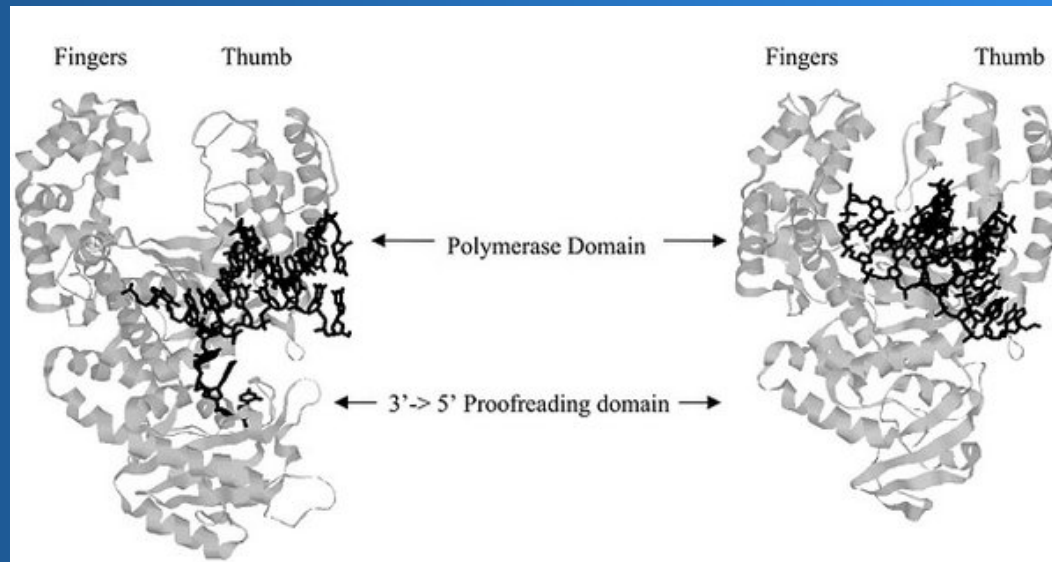


# Polimerasi termostabili

**Chien** et al nel **1976** isolarono una polimerasi termoresistente dal batterio *Thermus aquaticus* (Yellowston Park). L'enzima **Taq** polimerizza fino a circa 80°C ma soprattutto "sopravvive" a 95°C.



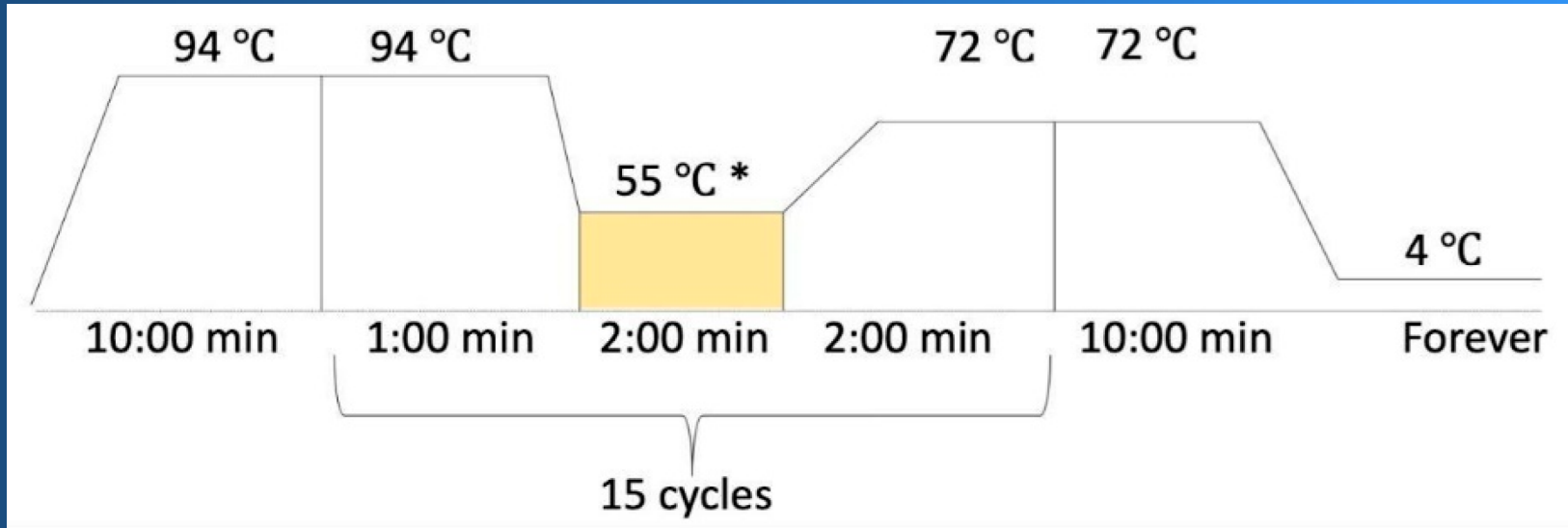
**Saiki** et al. nel **1988** per primi introdussero la Taq per operare le PCR senza riaggiungere l'enzima, facendo nascere la biologia molecolare moderna



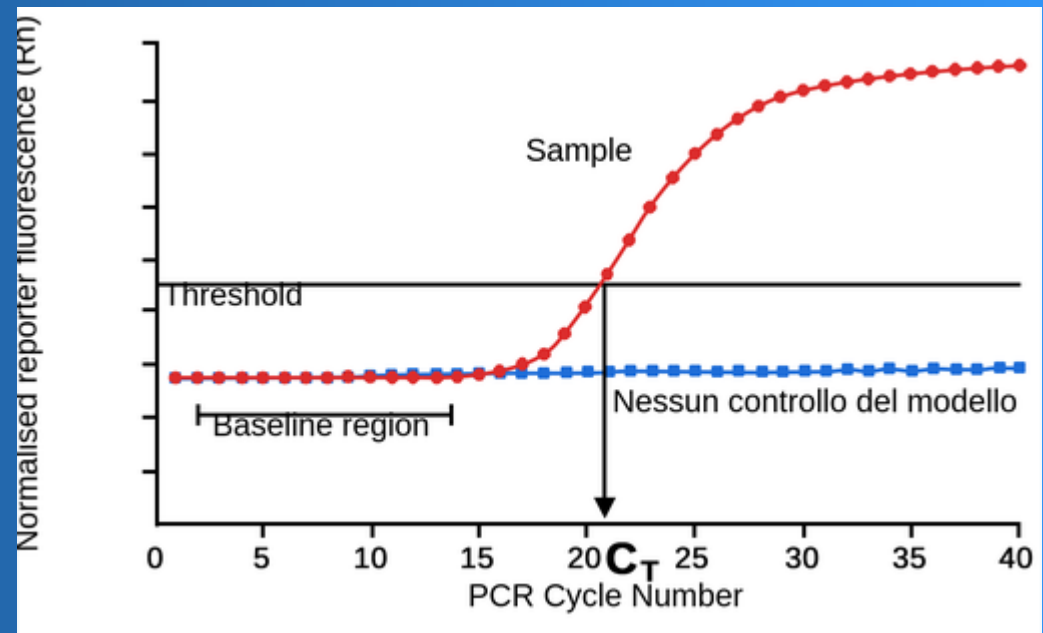
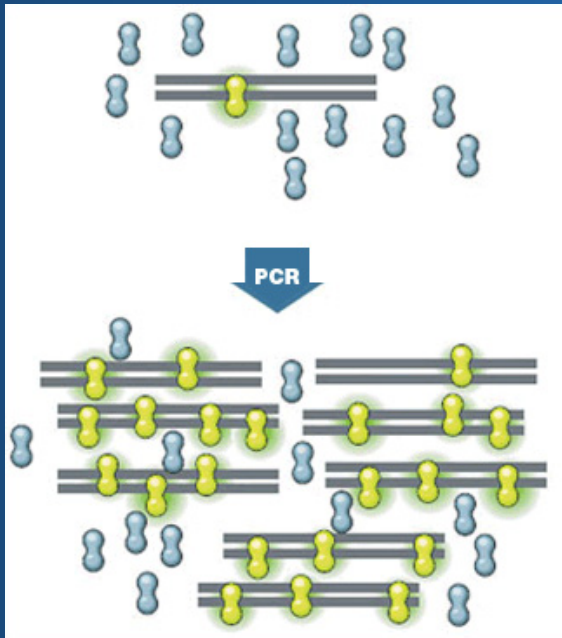
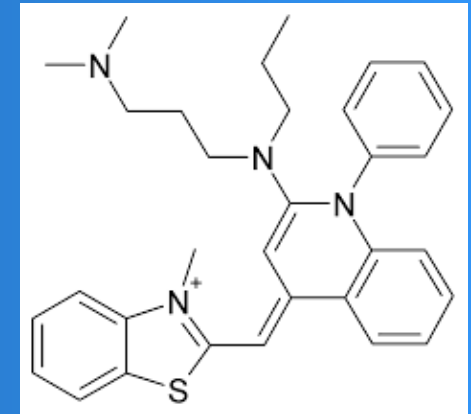
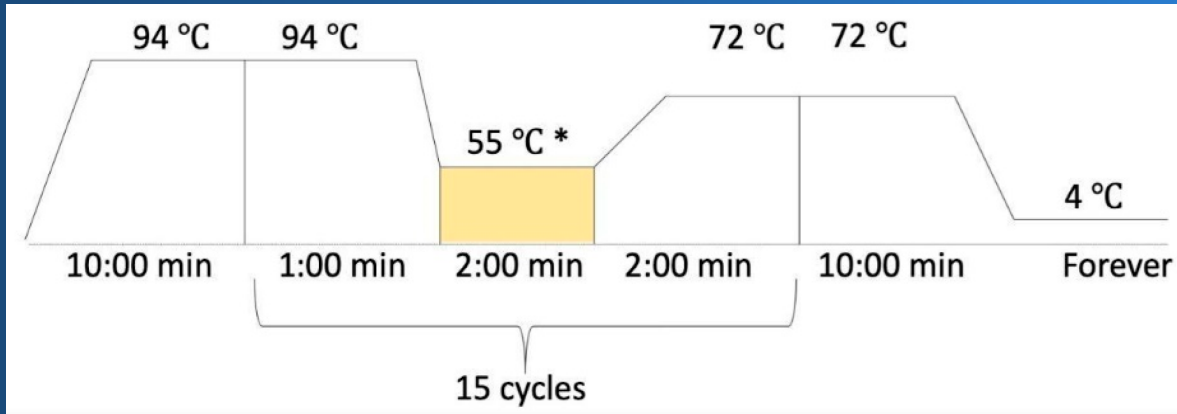
*E. coli* DNA polymerase

Taq DNA polymerase

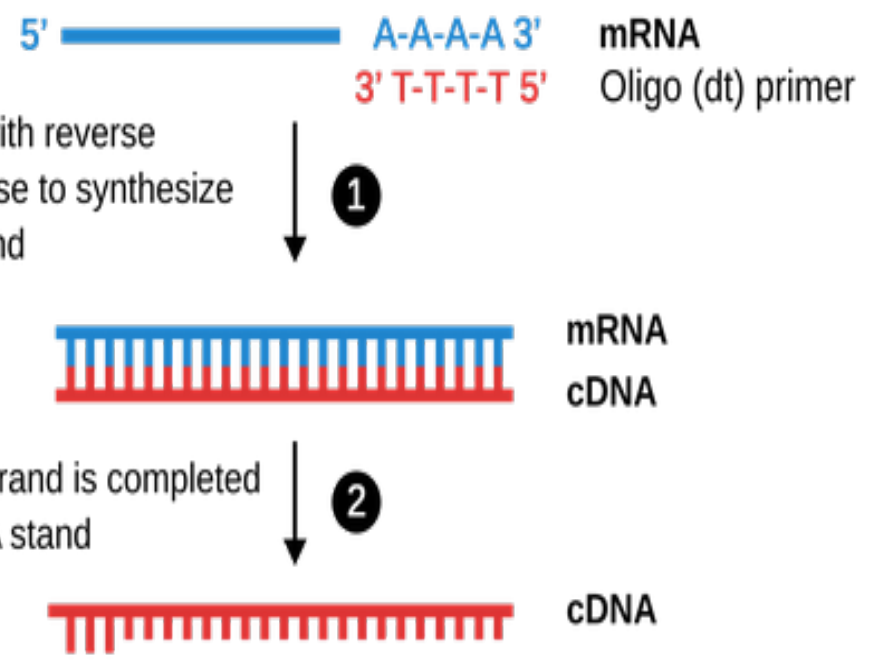
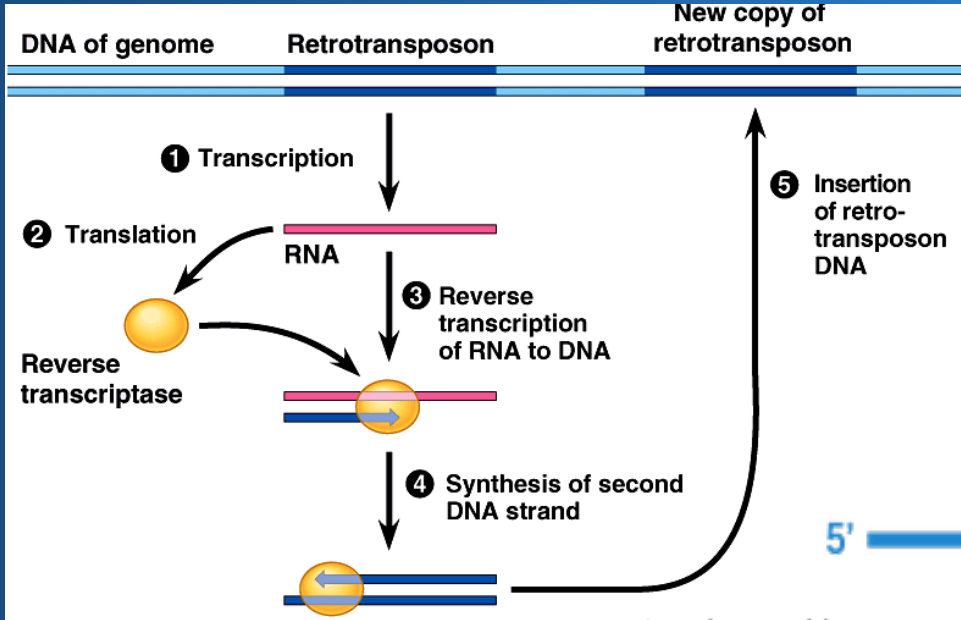
# Il termociclatore



# La PCR quantitativa (qPCR)



# Trascrittasi inversa



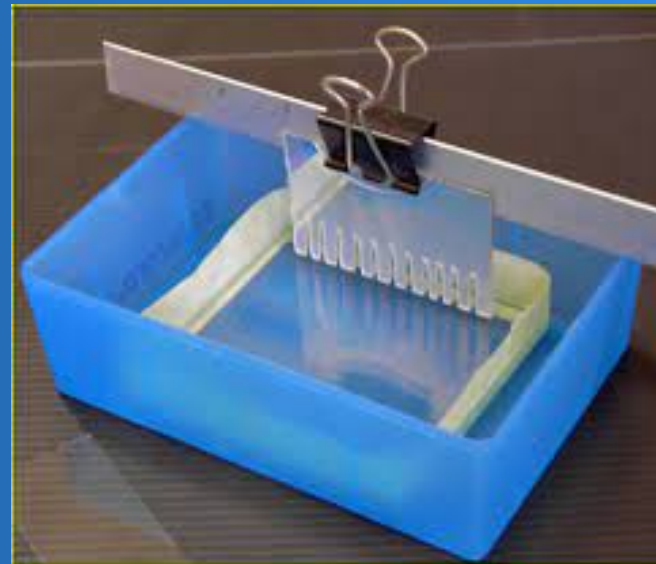
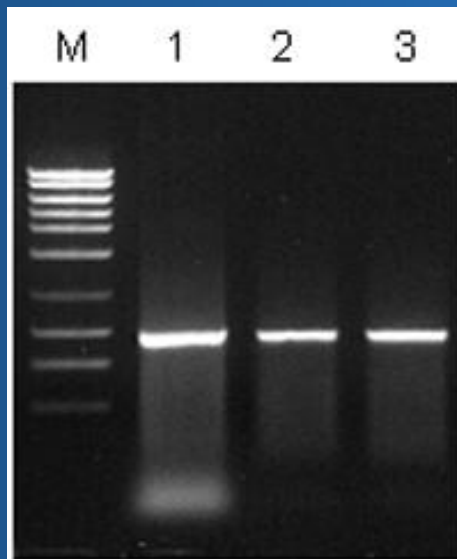
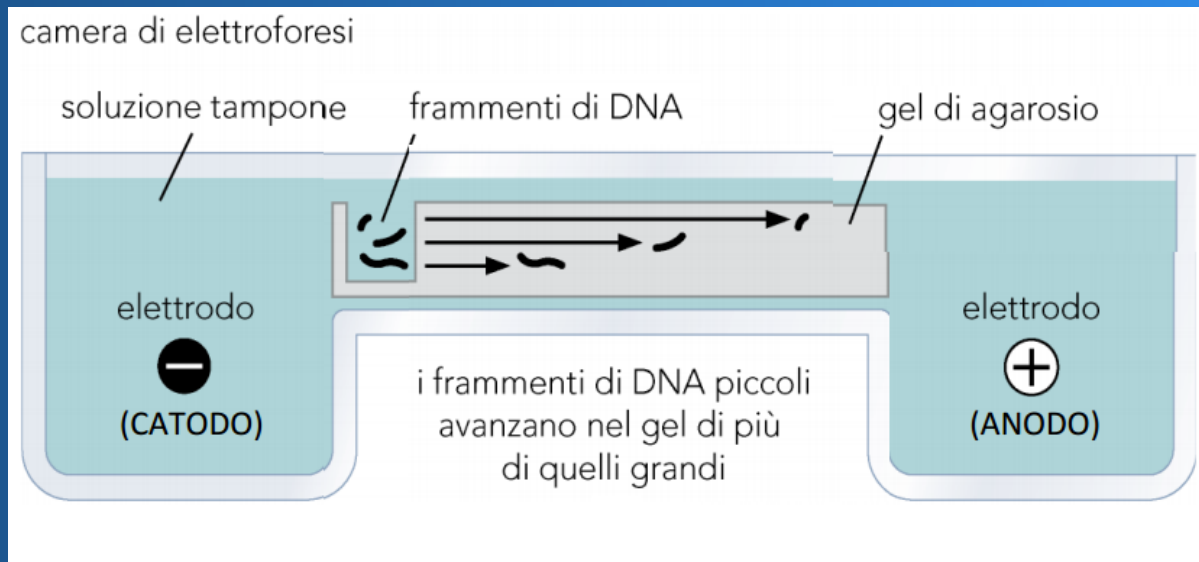
## DNA Polymerase Market Size 2023 to 2034 (USD Million)



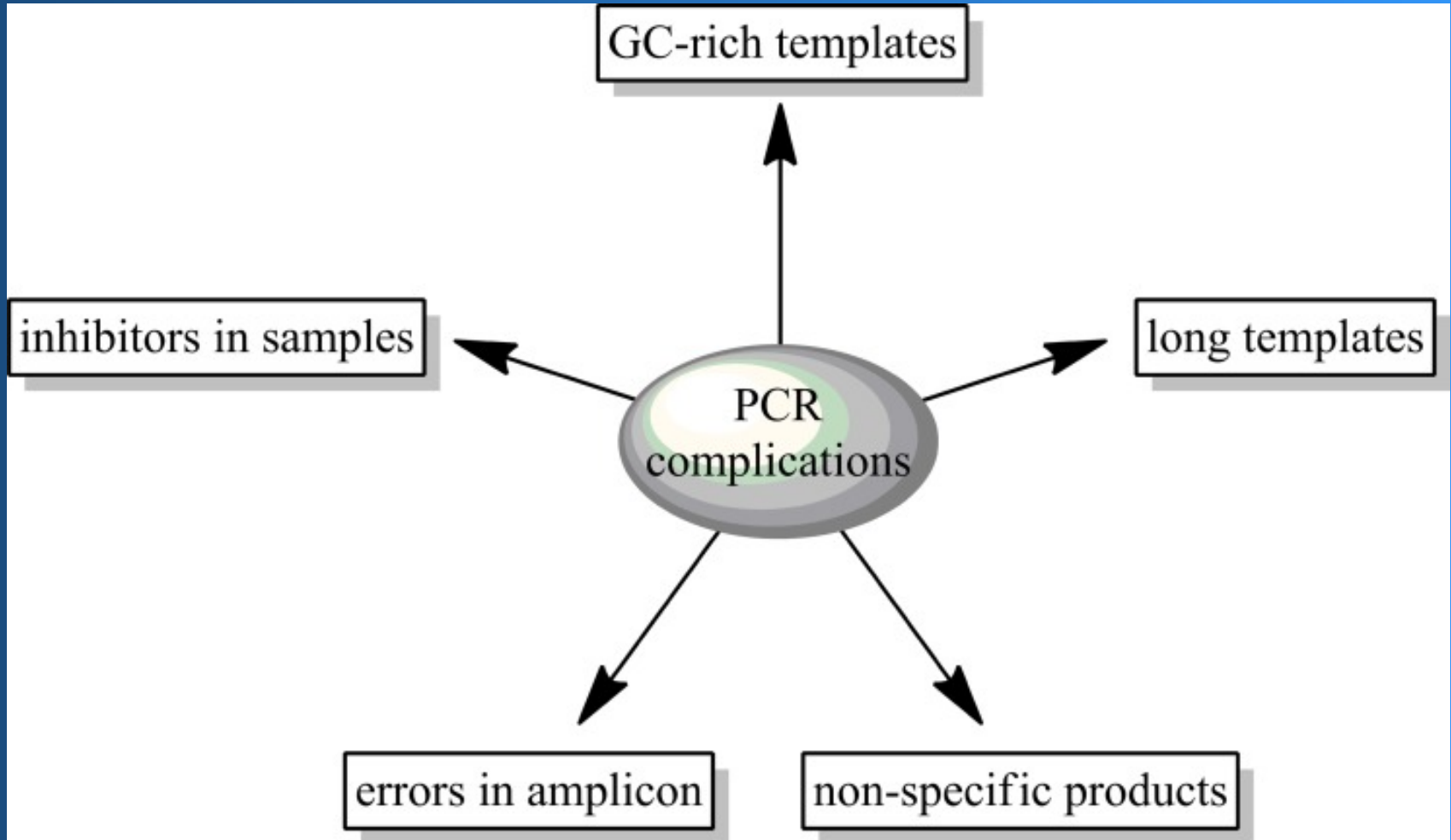
Source: <https://www.precedenceresearch.com/dna-polymerase-market>



# Visualizzazione del prodotto di PCR



# PCR: non sempre funziona

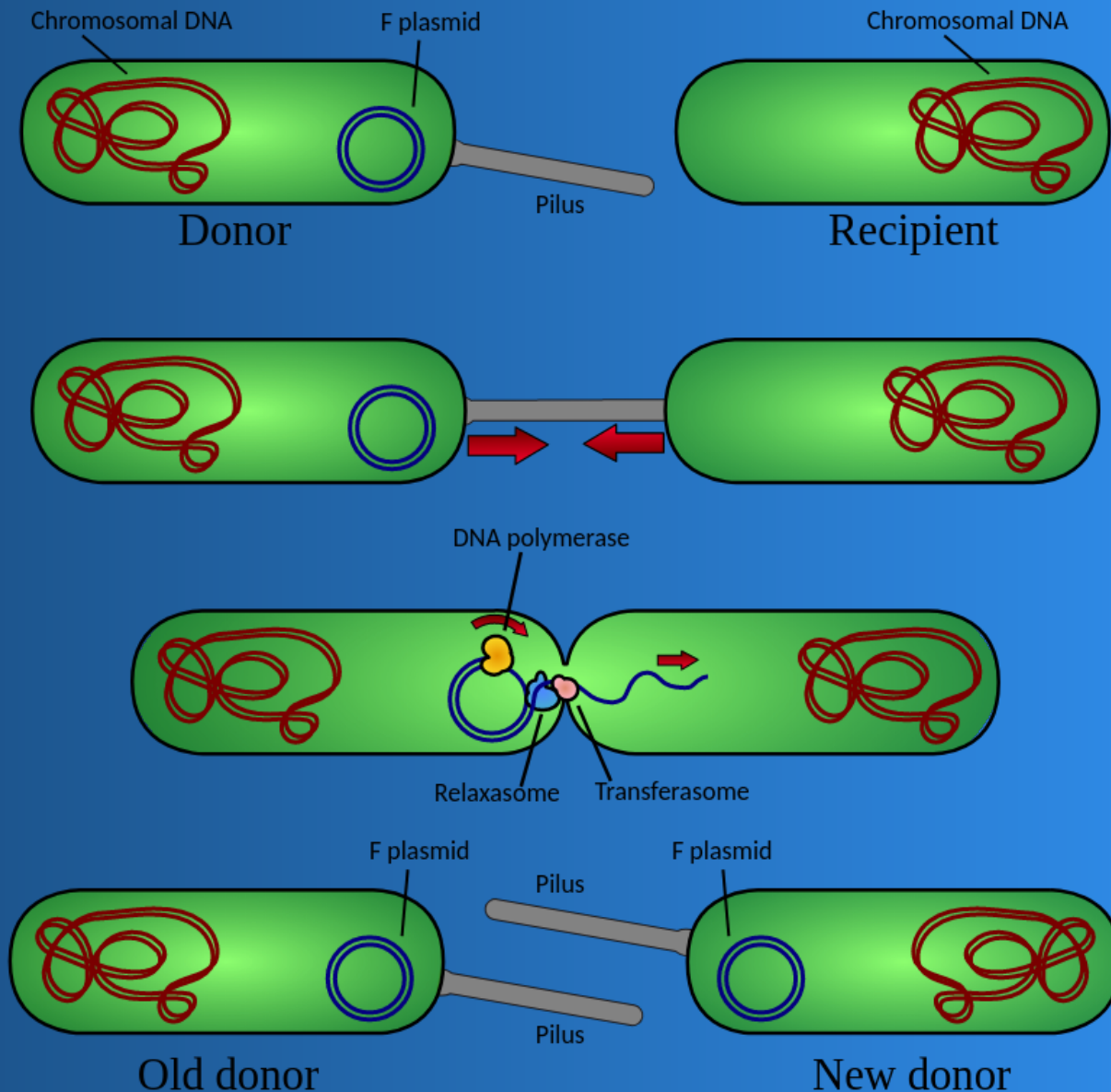


# Miglioramento delle performance

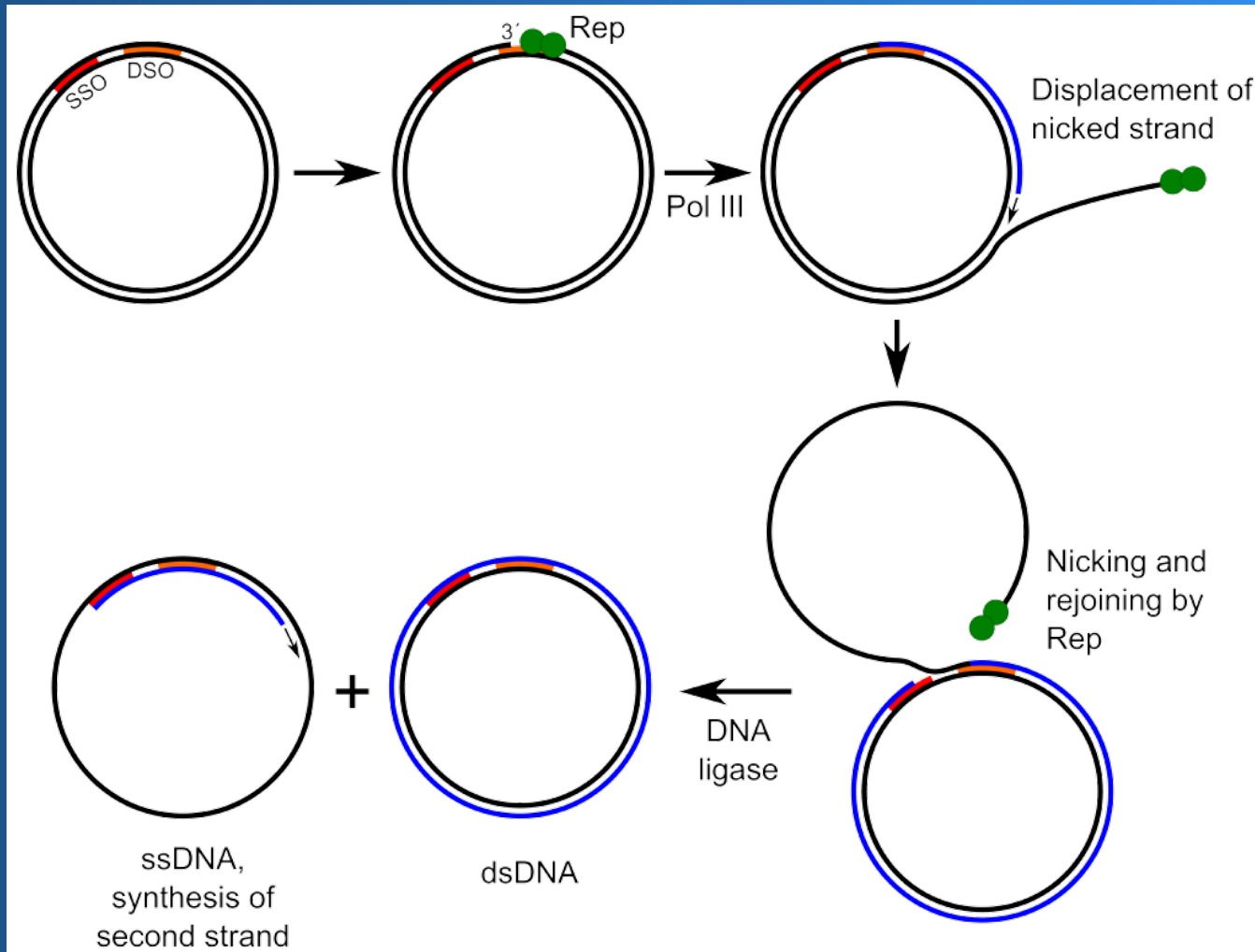
Trade name	Structure	Effect
Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific)	<i>Sso7d + Pfu</i>	Increased fidelity and processivity, amplification of longer DNA fragments
Hercules II Fusion (Agilent Technologies)	<i>Sso7d + Pfu</i>	Amplification of matrixes that are rich in GC, high sensitivity, increased processivity
Phusion (NEB)	<i>Sso7d + Pfu</i>	Greater fidelity, rate, and specificity, amplification of matrixes that are rich in GC
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)	<i>Sso7d + Pfu</i>	Amplification of longer DNA fragments, DNA processivity and fidelity



# Duplicazione del DNA in batteri

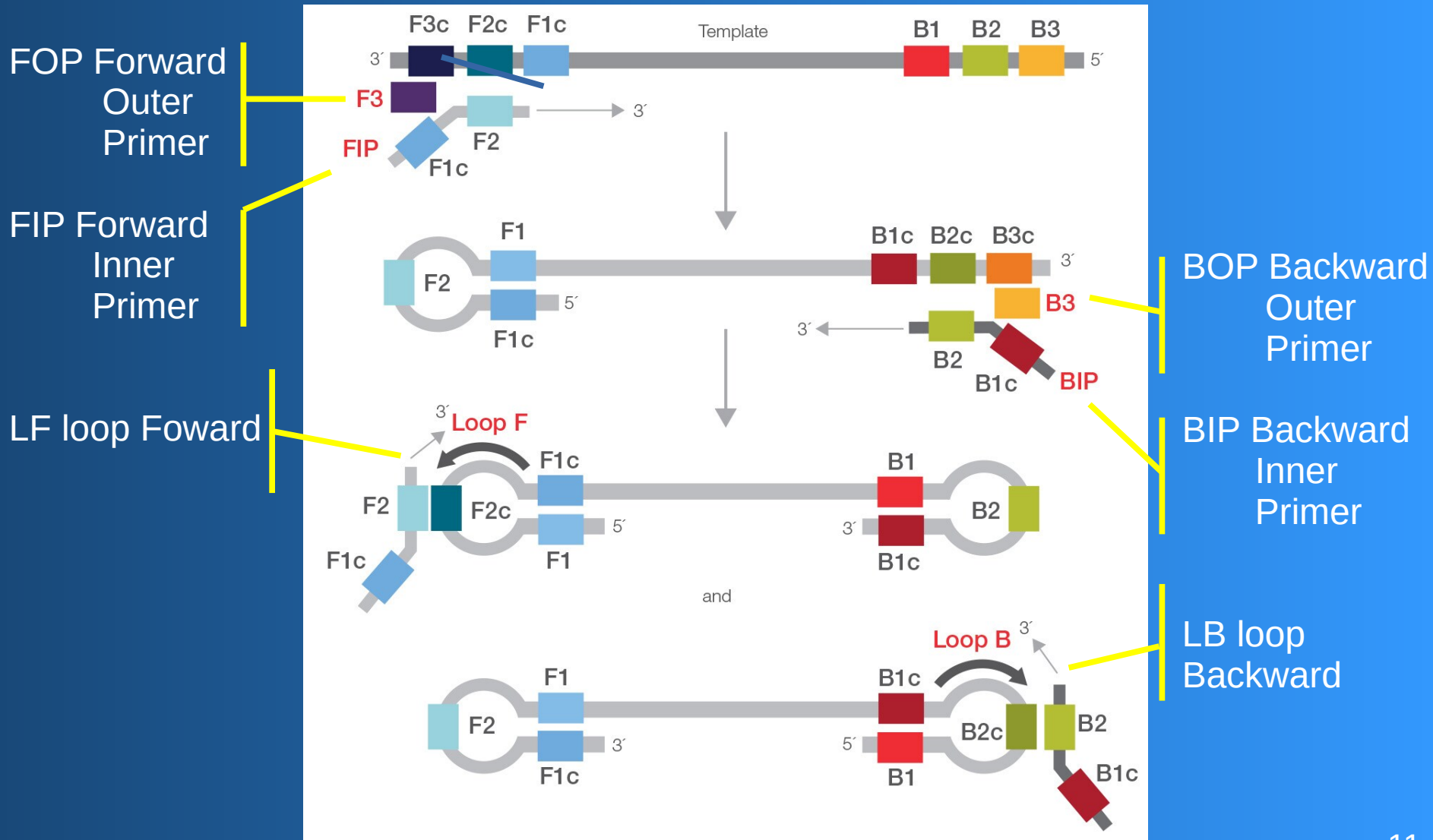


# Duplicazione del DNA in batteri

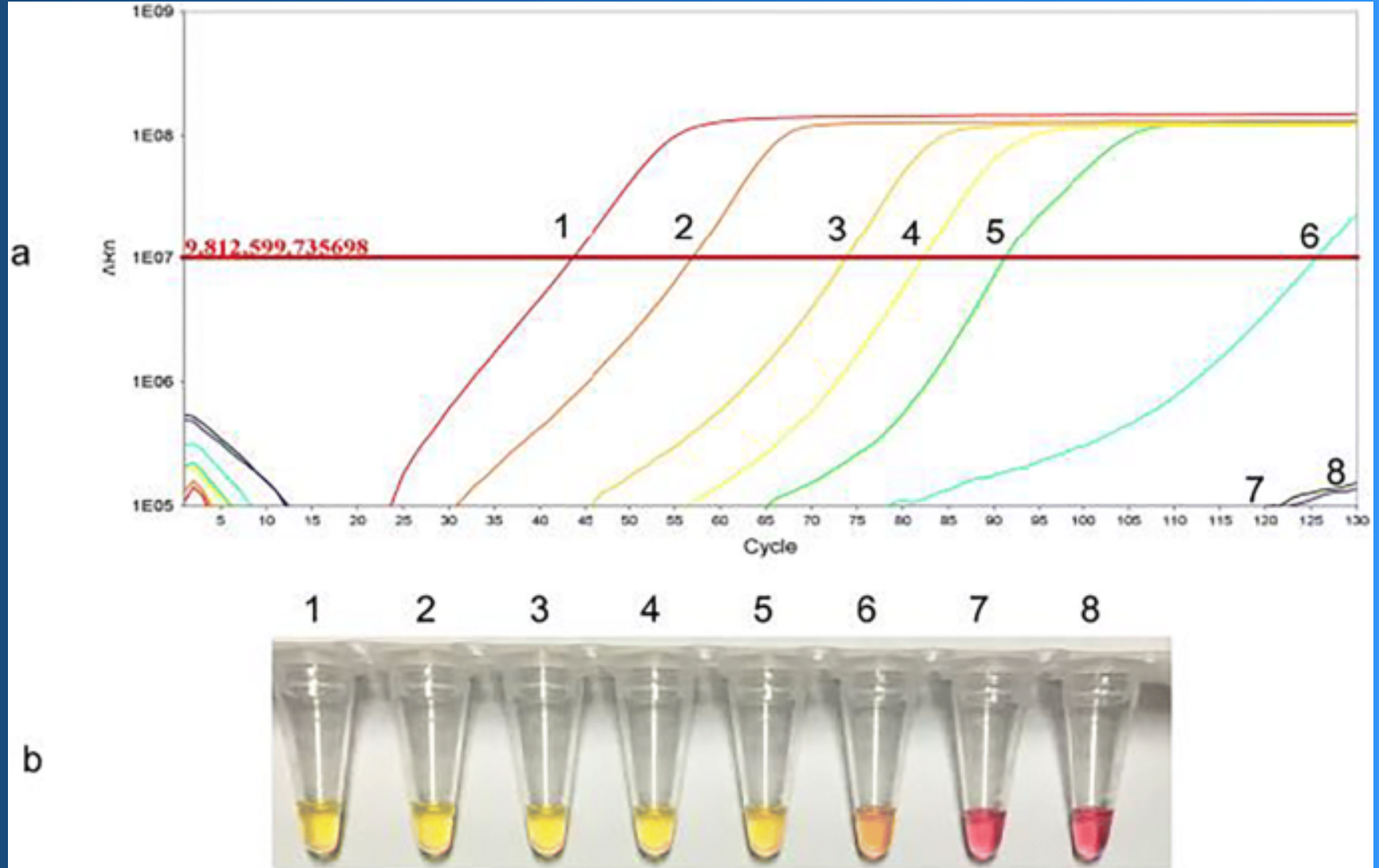


# Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

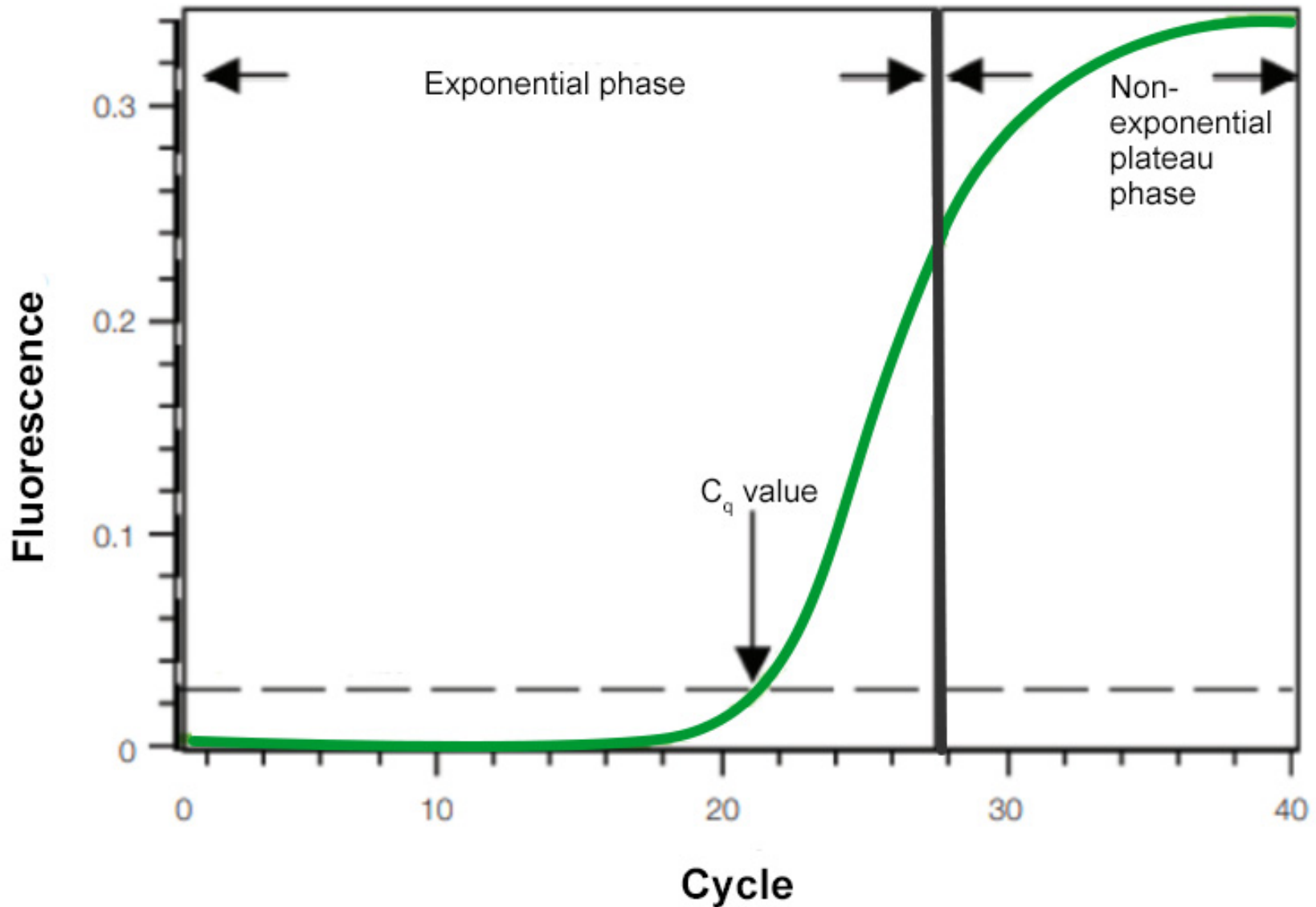
Si utilizzano le polimerasi di tipo III batteriche



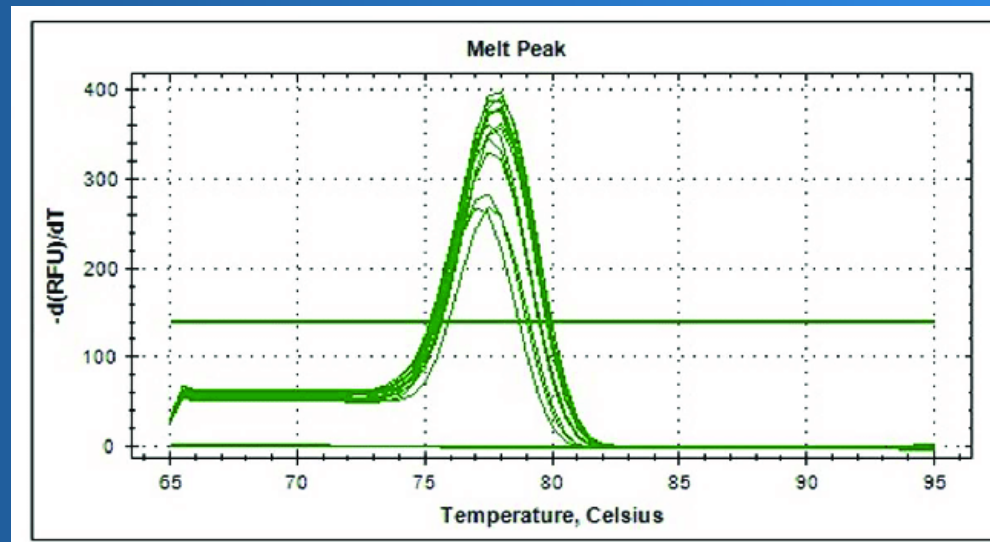
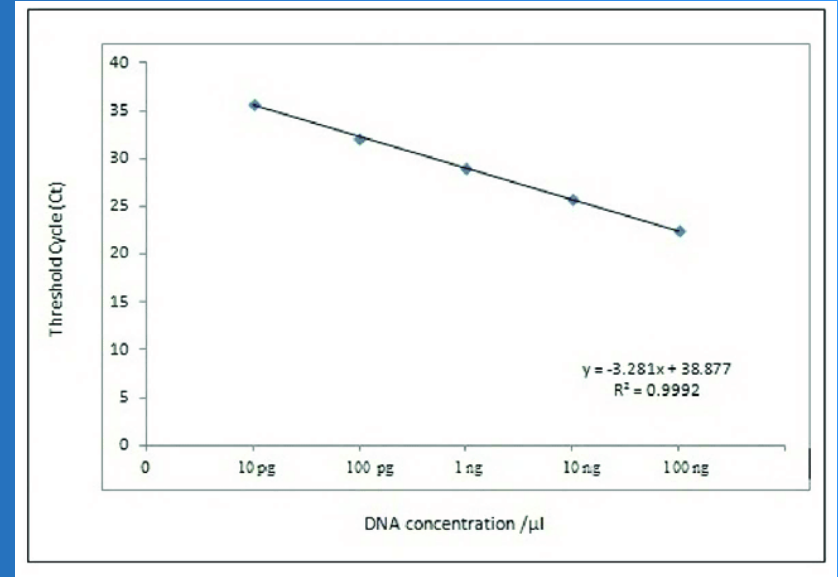
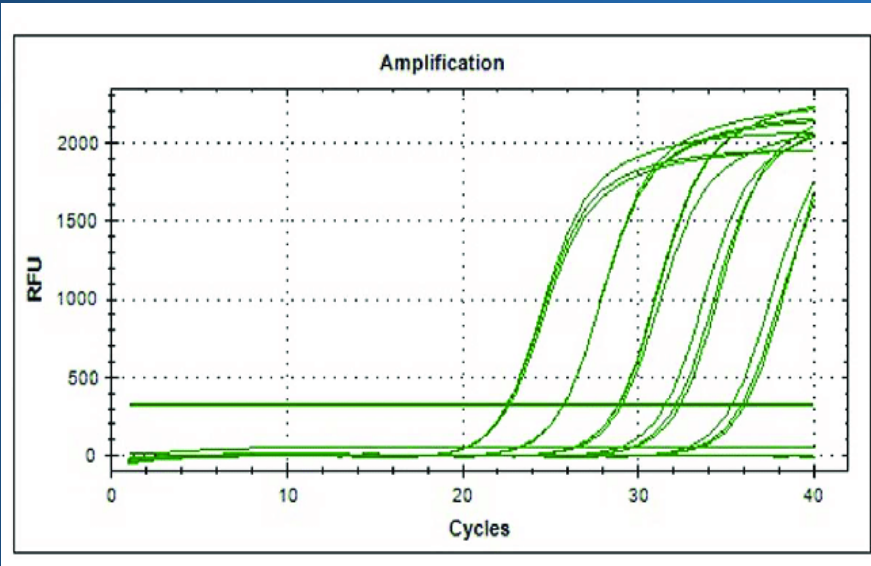
# Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



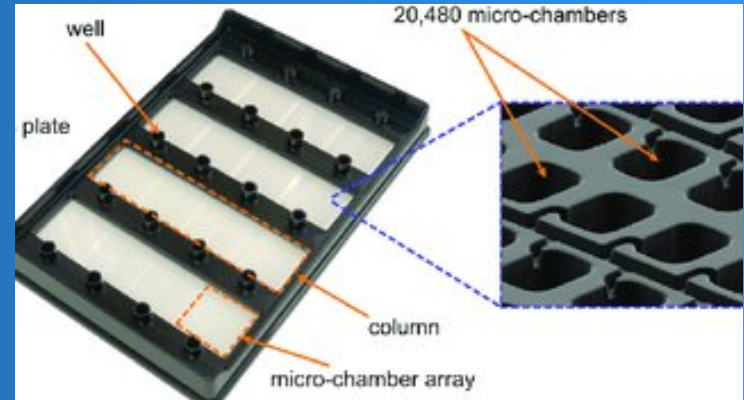
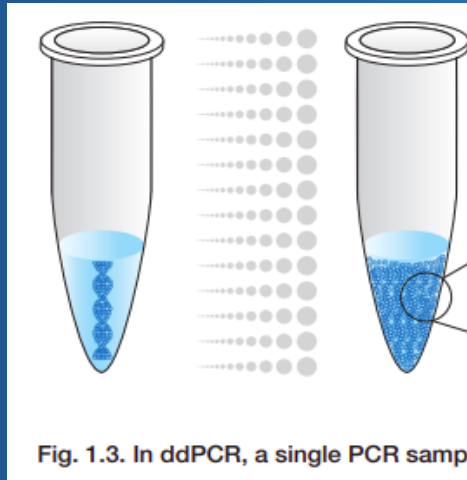
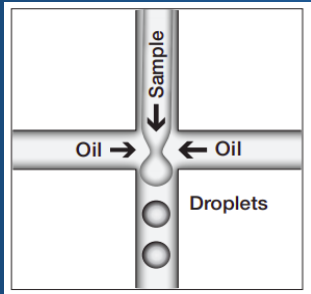
# PCR real time



# PCR real time

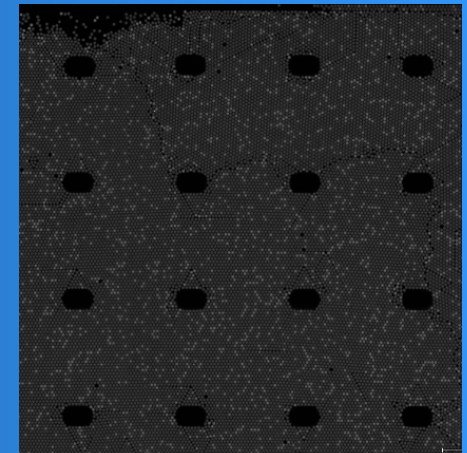
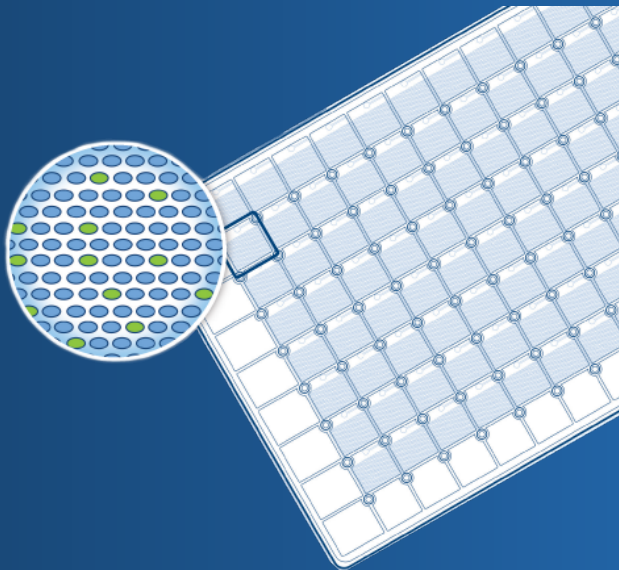


# PCR digitale



BioRad QX200/QX600

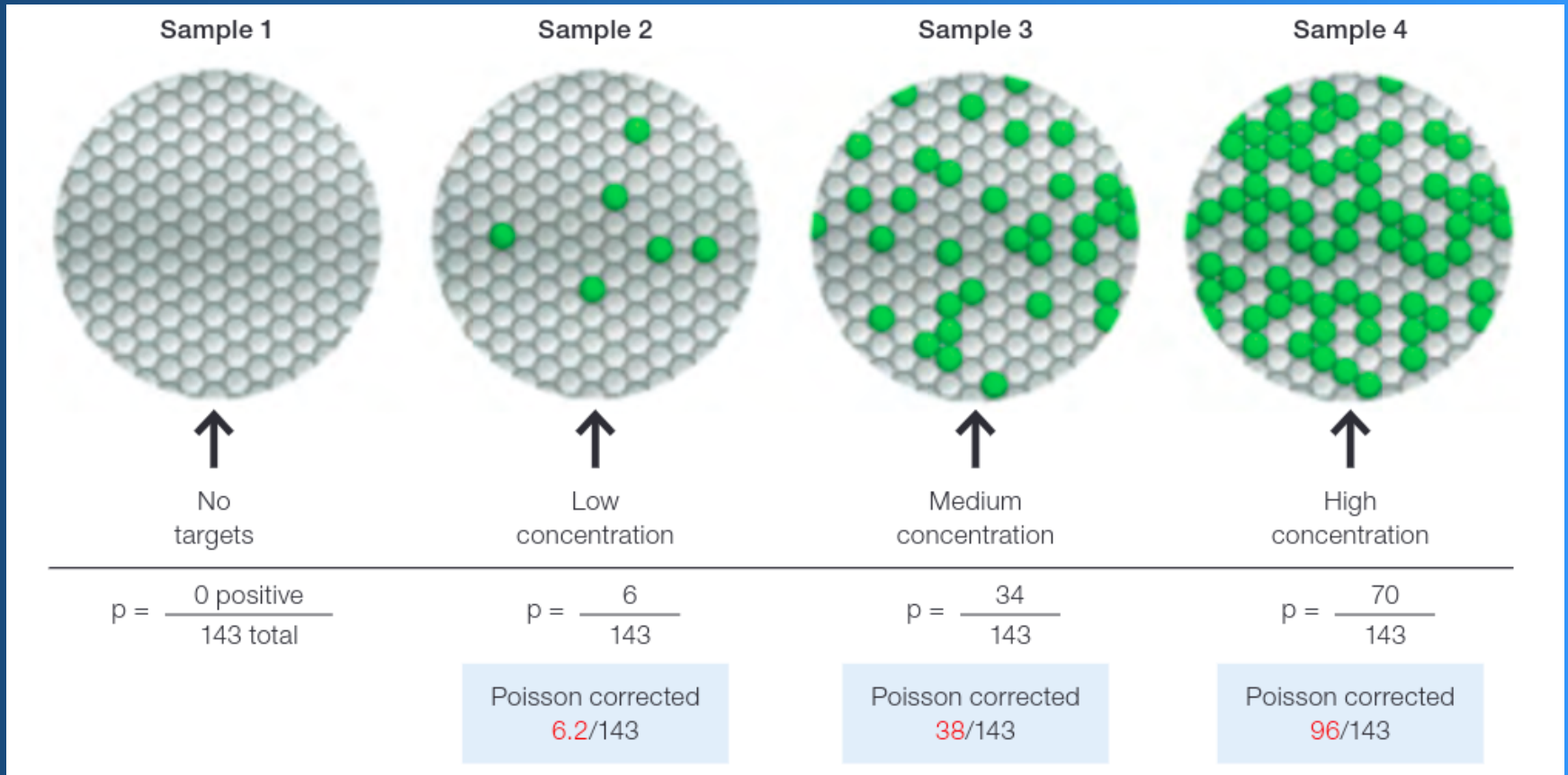
Thermo QuantStudio™ Absolute Q™



Qiagen QIAcuity Digital PCR

Stilla Crystal Digital PCR

# PCR digitale





# PCR digitale

## Top 5 benefits



### **Absolute target quantification**

No need for references or standard curves



### **High tolerance to inhibitors**

Due to partitioning and endpoint measurement



### **Superior precision**

Detect very small fold change differences



### **Increased sensitivity**

Detect rare mutations and low abundance targets



### **High reproducibility**

Eliminate amplification efficiency bias

## Top 5 applications



**Copy number variation**

**Rare mutation detection**

**NGS library quantification**

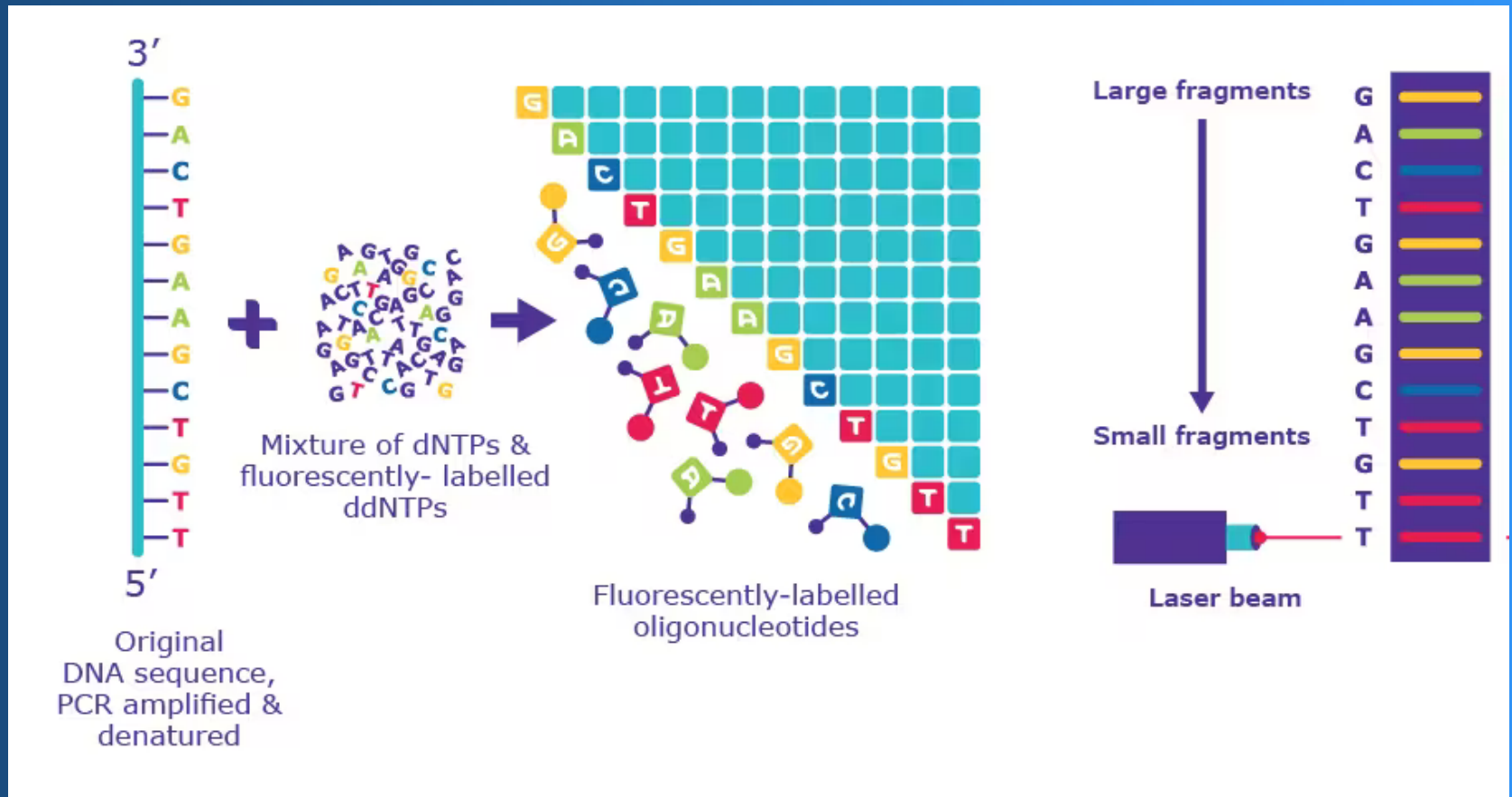
**Viral load detection**

**Gene expression analysis**

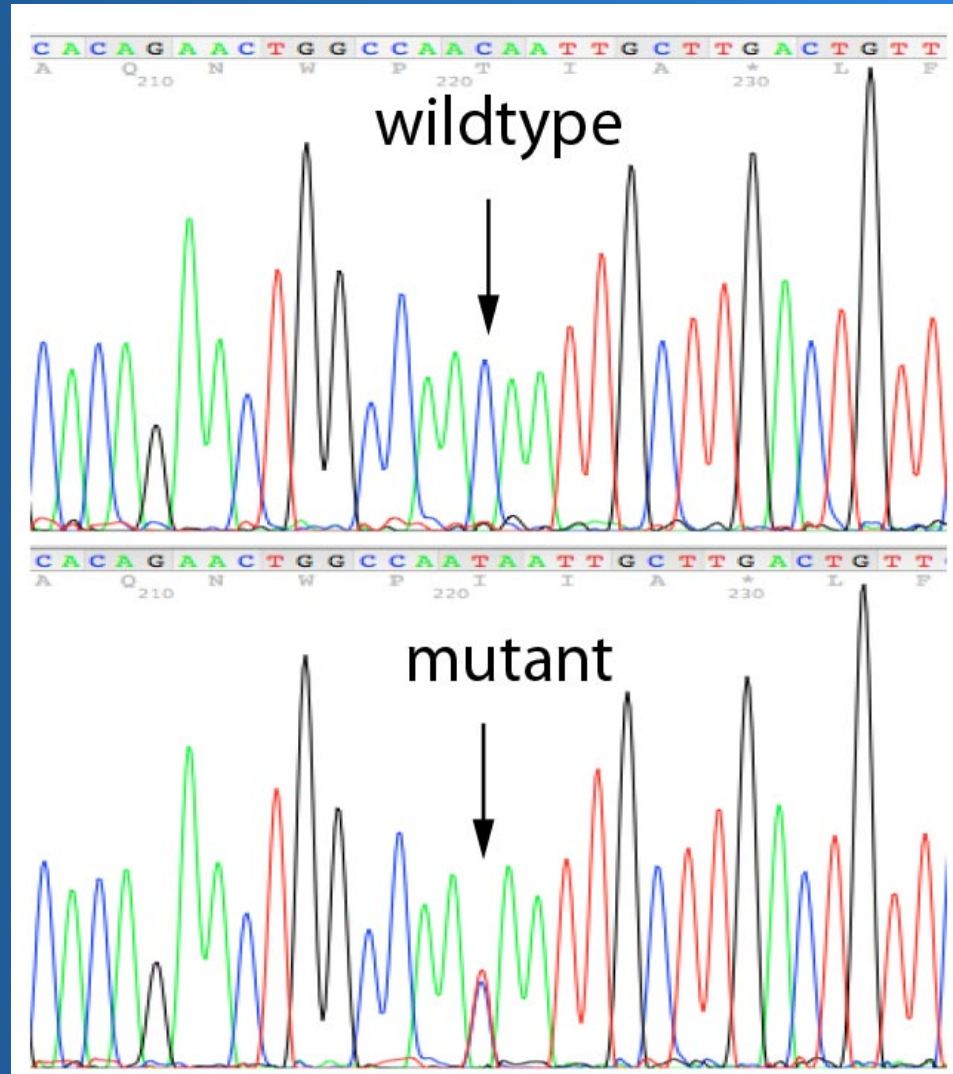
# Sequenziamento del DNA

Metodo dei di-deossi-nucleotidi di Sanger

marcati con 4 fluorofori diversi



# Sequenziamento del DNA



# Uso della PCR in diagnostica

## **Malattie ereditarie**

diagnostica prenatale

## **Malattie infettive**

clamidia, papilloma, TBC, AIDS

## **Malattie tumorali**

controllo precoce delle recidive

## **Medicina forense**

identità degli individui, paternità

# ...basta conoscere la sequenza...

## Diagnosi dell'anemia falciforme

Mutazione a carico di un singolo nucleotide  
nella catena  $\beta$  dell'emoglobina



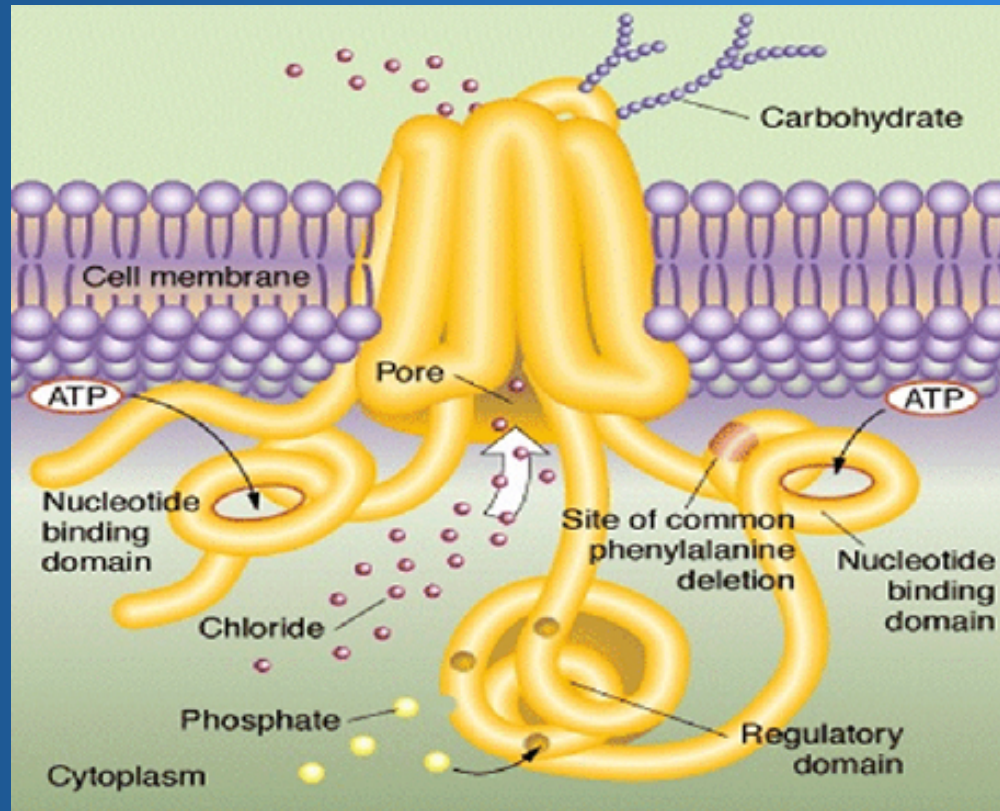
{ CCTG**A**GG sequenza normale  
{ CCTG**T**GG sequenza mutata



**Omozigoti S/S:** anemia grave, aspettativa di vita breve

**Eterozigoti A/S:** normalmente asintomatici (portatori sani)

# Diagnosticare la fibrosi cistica

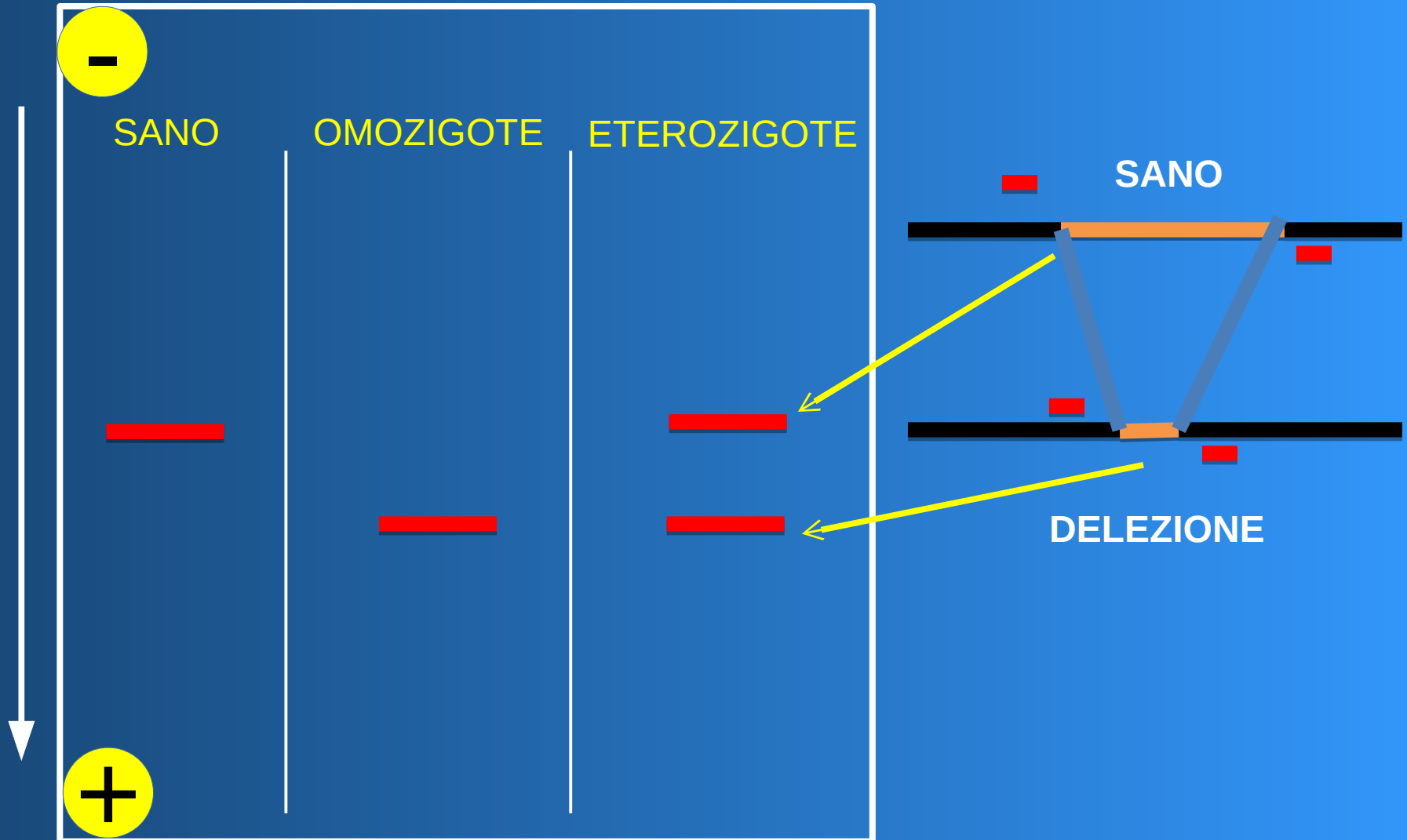


Amplificazione del gene seguita da sequenziamento

	Normale	ATC	ATC	TTT	GGT	
→	CF	ATC	AT	T	GGT	←

# Diagnosticare malattie da delezione

Elettroforesi su gel di agarosio



# Analisi prenatale di malattie genetiche

Recupero



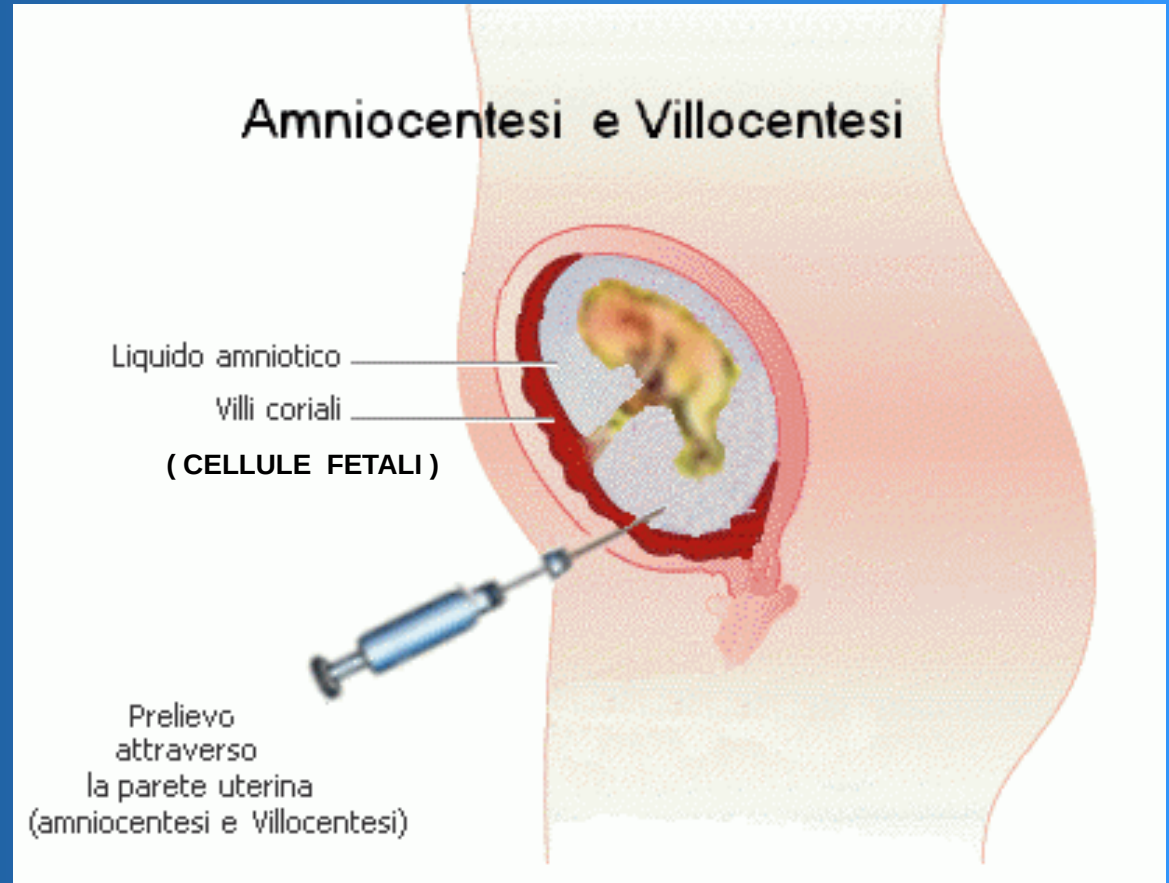
Proliferazione



Estrazione DNA

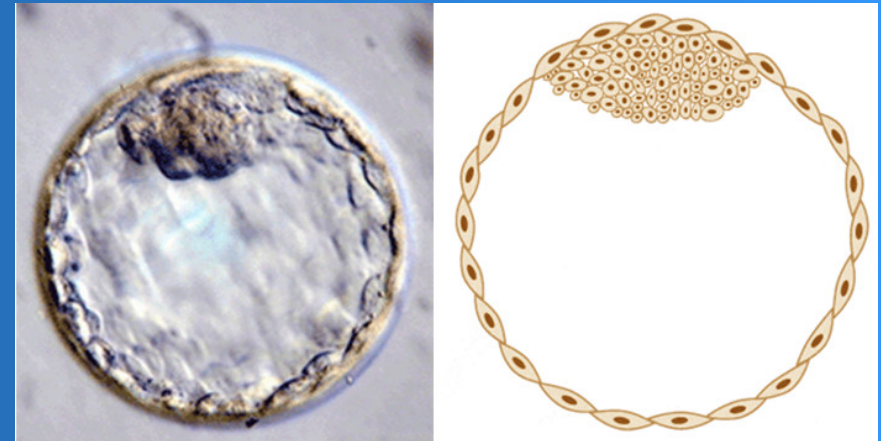
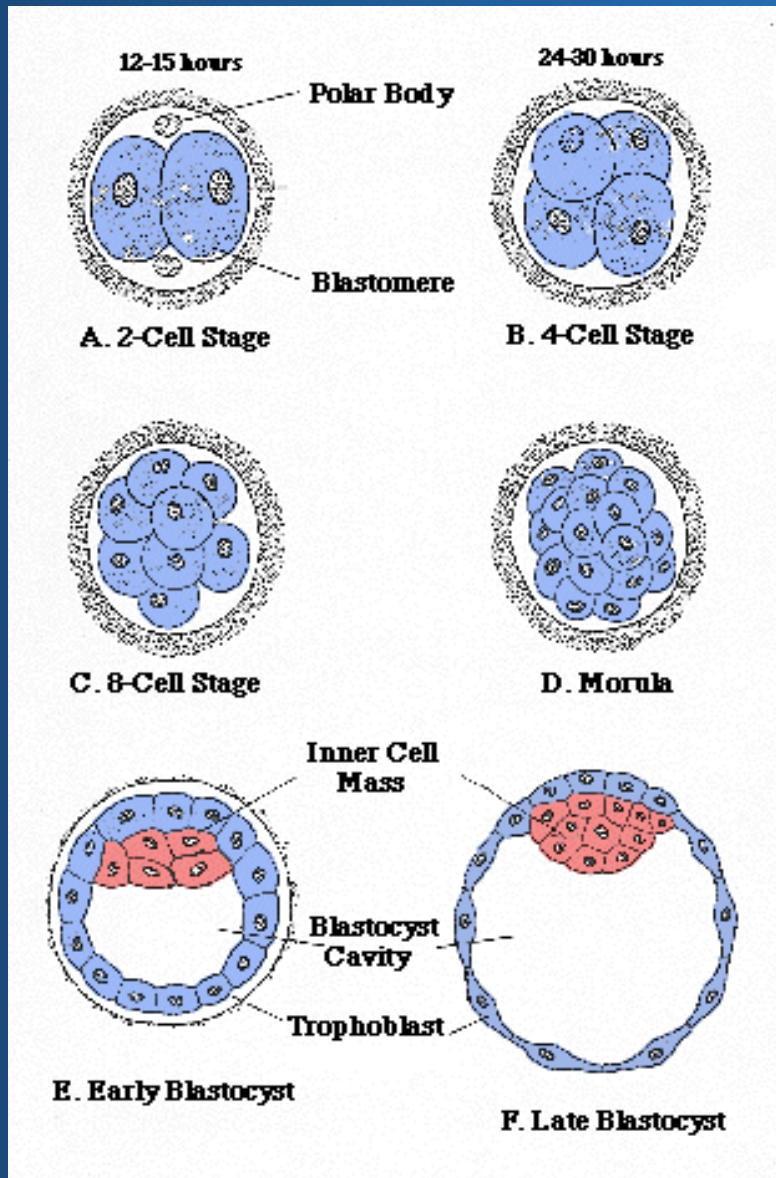


Analisi per PCR





# Analisi preimpianto



# Diagnosi di malattie infettive

Si effettuano delle PCR cercando un bersaglio NON umano, partendo da:

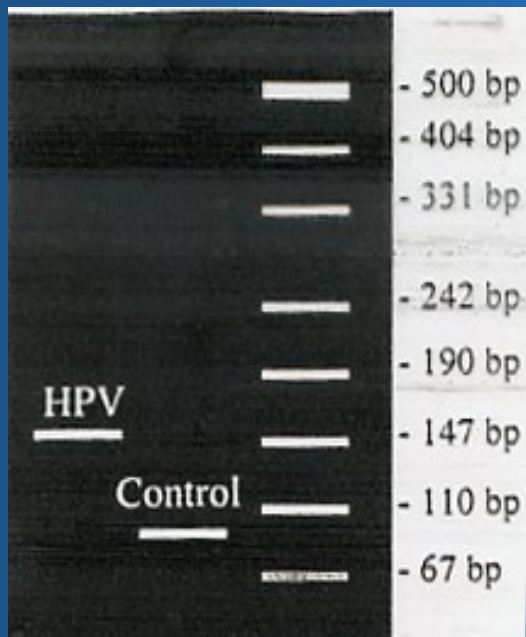
- ✓ Sangue/siero
- ✓ Saliva
- ✓ Sudore
- ✓ Feci
- ✓ Urine
- ✓ Espettorato
- ✓ Tamponi oro-faringei
- ✓ Biopsie

e si possono cercare (positivo/negativo)

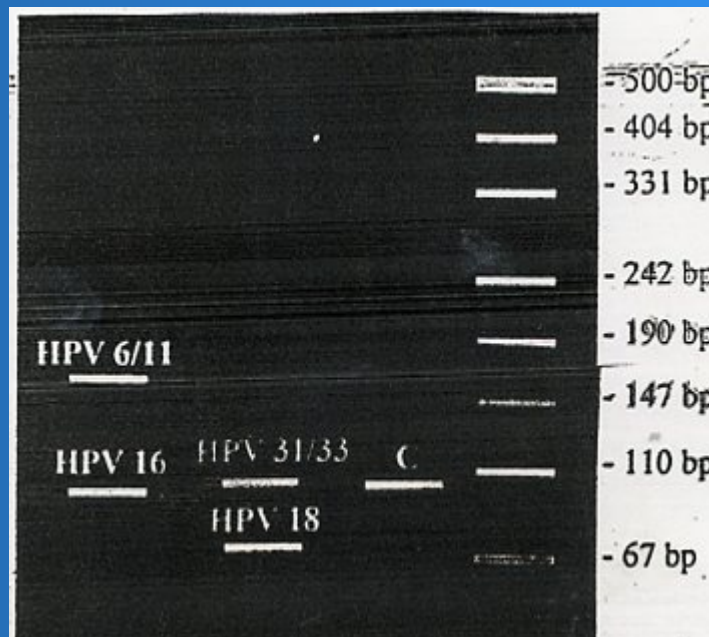
- ✓ Chlamydia
- ✓ Mycobacterium tuberculosis
- ✓ HIV (carica virale con PCR quantitativa)
- ✓ Qualsiasi altro organismo o virus con sequenza del DNA nota

# Diagnosi di HPV

test di infezione



test di tipizzazione



# Test commerciali comuni

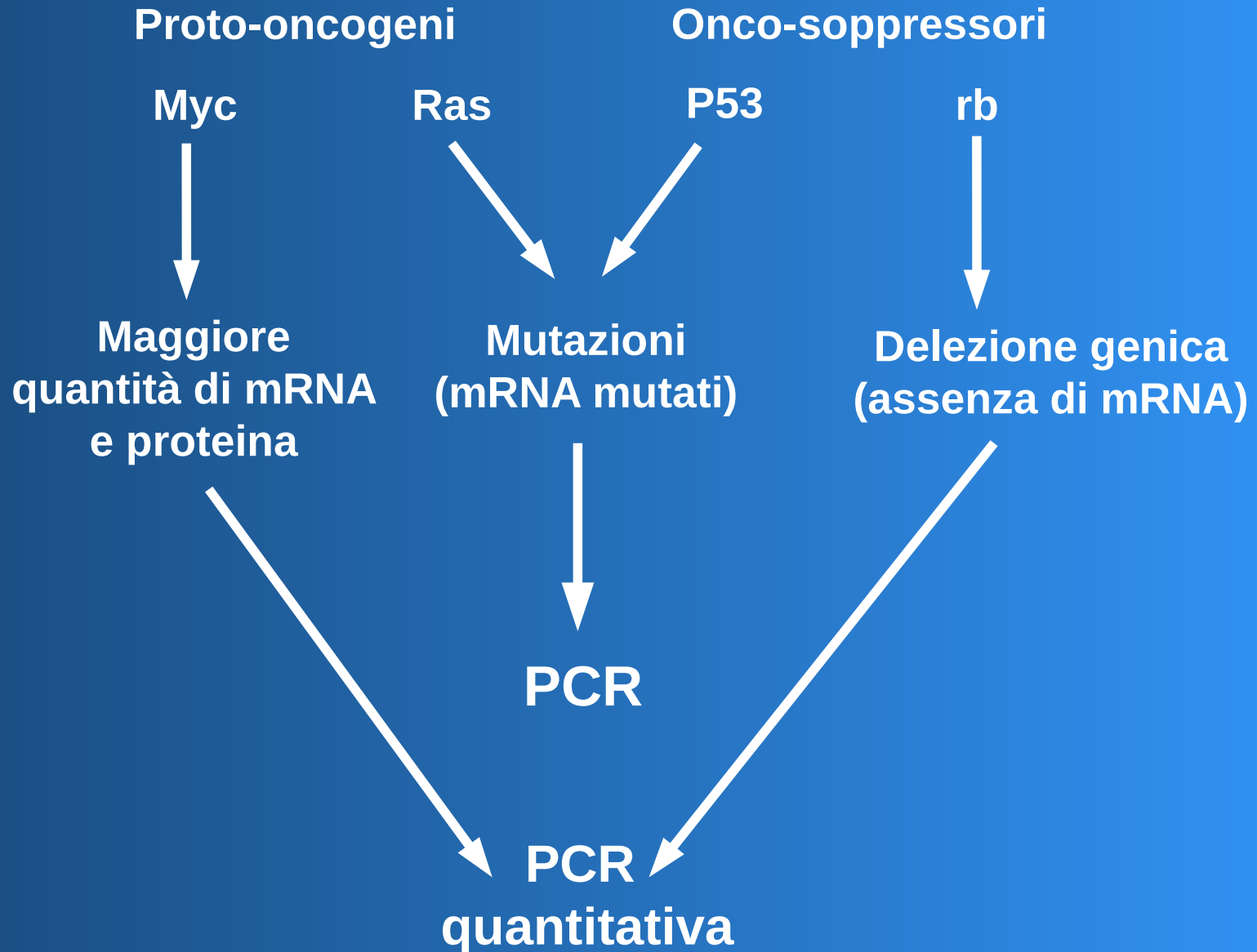
- Chlamydia  
(test su DNA plasmidico)
- Mycobacterium tuberculosis  
(tipizzazione)
- HIV  
(carica virale con PCR quantitativa)

POSSIBILE PER QUALSIASI ORGANISMO  
DI CUI SI CONOSCA LA SEQUENZA DEL GENOMA

# PCR per la diagnosi tumorale

- ✓ Ricerca di mutazioni specifiche nel DNA delle cellule tumorali (PCR + Sequenziamento)
- ✓ Valutazione del livello di espressione di mRNA di oncogeni o oncosoppressori (RT-PCR quantitativa)

# PCR per la diagnosi tumorale



# DNA minisatellite ipervariabile o VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)

- ✓ Sono sequenze **altamente polimorfiche** ed organizzate in oltre 1000 gruppi (lungi da 0.1 a 20 kb) di **corte unità ripetute in tandem**, che variano considerevolmente per dimensioni ma posseggono una sequenza comune centrale (*core*)  
GGGCAGGAXG
- ✓ Molti di questi gruppi si trovano **vicino ai telomeri**
- ✓ La maggior parte di queste sequenze *non* sono trascritte eccetto alcuni elementi all'interno di sequenze intrageniche non codificanti
- ✓ Il **significato non** è ancora **chiaro**, ma indipendentemente dalla loro reale funzione nel genoma umano, esiste un utilizzo pratico di questi gruppi, ma in genere delle sequenze ripetute, nel **DNA fingerprinting** (impronta digitale del DNA)

# Sequenze ripetute nel genoma umano

ALTAMENTE RIPETITIVE

DNA MICROSATELLITE



Estese ripetizioni di corte sequenze, spesso localizzate in particolari distretti, numero totale limitato, circa 3%

MEDIAMENTE RIPETITIVE

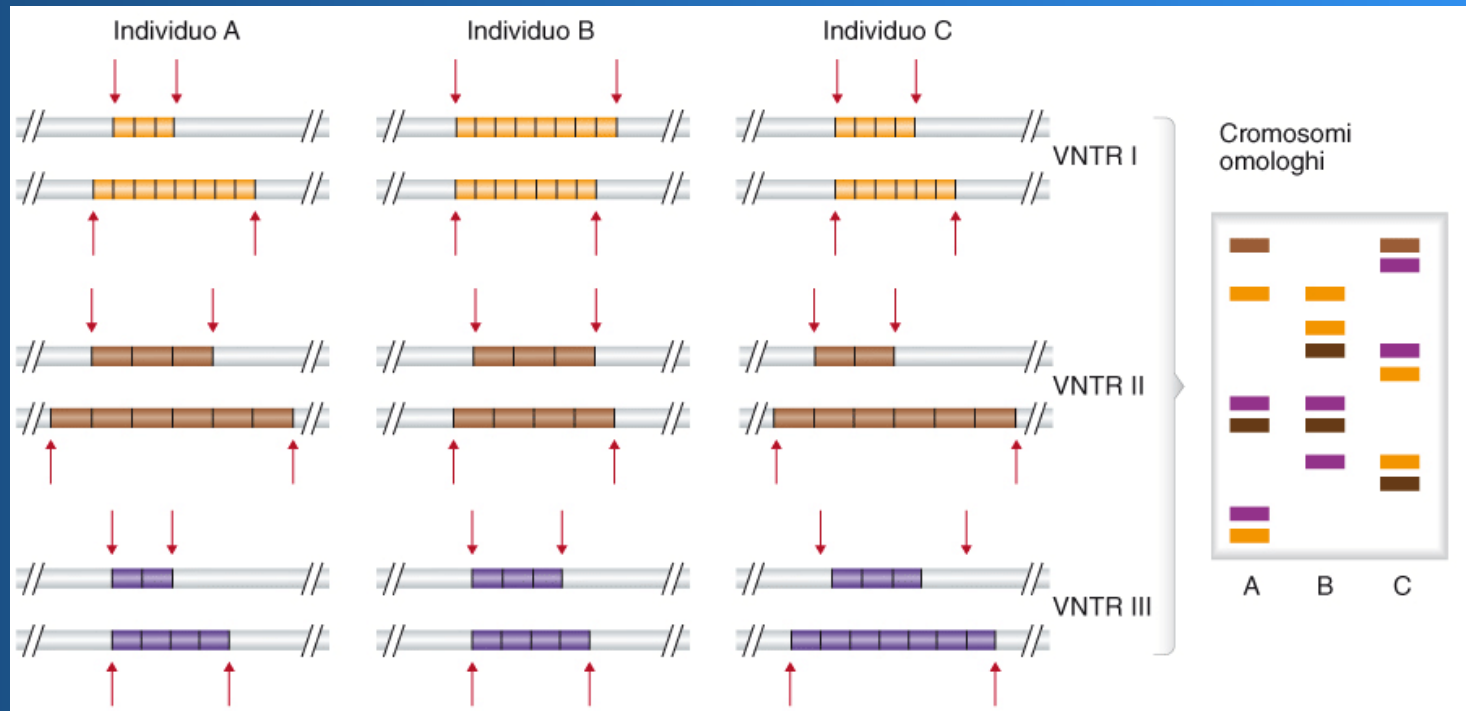
TRASPOSONI



Ripetizioni di sequenze più lunghe disperse nell'intero genoma, molto numerose, circa 45%



# Tandem repeats nel genoma umano



**FIGURA 4.24** ▲ L'analisi di un gran numero di VNTR permette di identificare l'individuo a cui appartiene il DNA esaminato se il polimorfismo dei *loci* esaminati è molto alto. In caso di un alto polimorfismo, molti individui sono eterozigoti in molti dei VNTR (come nell'esempio illustrato). Ogni allele è visibile con una banda specifica in gel corrispondente al peso molecolare (pannello a destra). Si noti che spesso la dimensione dell'unità ripetuta è diversa tra vari VNTR.

**VNTR** = Variable Number of Tandem Repeats

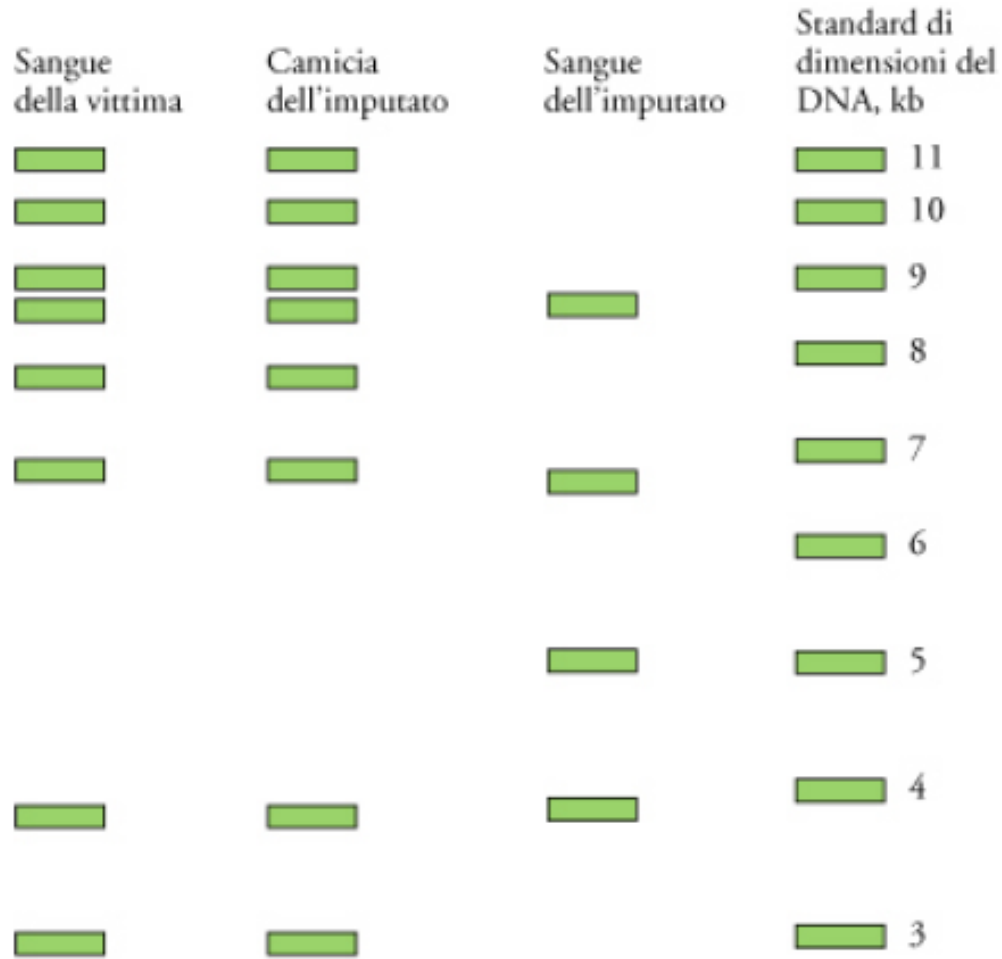
# DNA fingerprinting

IL DNA fingerprinting è attualmente **la tecnica più potente** per identificare un campione biologico.

Viene utilizzata **dal 1984 in medicina forense** (medicina legale) per risolvere casi legali: attribuzione di **paternità**, casi di **omicidi**, casi di **stupri**, ecc.

La Genetica forense, ossia l'applicazione della Genetica nella risoluzione dei casi legali, si avvale della **variabilità del genoma umano** per identificare un individuo, o meglio per **attribuire un campione biologico ad un unico individuo**.

# DNA fingerprinting



# PCR Digitale