

qPCR

# PCR Quantitativa : Real-Time PCR

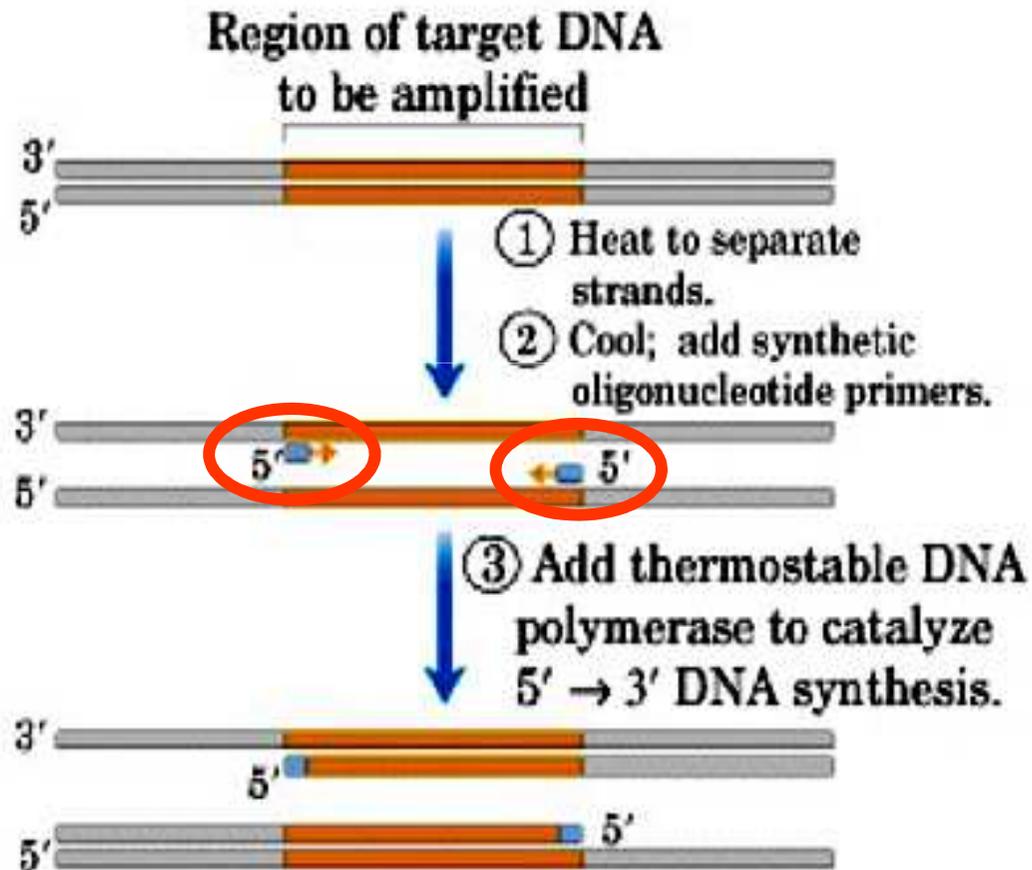
La real-time PCR, o PCR quantitativa, è una tecnologia utilizzata per quantificare gli acidi nucleici attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da un fluoroforo.

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)**

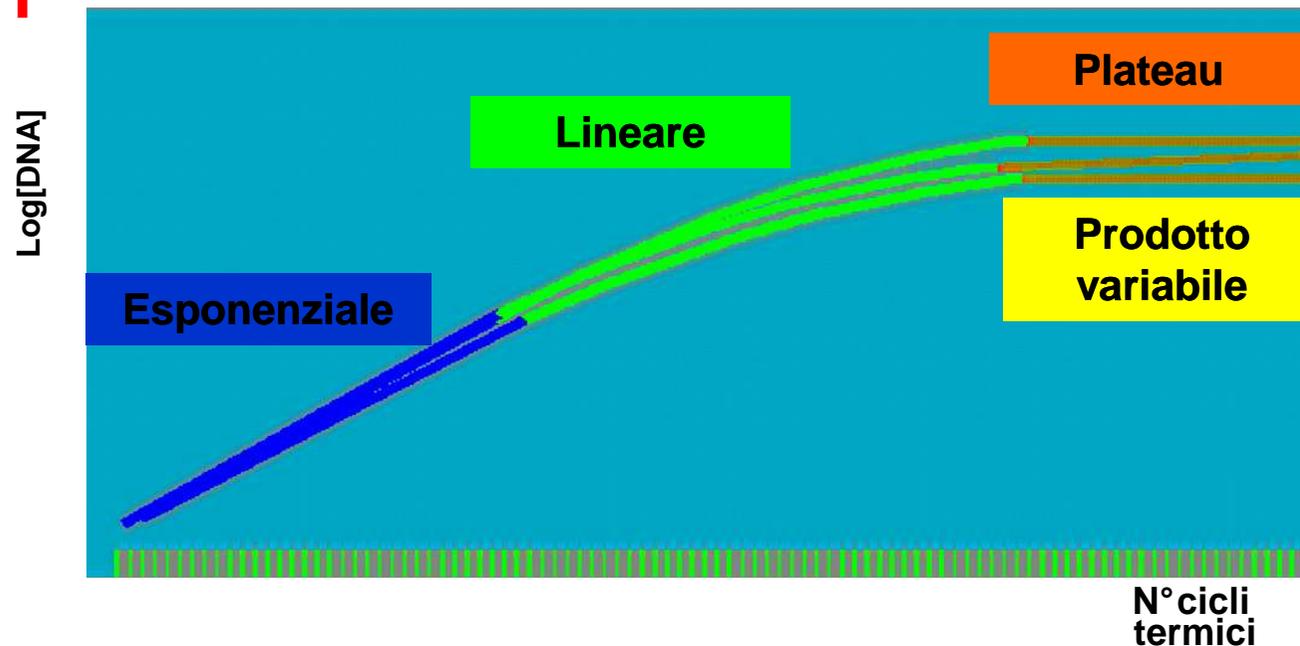
# Polymerase Chain Reaction: resa

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

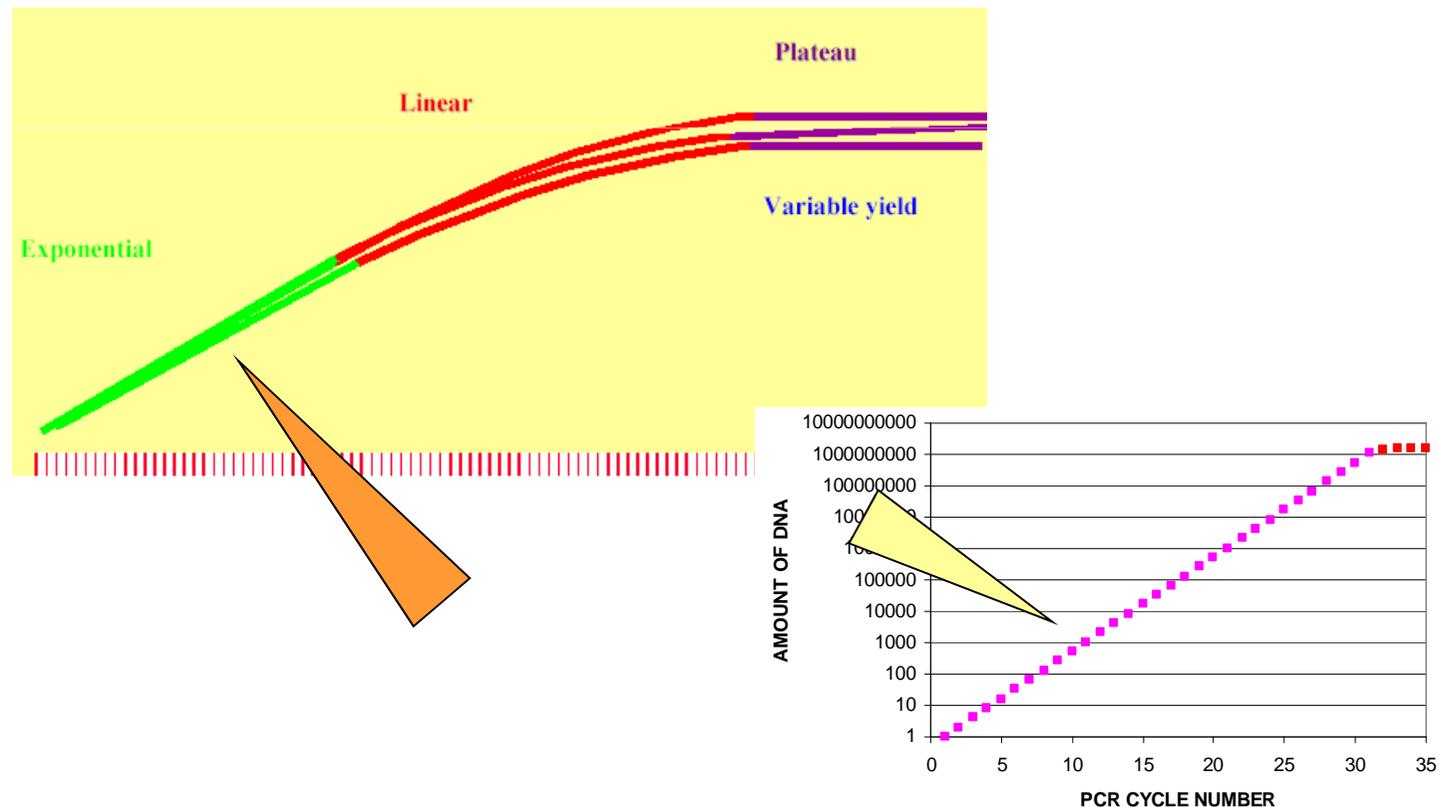
2) Resa effettiva: effetto plateau

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



# PCR Quantitativa : Real-Time PCR

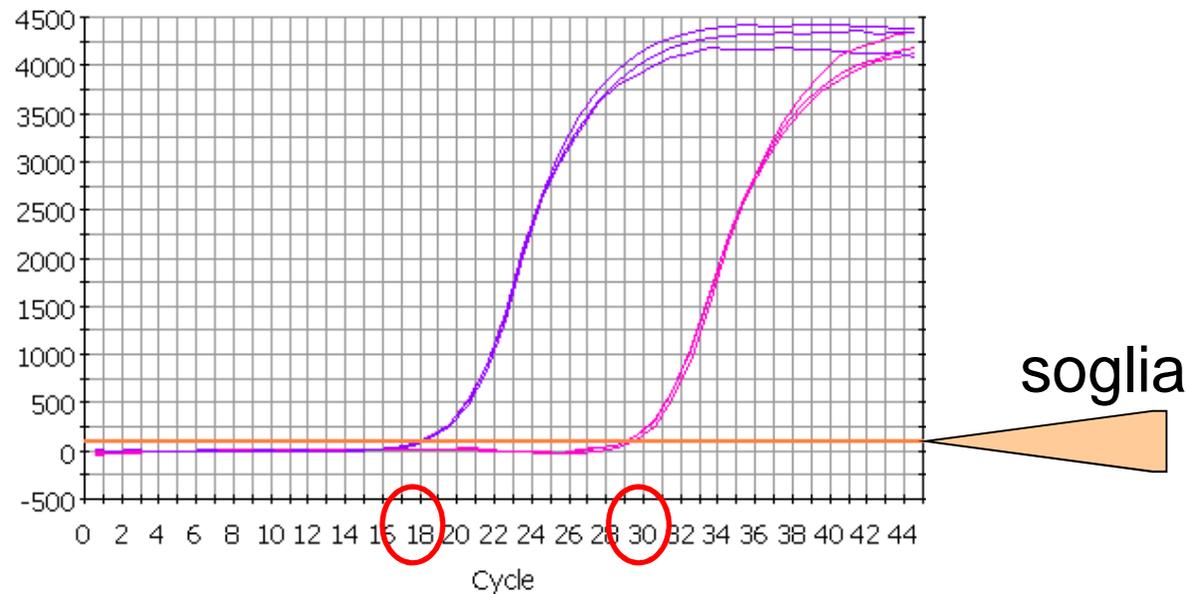
Durante la fase esponenziale della PCR, la **quantità di copie prodotte** è proporzionale al **numero di copie di partenza**; ciò è rilevabile grazie alla misurazione in “tempo reale” della fluorescenza emessa da fluorofori usati durante l’amplificazione



# 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



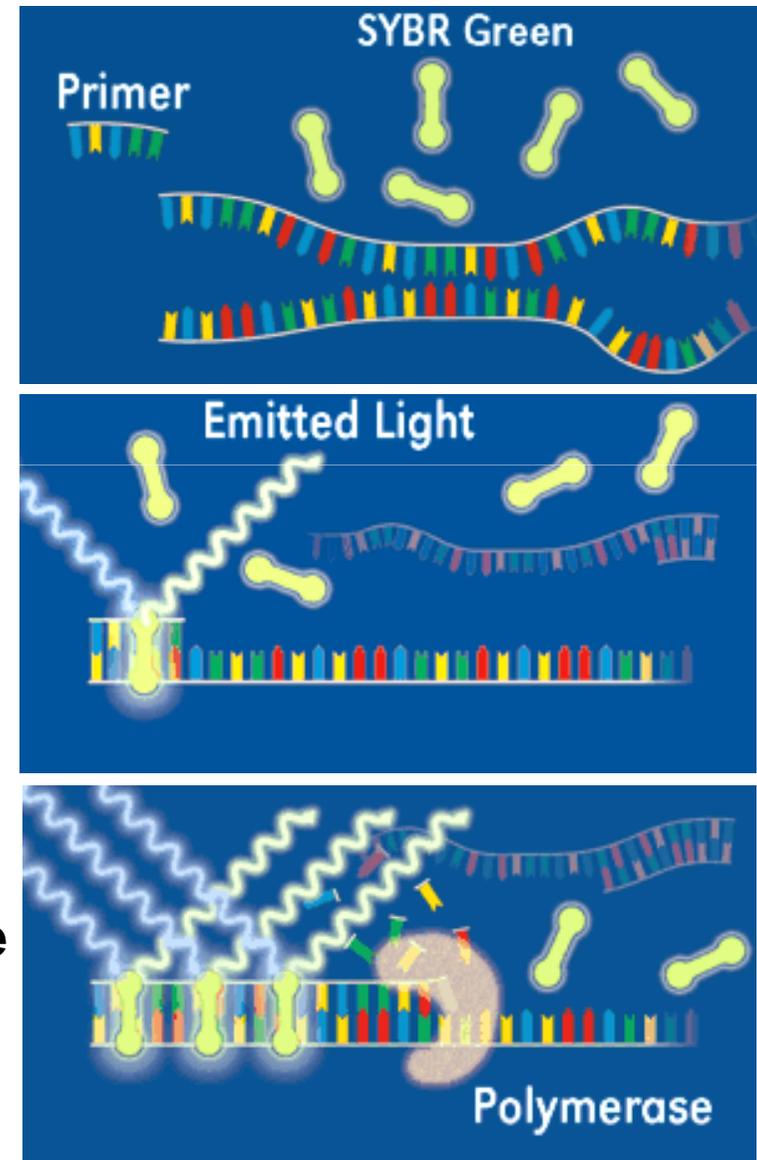
Data analysis

# 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.