

qPCR

PCR Quantitativa : Real-Time PCR

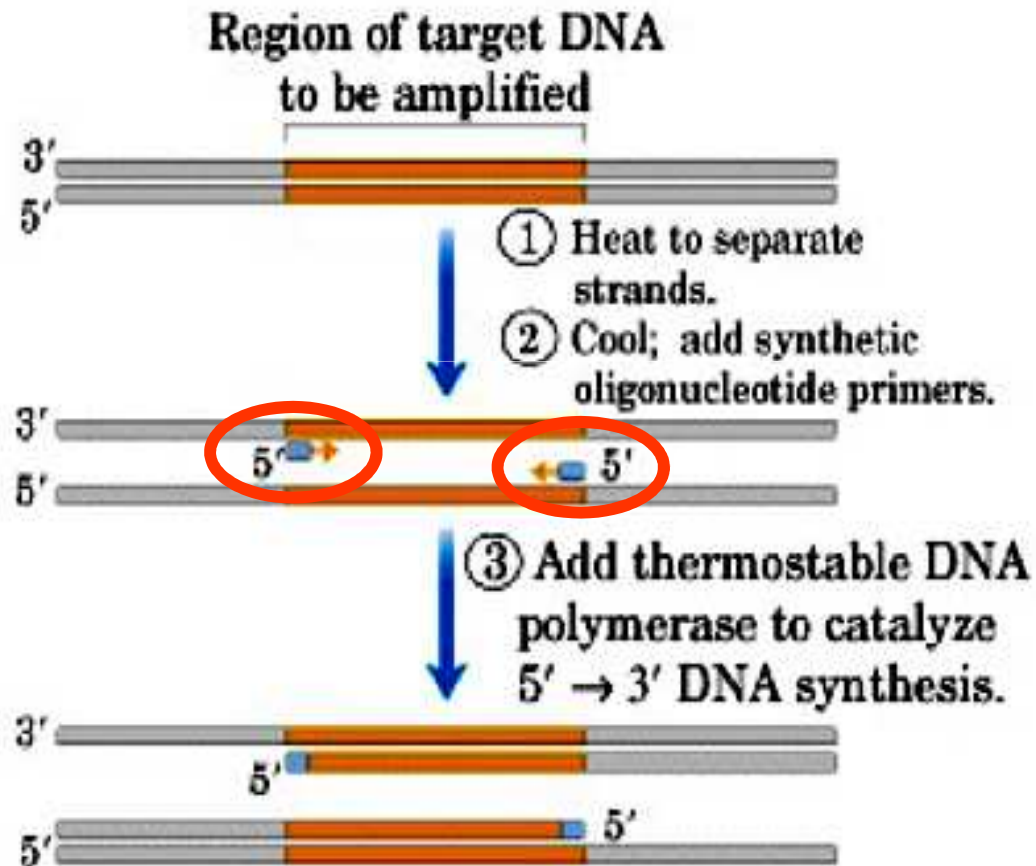
La real-time PCR, o PCR quantitativa, è una tecnologia utilizzata per quantificare gli acidi nucleici attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da un fluoroforo.

Questa tecnica associa amplificazione e quantificazione in un' unica reazione.

In una reazione di real-time PCR, la fluorescenza aumenta in proporzione all'accumulo dei prodotti di PCR.

Polymerase Chain Reaction: principio

CICLI TERMICI:



**1 DENATURAZIONE
(94-96°C)**

**2 ANNEALING
(50-65°C)**

**3 EXTENSION
(72°C)**

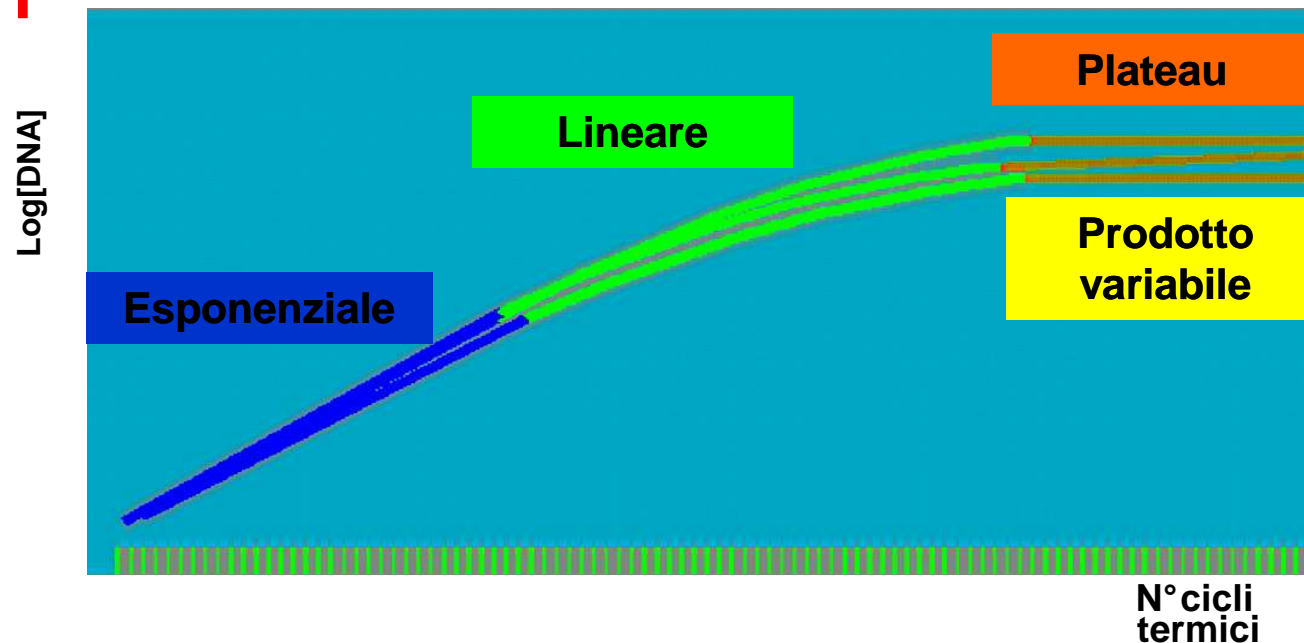
Polymerase Chain Reaction: resa

1) Resa teorica: $P=(2)^n T$

Prodotto (**P**) incrementa esponenzialmente con il numero di cicli di PCR (**n**) e dipende da **T**, numero di copie di templatato di partenza

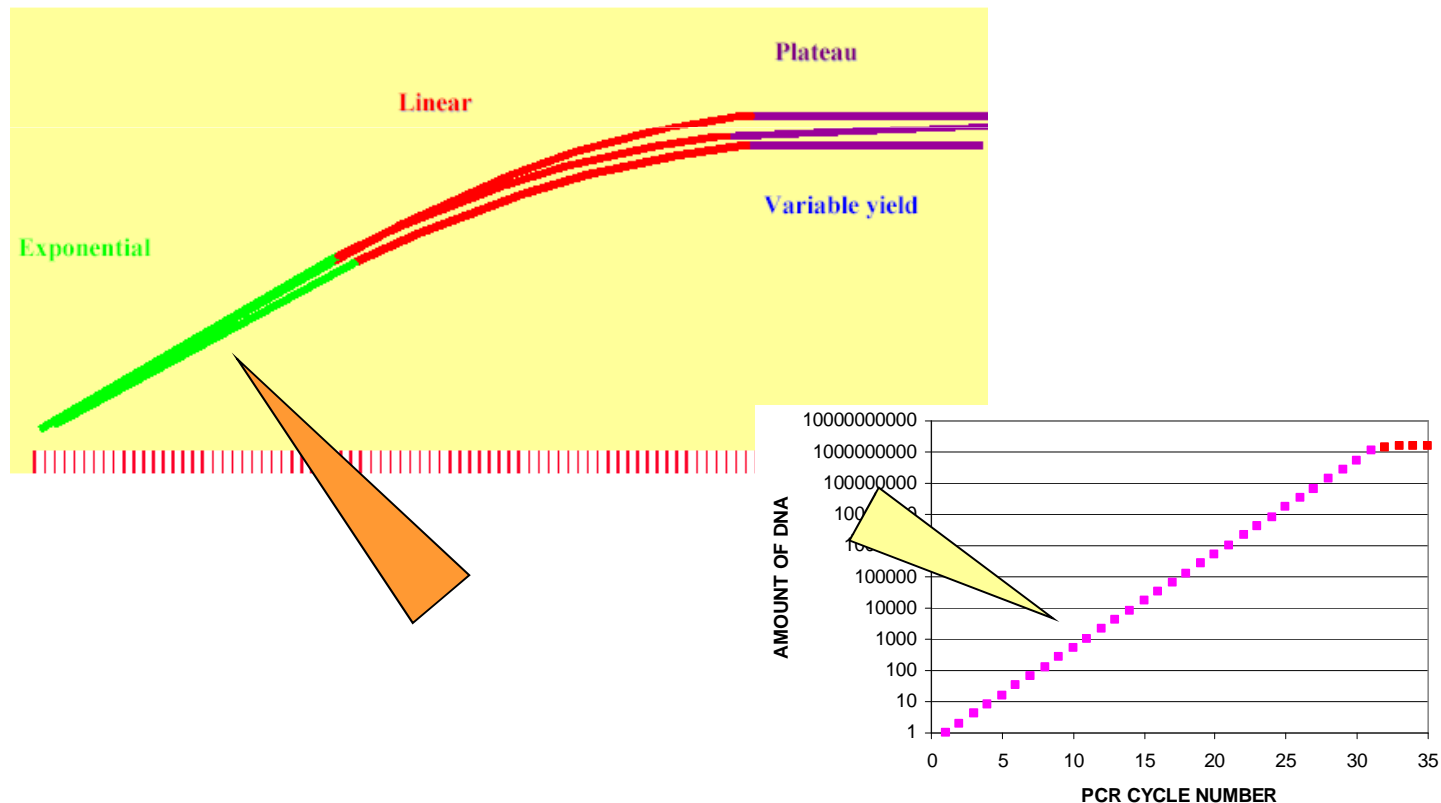
2) Resa effettiva: effetto plateau

$P=(1+e)^n T$



PCR Quantitativa : Real-Time PCR

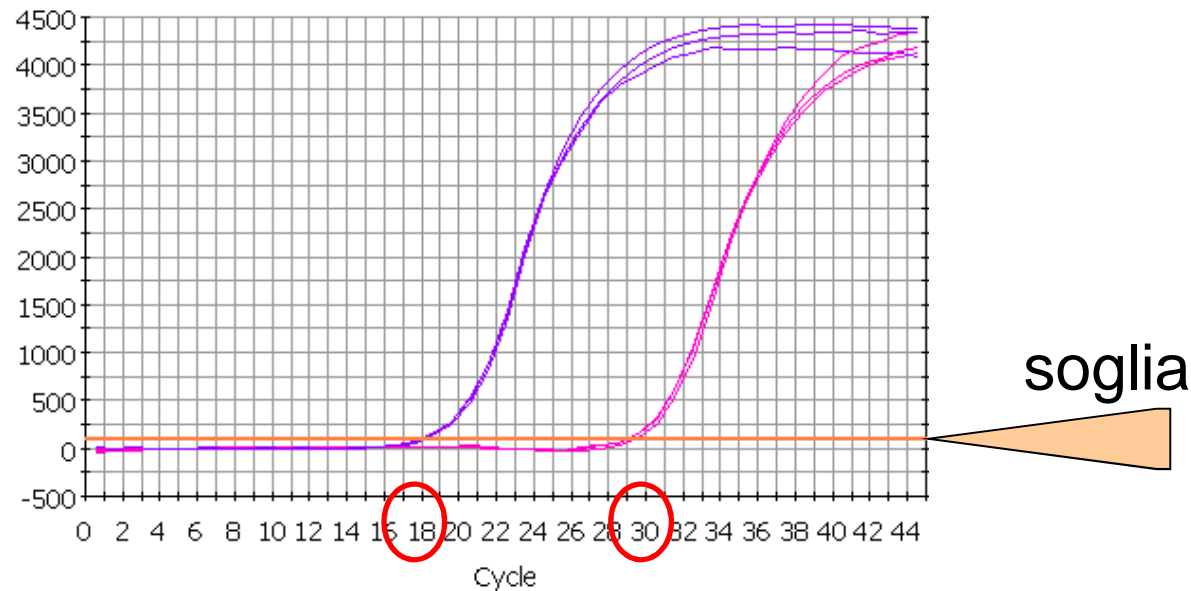
Durante la fase esponenziale della PCR, la **quantità di copie prodotte** è proporzionale al **numero di copie di partenza**; ciò è rilevabile grazie alla misurazione in “tempo reale” della fluorescenza emessa da fluorofori usati durante l’amplificazione



PCR Quantitativa : Real-Time PCR

Principio base:

Maggiore è il numero delle “molecole stampo” presenti all’inizio della reazione e **minore** sarà il numero di cicli necessari per raggiungere un determinato valore minimo di ammontare di prodotto (Cycle threshold **Ct** - ciclo soglia).



REAL-TIME PCR: perché?

VANTAGGI

- La misurazione del prodotto della PCR tradizionale avviene quando la reazione ha ormai raggiunto il plateau; la PCR real-time compie l'analisi durante la fase di amplificazione esponenziale.
- Sensibilità elevata.
- Richiede limitate quantità di campione di partenza .
- No-post PCR processing.

REAL-TIME PCR: perché?

SVANTAGGI

- I reagenti necessari sono piuttosto costosi.
- Il processo richiede un accurato setting.
- I dati devono essere correttamente validati per avere valenza scientifica.

Rna isolation



cDNA syntesis

(may be performed during the Real-time PCR)



Real-time PCR data acquisition

(performed with different detection chemistries)



Normalized data



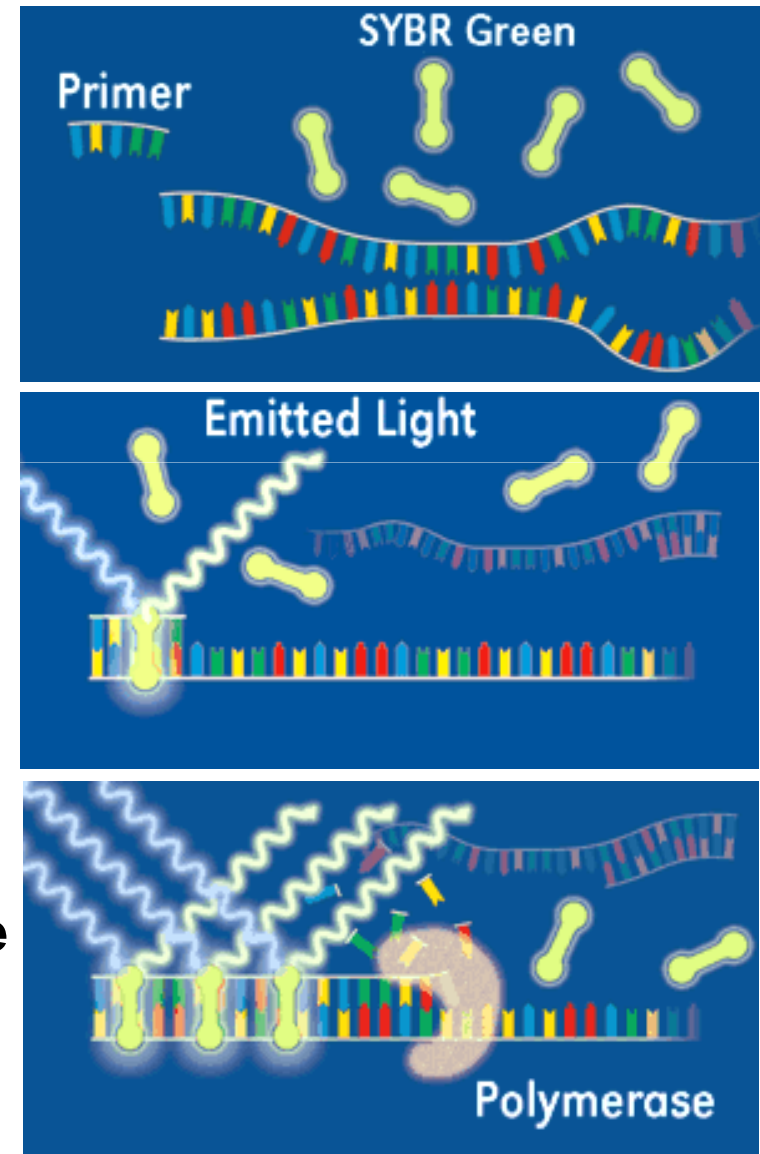
Data analysis

DNA Binding Dyes: e.g. : SYBR Green

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

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

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



Real-Time PCR: Normalizzazione

Un **Reference** è un gene cui si fa riferimento per la quantificazione relativa.

Geni HOUSEKEEPING (GAPDH, B-actina, sub-unità ribosomali) sono comunemente utilizzati come references.

- sono geni ubiquitari
- espressi in maniera costitutiva
- non risentono dei trattamenti sperimentali
- mantengono la loro espressione costante nei diversi tipi cellulari.