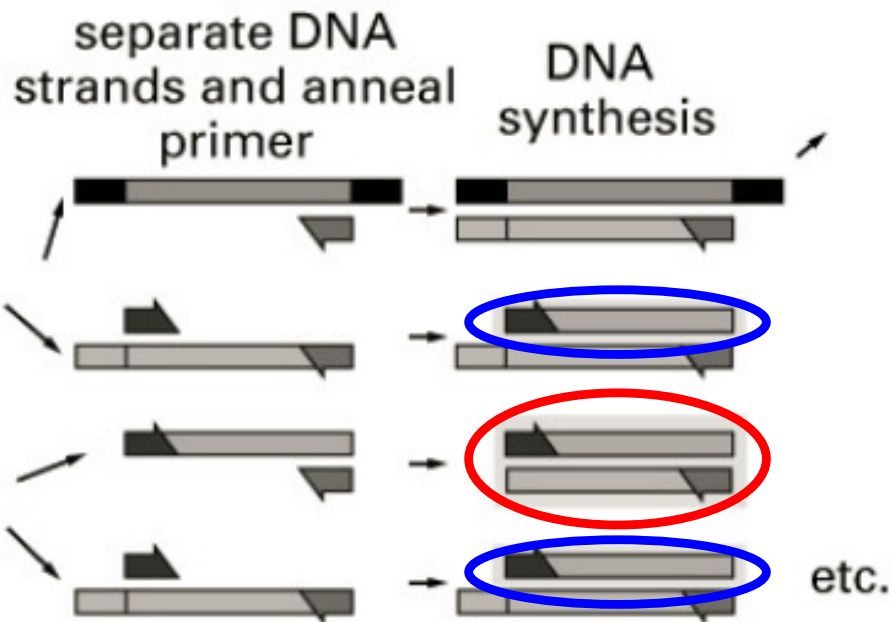
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce  
2 nuove catene di DNA



**IL PROCESSO SI RIPETE NUMEROSE VOLTE (25-40VOLTE)**



frammento di dimensione corretta



**THIRD CYCLE**  
 (producing eight double-stranded DNA molecules)



**frammento di dimensione corretta**



**molecola a doppia elica della dimensione corretta**



# Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

---

| Numero di cicli | Numero di molecole di amplificati |
|-----------------|-----------------------------------|
| 1               | 0                                 |
| 2               | 2                                 |
| 3               | 4                                 |
| 4               | 8                                 |
| 5               | 16                                |
| 6               | 32                                |
| 7               | 64                                |
| 8               | 128                               |
| 9               | 256                               |
| 10              | 512                               |
| 11              | 1.024                             |
| 12              | 2.048                             |
| 13              | 4.096                             |
| 14              | 8.192                             |
| 15              | 16.384                            |
| 16              | 32.768                            |
| 17              | 65.536                            |
| 18              | 131.072                           |
| 19              | 262.144                           |
| 20              | 524.288                           |
| 21              | 1.048.576                         |
| 22              | 2.097.152                         |
| 23              | 4.194.304                         |
| 24              | 8.388.608                         |
| 25              | 16.777.216                        |
| 26              | 33.554.432                        |
| 27              | 67.108.864                        |
| 28              | 134.217.728                       |
| 29              | 268.435.456                       |
| 30              | 536.870.912                       |

$$Y = N2^n$$

Y= numero molecole di DNA  
amplificato  
N= numero molecole di DNA  
di partenza  
n= numero dei cicli di PCR

# LA FORMULA DELLA PCR

---

$$Y = N (1+E)^n$$

Y = resa di amplificazione

N = numero di molecole di DNA di partenza

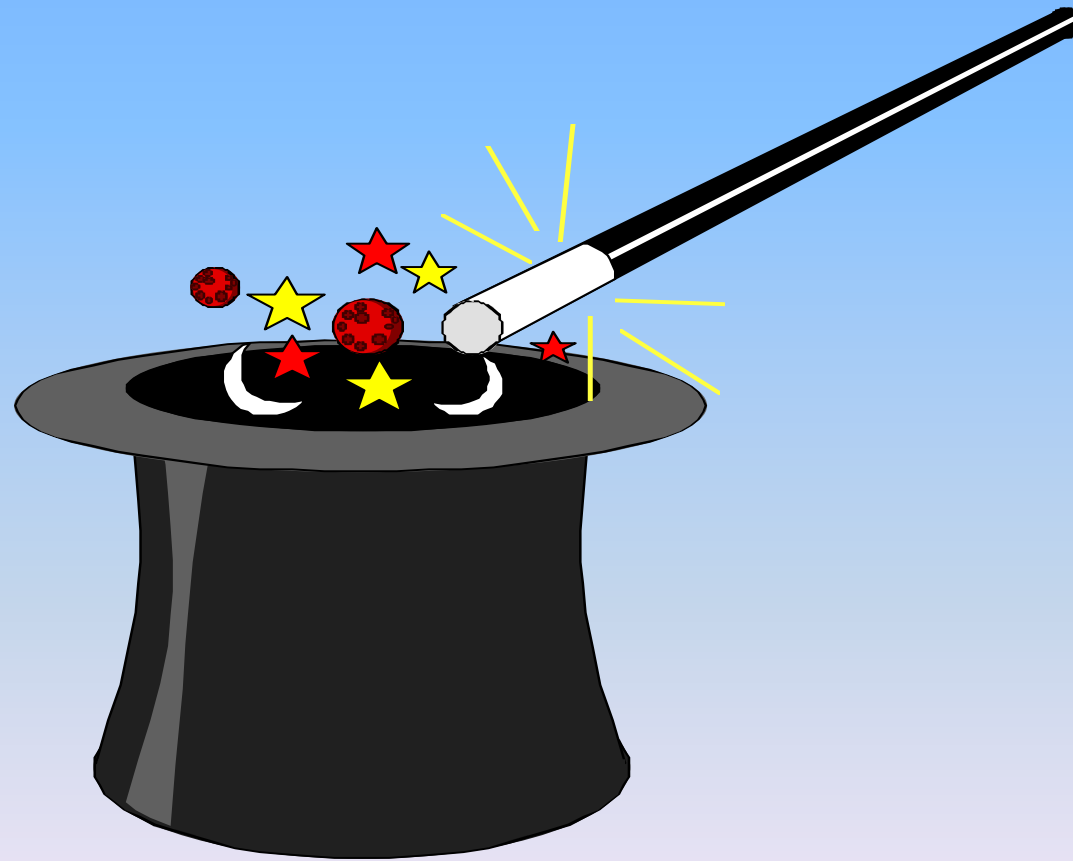
E = efficienza di reazione

n = numero di cicli di amplificazione

| efficienza media | resa finale (20 Cicli) | % teorica max |
|------------------|------------------------|---------------|
| 100              | 1.048.576              | 100           |
| 95               | 631.964                | 60            |
| 90               | 375.900                | 36            |
| 85               | 220.513                | 21            |

# I REAGENTI DELLA REAZIONE DI PCR

---



# TAMPONE DI REAZIONE

---

Standard PCR  
1x *Taq* Buffer



- 10mM Tris-HCl: pH 8.3 a t.a.
- 50mM KCl

- **controllo pH**  
(attività *Taq* polimerasi)
- **controllo forza ionica**  
....(termostabilità *Taq* polimerasi)

Cosolventi: diminuiscono la temperatura di denaturazione e di annealing:  
DMSO, formamide, glicerolo

# COMPONENTI di una REAZIONE di PCR

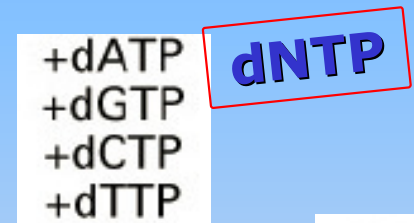
**Templato**  $\Rightarrow$  DNA a doppio filamento  
Purificato da inibitori dell'attività della DNApolimerasi



**Primers**  $\Rightarrow$  Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio



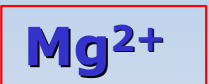
**Deossiribonucleotidi trifosfati**  $\Rightarrow$  Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP



**Tampone**  $\Rightarrow$  Mantiene pH e conc. salina richiesti dall'enzima



**MgCl<sub>2</sub>**  $\Rightarrow$  Lo ione Mg<sup>2+</sup> è essenziale per il funzionamento dell'enzima (cofattore enzimatico), oltre che essere elemento tampone della reazione.

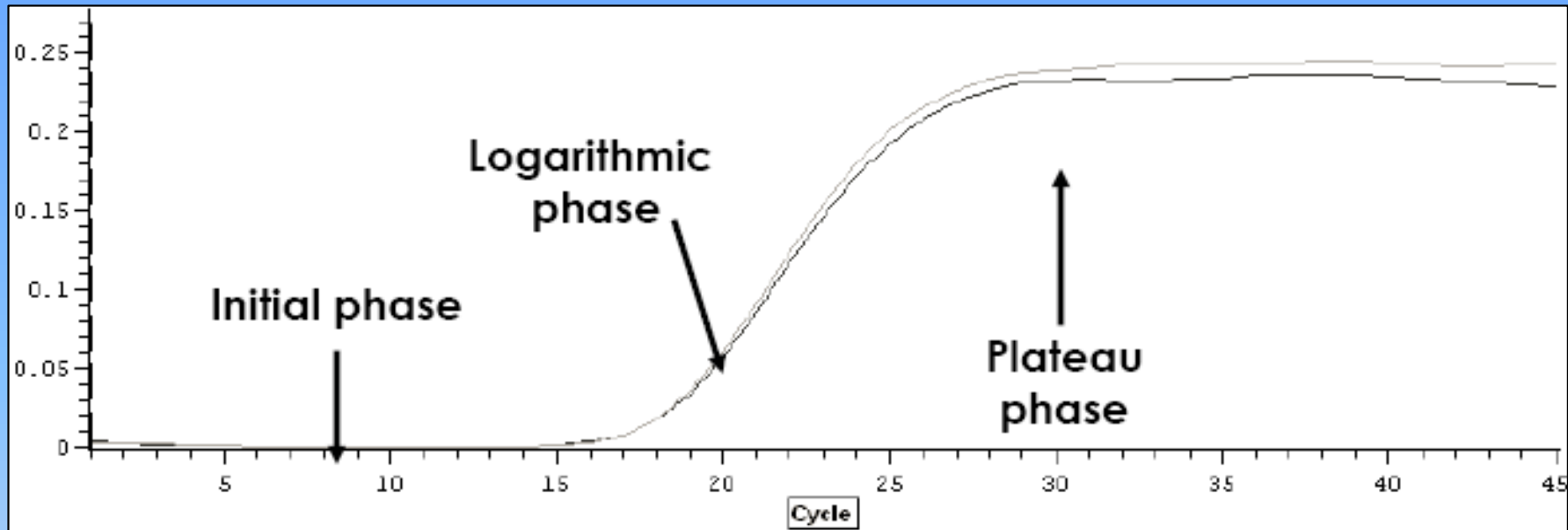


**Enzima**  $\Rightarrow$  Tradizionalmente viene usata la *Taq* polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*



**H<sub>2</sub>O:** deve essere ben purificata per evitare inibizione/interazione della reazione (milliQ o preparazione per biologia molecolare).

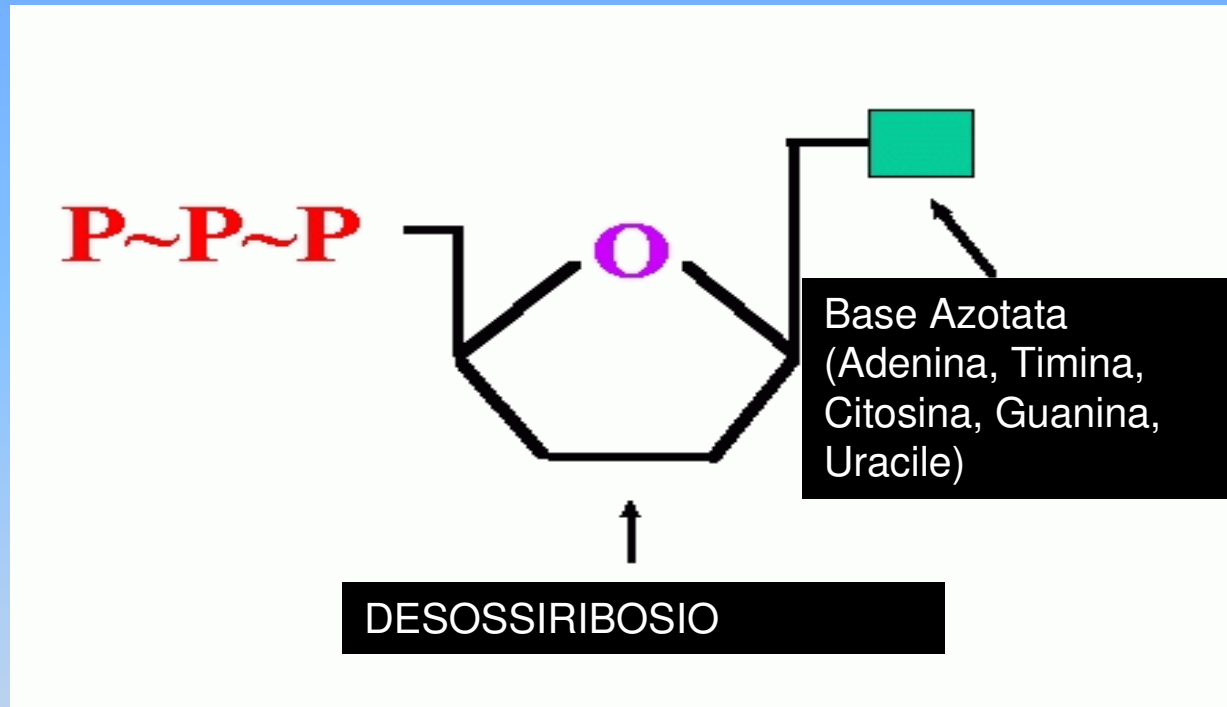
# EFFETTO PLATEAU



- **Competizione tra il prodotto dei cicli precedenti e i primers per l'ibridazione**  
→ Riduzione progressiva dell'efficienza di denaturazione e/o di ibridazione
- **Inattivazione termica dell'enzima**
- **Riduzione del rapporto molare tra le concentrazioni della DNA-polimerasi e del DNA**
- **Distruzione degli amplificati per l'attività esonucleasica 5'>3' della polimerasi**
- **Accumulo di pirofosfati (inibitori della polimerasi)**
- **Progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione**

# deossiNUCLEOTIDI TRIFOSFATI: dNTPs

---



La concentrazione utilizzata è:  
0.2 mM ciascuno (200uM)

N.B. Usare dUTP ad una concentrazione 2-5 volte maggiore

# OLIGONUCLEOTIDI O PRIMERS

---

## ➤ SPECIFICI

## ➤ DEGENERATI

- Estrema cura nella scelta della regione da amplificare
- Estrema purezza
- Lunghezza: 20-30 paia di basi (non meno di 16 bp)
- Equilibrato rapporto AT/GC
- Tm comprese tra 45-68° C
- Tm simili (+/- 2 C)

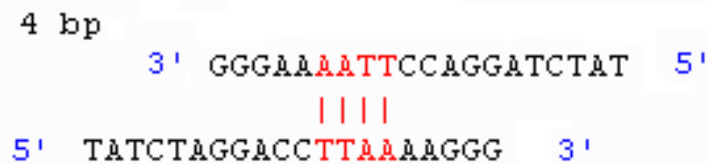
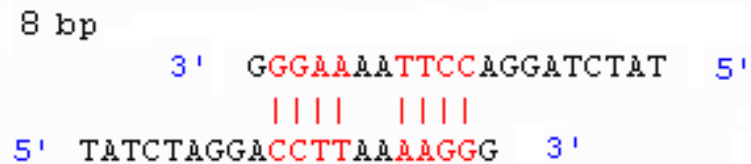


# Internal Structure

## Hairpin

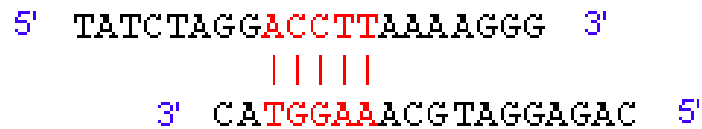


## Self-Dimer



## Dimer

forward primer



reverse primer

# CONCENTRAZIONE DI $MgCl_2$

---

- Necessario per l'attività enzimatica
- Stabilizza l'ibridazione del DNA
- Sottratto alla reazione da diversi fattori: fosfati del dsDNAe oligo, EDTA.
- Legato dai dNTPs (gruppi fosfato)
- Concentrazione ottimale: dNTPs+ primers+ DNA+enzima

La concentrazione utilizzata è:  
0.5-5 Mm (generalmente 1.5 mM)

# POLIMERASI

TABLE A4-5 Properties of Thermostable DNA Polymerases

| ENZYME                             | MANUFACTURER <sup>a</sup>  | ORGANISM                          | OPTIMUM TEMPERATURE (°C) | EXONUCLEASE ACTIVITY          | ERROR RATE $\times 10^{-6}$ | STABILITY (MINUTES AT SPECIFIED TEMPERATURE) | $K_m$ dNTP ( $\mu$ M) | $K_m$ DNA ( $\mu$ M) |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------|----------------------|
| <i>Taq</i>                         | BM, LT, Pro, Strat, P-E, T | <i>T. aquaticus</i>               | 75–80                    | 5′–3′                         | 20–100                      | 9 min at 97.5°C                              | 10–16                 | 2                    |
| <i>Taq</i> Stoffel fragment        | P-E                        | <i>T. aquaticus</i>               | 75–80                    | none                          | 50                          | 21 min at 97.5°C                             | –                     | 2                    |
| <i>rTth</i>                        | BM, ET, P-E                | <i>T. thermophilus</i>            | 75–80                    | 5′–3′                         | ~20                         | 20 min at 95°C                               | 115                   | –                    |
| <i>Tfl</i>                         | Pro                        | <i>T. flavus</i>                  | 70                       | none                          | 100                         | 120 min at 70°C                              | 63                    | –                    |
| <i>Hot Tub</i>                     | Amr                        | <i>T. ubiquitus</i>               | –                        | none                          | –                           | –  | –                     | –                    |
| <i>Tbr</i>                         | Amr, Finnz                 | <i>T. brockianus</i>              | 75–80                    | 5′–3′                         | –                           | 150 min at 96°C                              | –                     | –                    |
| <i>ULTma</i>                       | P-E, Roche                 | <i>Thermotoga maritima</i>        | 75–80                    | 3′–5′                         | –                           | 50 min at 95°C                               | –                     | –                    |
| <i>rBst</i>                        | ET                         | <i>Bacillus sterothermophilus</i> | 60–65                    | 5′–3′<br>(3′–5′) <sup>b</sup> | –                           | –  | –                     | –                    |
| Isotherm <i>Bst</i> large fragment | ET, Bio-Rad                | <i>Bacillus sterothermophilus</i> | 60–65                    | none                          | –                           | –  | 7–85                  | –                    |
| <i>Pwo</i>                         | BM                         | <i>Pyrococcus woesei</i>          | 60–65                    | 3′–5′                         | 3.2                         | >2 hr at 100°C                               | –                     | –                    |
| <i>Tli</i>                         | Pro                        | <i>Thermococcus litoralis</i>     | 70–80                    | 3′–5′                         | 20–45                       | 100 min at 100°C                             | 66                    | 0.1                  |
| <i>DeepVent</i>                    | NEB                        | <i>Pyrococcus</i> (strain GB-D)   | 70–80                    | 3′–5′                         | 20–45                       | 480 min at 100°C                             | 50                    | 0.01                 |
| <i>Pfu</i>                         | Strat                      | <i>Pyrococcus furiosus</i>        | 72–78                    | 3′–5′                         | 1.6                         | 240 min at 95°C                              | –                     | –                    |